



HAL
open science

Bases moléculaires de la spécificité d'hôte chez les métapneumovirus aviaires

Nathan Szerman

► **To cite this version:**

Nathan Szerman. Bases moléculaires de la spécificité d'hôte chez les métapneumovirus aviaires. Microbiologie et Parasitologie. Université de Rennes, 2019. Français. NNT : 2019REN1B027. tel-02515980

HAL Id: tel-02515980

<https://theses.hal.science/tel-02515980>

Submitted on 23 Mar 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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 600

Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation

Spécialité : Microbiologie, Virologie, Parasitologie

Par

Nathan SZERMAN

Bases moléculaires de la spécificité d'hôte chez les métapneumovirus aviaires

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 11 juillet 2019
Unité de recherche : VIPAC, ANSES, laboratoire de Ploufragan

Rapporteurs avant soutenance :

Pierre Emmanuel CECCALDI Professeur, Université Paris-Diderot, France
Nathalie RUVOËN-CLOUET Professeur, ONIRIS, Nantes, France

Composition du Jury :

Président	Michel SAMSON	Directeur de recherche, Université de Rennes 1, France
Rapporteur	Pierre Emmanuel CECCALDI	Professeur, Université Paris-Diderot, France
Rapporteuse	Nathalie RUVOËN-CLOUET	Professeur, ONIRIS, Nantes, France
Examineur	Andrew J. EASTON	Professor, School of Life Sciences, University of Warwick, England
Directeur de thèse	Nicolas ETERRADOSSI	Directeur de recherche, ANSES, Ploufragan, France
Co-directeur de thèse	Paul BROWN	Chargé de projets de recherches, ANSES, Ploufragan, France

Remerciements

Ce manuscrit est le fruit de mes trois ans de travaux de recherche effectués au sein de l'unité VIPAC de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), sur le site de Ploufragan (Côtes d'Armor, 22). Ce travail a été possible grâce à l'aide financière de la région Bretagne et du conseil départemental des Côtes d'Armor.

J'adresse mes remerciements aux membres de mon jury de thèse pour l'apport de leurs expertises dans l'évaluation de ce travail. Je remercie aussi chaleureusement les membres de mon comité de pilotage de thèse pour leur implication au bon déroulement de ce projet : Martine Bonnaure-Mallet, en qualité de tutrice, ainsi que Jacques Le-Seyec et Vanessa Escuret.

Je tiens à remercier les Drs Gilles Salvat et Nicolas Etteradossi, en qualité de directeurs successifs de l'Anses Ploufragan, de m'avoir offert l'opportunité de travailler au sein de ce laboratoire de recherche. En qualité d'ancien chef de l'unité VIPAC et de directeur de thèse, je remercie une nouvelle fois le Dr Nicolas Etteradossi pour son accueil dans l'unité, sa participation à l'organisation de ma thèse, son expertise et sa rigueur scientifique.

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement le Dr Paul Brown, en qualité de co-directeur, pour sa disponibilité, sa patience, sa rigueur et sa pédagogie hors pair tout au long de ces trois années.

Merci aux membres du SELEAC pour leur participation aux phases d'expérimentations *in vivo* ainsi qu'au bon déroulement de celles-ci.

Du côté laboratoire, un énorme merci à Chantal pour son dévouement sans faille et sa participation à l'avancement de la thématique AMPV. Merci également à Evelyne pour son expertise.

Parmi les membres de l'unité VIPAC, je tiens à remercier mon ancienne collègue de bureau, Martine, ainsi que mes voisins d'en face, Sébastien et Céline, pour leur aide pour x et y raisons. Je salue tout particulièrement Clément et Florian pour leur soutien et la dose de fun qu'ils ont intégré quotidiennement au labo.

Je remercie aussi l'ensemble des doctorants actuellement et anciennement présents à l'Anses Ploufragan que j'ai eu la chance de côtoyer durant ces trois années. Avoir pu échanger avec vous a été très riche en enseignements.

Il m'est impensable de ne pas évoquer l'importance de mes amis de Paris et d'ailleurs dont Damien, Jean, Sam, Momo, ... pour leur patience, leur aide, leurs levées de coude et l'ensemble des moments passés et à venir.

Durant cette thèse, j'ai aussi eu l'occasion de faire de formidables rencontres. La petite équipe de doctorants rencontrée à Montpellier parmi lesquels se trouvait Alice. Alice que je remercie pour tout, mais vraiment tout. Je ne pourrais pas citer ici tout ce que tu m'as apporté mais il est important de citer ton incommensurable et formidable bonne humeur perpétuelle.

Enfin, je tiens à remercier ma famille, qui m'a permis de poursuivre mes études et qui m'a soutenu et aidé tout au long de cette aventure.

Table des matières

Liste des abréviations	11
Index des figures et tableaux	13
Présentation bibliographique.....	17
1. Introduction générale.....	17
2. Agent infectieux	19
2.1 Position taxonomique	19
2.2 Structure et morphologie du virion.....	21
2.3 Organisation génomique.....	22
2.4 Protéines des AMPV	23
2.4.1 Protéine du complexe de réplication	23
2.4.1.1 Nucléoprotéine (N).....	23
2.4.1.2 Phosphoprotéine (P)	25
2.4.1.3 Protéine M2 (M2)	27
2.4.1.3.a Protéine M2.1	27
2.4.1.3.b Protéine M2.2	29
2.4.1.4 Polymérase (L)	29
2.4.2 Protéine de matrice (M).....	32
2.4.3 Glycoprotéines d'enveloppe.....	33
2.4.3.1 Protéine de fusion (F)	33
2.4.3.1.a Sous unité F1 (aa 103-538)	35
2.4.3.1.b Sous unité F2 (aa 1-98).....	35
2.4.3.2 Protéine hydrophobe (SH).....	36
2.4.3.3 Glycoprotéine de surface (G).....	38
2.5 Cycle viral	40
2.5.1 Attachement et entrée virale.....	41
2.5.2 Transcription	41
2.5.3 Réplication	42
2.5.4 Assemblage et bourgeonnement.....	43
2.6 Cibles de l'infection par les AMPV	44

2.7 Propriétés de résistances aux agents physicochimiques	45
3. Maladies causées par les AMPV	47
3.1 Espèces cibles.....	47
3.2 Distribution géographique et impact économique.....	48
3.3 Aspects cliniques.....	49
3.4 Aspects épidémiologiques	51
3.5 Diagnostic	53
3.6 Prévention et contrôle	55
4. Systèmes de génétique inverse appliqués aux <i>Mononegavirales</i>	57
4.1 Définition.....	57
4.2 Premier système de génétique inverse pour une <i>Mononegavirale</i>	59
4.3 Améliorations de ce système	59
4.3.1 Virus « helper »	60
4.3.2 Système cellulaire « helper ».....	60
4.3.3 Promoteurs	60
4.3.4 Ribozyme en tête de marteau	61
4.4 Etat de l’art des systèmes existant pour les AMPV.....	62
5. Rôle de la protéine SH chez les autres <i>Mononegavirales</i>	64
Travaux personnels.....	69
Chapitre 1 : Spécificité d’hôte des Métapneumovirus Aviaires	71
Introduction	73
Publication 1.....	79
Conclusions	87
Chapitre 2 : Etude du rôle de la protéine SH chez les AMPV-C.....	93
Introduction	95
Publication 2.....	99
Conclusions	107

Discussion générale et perspectives	111
Conclusion générale	133
Références bibliographiques	135
Attestation de management qualité de la thèse	153

Liste des abréviations

Aa	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AMPV	Métapneumovirus aviaire (Avian Metapneumovirus)
ARN	Acide ribonucléique
BSRT7	Baby Hamster Kidney cell clone T7
C-Ter	Extrémité carboxy terminale
CEF	Fibroblastes d'embryons de poulet (Chicken embryo fibroblasts)
ECP	Effet cytopathogène
EOPS	Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiés
FRET	transfert d'énergie entre molécules fluorescentes
GE	Fin de gène (gene end)
GS	Début de gène (gene start)
HDVR	Ribozyme du virus de l'hépatite delta (hepatitis delta virus ribozyme)
HHR	Ribozyme en tête de marteau (hammerhead ribozyme)
HMPV	Métapneumovirus humain (Human Metapneumovirus)
Kb	Kilobase
NC	Nucléocapside
Nm	Nanomètre
NS1	Protéine non structurale 1
NS2	Protéine non structurale 2
Nt	Nucléotide
N-Ter	Extrémité amino terminale
ORF	Cadre ouvert de lecture
pCMV	Promoteur du cytomégalo virus
pT7	Promoteur de la polymérase du bactériophage T7
qRT-PCR	Transcription inverse et réaction en chaîne par polymérase quantitative
RdRp	ARN polymérase ARN dépendant (RNA dependant RNA polymerase)
RNP	Ribonucléoprotéine
RSV	Virus respiratoire syncytial (Respiratory Syncytial Virus)
SH	Protéine hydrophobe (Small hydrophobic protein)
SHS	Syndrome infectieux de gonflement de la tête (Swollen head syndrome)
T7pol	ARN polymérase du bactériophage T7
T7t	Termineur de la polymérase du bactériophage T7
TOC	Culture d'anneaux de trachée (Tracheal organ culture)
TRTV	Virus de la rhinotrachéite infectieuse de la dinde (Turkey rhinotracheitis virus)
Vero	Cellule de rein de singe vert

Δ

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Organisation génomique des membres de la famille *Pneumoviridae*. Page 20

Figure 2 : Arbre phylogénétique réalisé selon la méthode de neighbor-joining à partir des séquences complètes des virus disponibles du genre *Metapneumovirus*. Page 20

Figure 3 : Particules virales d'un AMPV-B observées en microscopie électronique à transmission et clichés en cryomicroscopie après coloration négative de la nucléocapside du RSV. Page 21

Figure 4 : Représentation des différents domaines d'interactions de N avec l'ARN et la protéine P. Page 24

Figure 5 : Représentation schématique des différents domaines d'interactions de la protéine P des *Pneumoviridae*. Page 26

Figure 6 : Alignement des séquences des protéines M2.1 des *Pneumoviridae*. Page 28

Figure 7 : Organisation modulaire de la protéine L des *Mononegavirales*. Page 30

Figure 8 : Représentation schématique des interactions de l'ARN viral avec les protéines de la ribonucléoprotéine de l'HMPV. Page 31

Figure 9 : Modèle de comparaison des domaines extracellulaire de la protéine F de l'HMPV pré et post fusion. Page 34

Figure 10 : Représentation schématique de la protéine F des AMPV avec la séquence du domaine de clivage. Page 35

Figure 11 : Structure de la protéine SH du RSV sous forme pentamérique. Page 36

Figure 12 : Effets de la perte de SH sur le phénotype d'un AMPV-A *in vitro*. Page 38

Figure 13 : Représentation schématique du cycle de viral de l'HMPV. Page 40

Figure 14 : Effet cytopathogène causés par l'infection de cellules Vero avec l'AMPV-C de lignée eurasienne. Page 45

Figure 15 : Répartition géographique mondiale des AMPV décrits dans la littérature. Page 49

Figure 16 : Effets cytopathogènes observés en microscopie optique (x100) suite à l'utilisation du vTF7 pour l'expression de la polymérase T7 dans des cellules Vero et des fibroblastes d'embryons de poulets exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) de 10 jours. Page 58

Figure 17 : Classification et organisation génomique des virus de l'ordre des *Mononegavirales* exprimant une protéine SH. Page 64

Figure 18 : Alignement des séquences aminopeptidiques des protéines SH des *Metapneumovirus*. Page 95

Tableau 1 : Caractéristiques des 9 protéines virales identifiées chez les AMPV. Page 41

Tableau 2 : Virus du genre *Mononegavirales* possédant une protéine SH et caractéristiques de ces protéines. Page 65

Tableau 3 : Résumé non exhaustif des différentes approches expérimentales entreprises avec les AMPV chez différentes espèces de volailles conventionnelles ou EOPS. Page 74

Présentation bibliographique

1. Introduction générale

Les Métapneumovirus aviaires (AMPV) sont des virus responsables d'infections aiguës des voies respiratoires et du tractus génital chez les oiseaux dont les volailles d'élevage (principalement dindes, poulets et canards). Ces virus ont été reconnus pour la première fois comme agents étiologiques de rhinotrachéite aiguë chez des dindes d'élevage en Afrique du sud en 1978 (Buys and Du Prees 1980). Les AMPV ont d'abord été nommés *Turkey rhinotracheitis Virus* (TRTV) en se basant sur les symptômes observés et l'espèce animale affectée. Par la suite, des poulets d'élevage présentant un syndrome infectieux de gonflement de la tête (*Swollen head syndrom, SHS*), ont eux aussi été infectés par ces mêmes virus précédemment isolés chez les dindes (Buys et al. 1989, Maharaj et al. 1994). Des AMPV ont également été retrouvés dans des élevages de canards en France puis en Chine (Toquin et al. 1999, Sun et al. 2014). Dans les années qui ont suivi, des infections associées à des virus apparentés ont été rapportées dans d'autres régions du monde à l'exception de l'Australie (Andral et al. 1985, Giraud et al. 1986, McDougall and Cook 1986, Jones et al. 1991, Kleven 1997, Senne et al. 1997, Toquin et al. 1999, Sun et al. 2014).

L'importance accordée aux AMPV est étroitement liée à l'impact économique de ces virus dans les filières avicoles, qui ne cesse d'être grandissant en lien avec l'industrialisation de ces filières mais également avec le développement de moyens de détection permettant de mieux mettre en évidence la présence de ces virus. Par ailleurs, l'apparition et la propagation rapide de ces virus chez la dinde puis le poulet sur différents continents à partir de leur découverte en 1978 suggère fortement qu'il s'agissait de pathogènes émergents pour lesquels aucune immunité ne préexistait chez les principales espèces de volailles domestiques. Cette situation suggère donc que les AMPV auraient pu être introduits chez les volailles domestiques depuis une autre source.

Des épizooties liées aux AMPV ont été rapportées en Europe et aux Etats-Unis (Andral et al. 1985, Senne et al. 1997). Aux Etats-Unis dans l'état du Colorado à partir du mois de mai 1996, un virus apparenté aux AMPV mais différent antigéniquement de ceux précédemment isolés en Europe a été identifié dans des élevages de dindes présentant des troubles respiratoires avec un mortalité associée comprise entre 0 et 30% (Kleven 1997, Senne et al. 1997). Par la suite, des AMPV ont été retrouvés chez les canards domestiques (Shin et al. 2000, Shin et al. 2002, Bennett et al. 2004) et sauvages (Jardine et al. 2018). Dès le mois de mars 1997, l'état du Minnesota et ses états voisins ont eux aussi décrit des

cas d'infections similaires dans des élevages de dindes (Seal 1998, Goyal et al. 2003, Bennett et al. 2004). La détection des AMPV dans ces élevages de dindes d'Amérique du Nord suit un schéma dépendant des saisons avec une apparition du virus au printemps (mars – mai) et à l'automne (octobre – novembre) (Shin et al. 2002). Cette épizootie a fortement impacté l'économie de la filière avicole des régions concernées aux Etats-Unis entraînant une perte estimée à 15 millions de dollars par an sur la période de 1998 à 2002 (Goyal et al. 2000, Goyal et al. 2003). Cette situation suggère, comme précédemment observé entre l'Afrique et l'Europe, une introduction récente des AMPV et une absence d'immunité préexistante chez les volailles qui caractérisent une émergence virale.

Plus récemment encore, un Métapneumovirus humain (Human Metapneumovirus, HMPV) provoquant des bronchiolites chez les enfants et les individus immunodéprimés a été isolé (van den Hoogen et al. 2001) et des études de génétiques et phylogénétiques suggèrent que ce virus pourrait être dérivé d'un AMPV ancestral apparenté aux AMPV du canard et en avoir divergé il y a environ 200 ans (de Graaf et al. 2008, Brown et al. 2014, Sun et al. 2014). De plus, des études sérologiques rétrospectives ont montré que l'HMPV circulait chez l'homme depuis au moins 50 ans avant qu'il ne soit découvert en 2001.

L'ensemble de ces éléments illustrent de possibles événements de franchissement de la barrière d'espèce des AMPV et nous ont conduits à nous intéresser au cours de ce travail de thèse à préciser le spectre d'hôte de différentes souche d'AMPV et à rechercher les éventuelles bases moléculaires de la spécificité d'hôte de ces virus.

2. Agent infectieux

2.1 Position taxonomique

Les AMPV appartiennent à l'ordre des *Mononegavirales*, à la famille des *Pneumoviridae* et au genre *Metapneumovirus* (MPV) (Maes and Amarasinghe 2019). Les AMPV sont des virus à ARN linéaire simple brin de polarité négative de 13-14 kb codant pour neuf protéines réparties sur huit gènes (Figure 1). La classification des AMPV au sein du genre *Metapneumovirus* a été établie en se basant sur la morphologie des virions (Collins et al. 1986), l'absence d'activité hémagglutinante, le nombre d'ARN messagers codés (Cavanagh and Barrett 1988, Collins and Gough 1988, Ling and Pringle 1988) ainsi que sur les homologies de séquences existant d'une part entre les Métapneumovirus aviaires et humains (HMPV) (van den Hoogen et al. 2001), et d'autre part entre les Métapneumovirus et le virus respiratoire syncytial (RSV) précédemment inclus dans le genre *Pneumovirus*, aujourd'hui renommé *Orthopneumovirus*. La différence la plus notable entre les *Orthopneumovirus* et les *Metapneumovirus* est l'absence des séquences codant pour les protéines non structurales NS1 et NS2 chez les *Metapneumovirus* (Randhawa et al. 1997), expliquant les différences de taille des génomes, 15 kb chez les *Orthopneumovirus* contre 13-14 kb chez les *Metapneumovirus*. Une autre différence remarquable consiste dans l'ordre dans lequel les gènes sont agencés le long du génome (Figure 1).

Les AMPV sont répartis en quatre sous-groupes (A, B, C et D) fondés sur leurs caractéristiques antigéniques et génétiques (Etteradossi et al. 1992, Juhasz and Easton 1994, Etteradossi et al. 1995, Seal 1998, Cook et al. 1999, Bayon-Auboyer et al. 2000, Toquin et al. 2000). De plus, les AMPV-C sont répartis en deux lignées, américaine et eurasiennne, définies selon leurs relatives proximité génétique et localisation géographique (Toquin et al. 2000, Brown et al. 2014). Suite à la mise en place de cette classification en sous-groupes et lignées, l'étude des génomes complets a révélé de plus amples similitudes entre les sous-groupes A, B et D d'une part, et entre les AMPV de sous-groupe C (AMPV-C) et les HMPV d'autre part (Toquin et al. 2003, Yunus et al. 2003, Brown et al. 2014) (Figure 2).

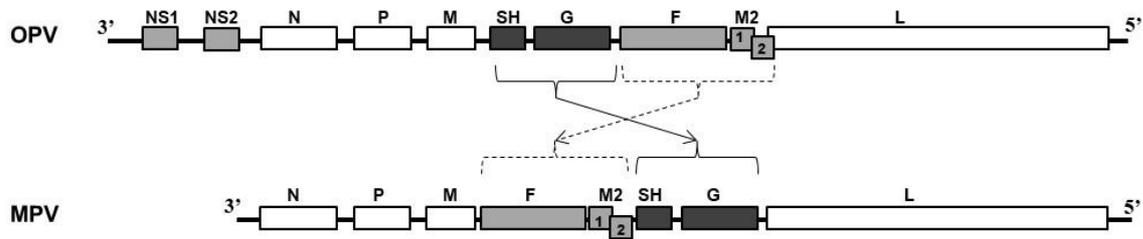


Figure 1 : Organisation génomique des membres de la famille *Pneumoviridae* dont font partie les *Orthopneumovirus* (OPV) et les *Metapneumovirus* (MPV). Les blocs formés des ORF SH-G et F-M2, dont l'organisation est typique à chacun des genres OPV et MPV sont représentés. Adaptée de Brown and Eterradossi 2018.

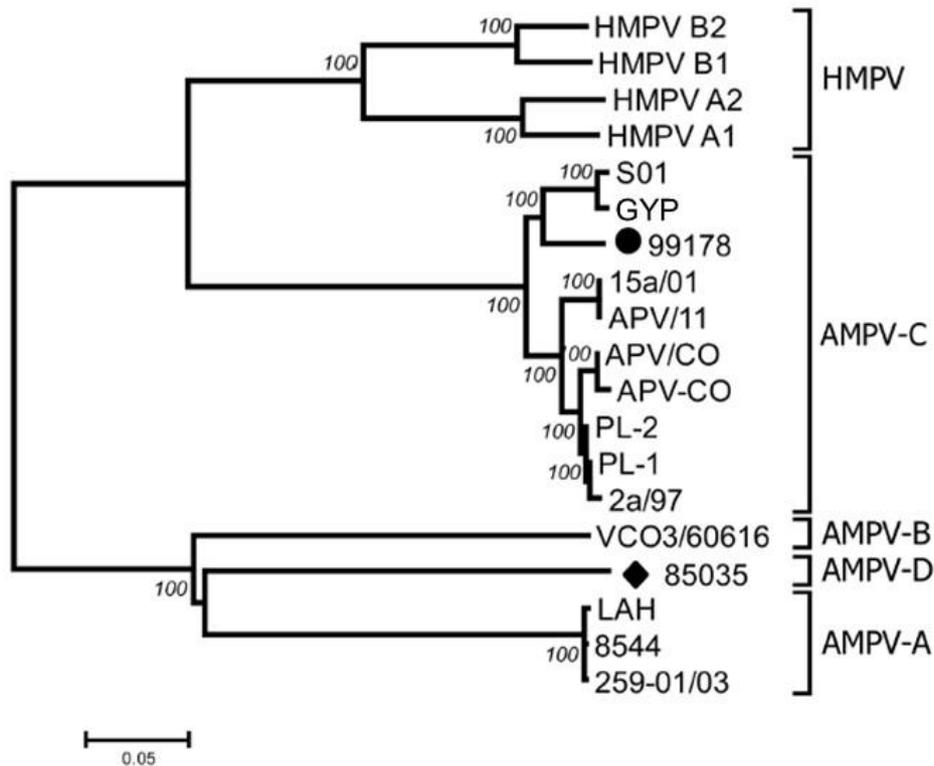


Figure 2 : Arbre phylogénétique réalisé selon la méthode de neighbor-joining à partir des séquences complètes des virus disponibles du genre *Metapneumovirus*. La robustesse de l'arbre présenté (Bootstrap) est indiquée au niveau de chaque embranchement en pourcentage de 1000 répétitions. Tirée de Brown et al. 2014.

2.2 Structure et morphologie du virion

La structure de la particule virale des AMPV a été observée pour la première fois en microscopie électronique à transmission dans les années 1986 (McDougall and Cook 1986). Les particules virales présentent une enveloppe pléomorphe pouvant aller jusqu'à 200 nm de diamètre pour les formes arrondies, 400-600 nm de diamètre pour les particules irrégulières et pouvant atteindre 1000 nm pour les formes filamenteuses (Figure 3) (Toquin 2009). L'enveloppe de la particule virale provient de la membrane cellulaire dans laquelle sont insérées les protéines de fusion (F), d'attachement (G) et la petite protéine hydrophobe (SH), ainsi que la protéine de matrice (M) qui tapisse la face interne de l'enveloppe virale (Collins and Gough 1988) (voir paragraphe 2.4.3).

Les particules de *Mononegavirales* renferment l'ARN viral associé à la nucléoprotéine (N) qui s'organise selon une structure hélicoïdale autour de celui-ci pour constituer la nucléocapside (NC) (Ruigrok et al. 2011) (Figure 3). Les particules virales contiennent également la phosphoprotéine (P) et la polymérase (L) virale (Collins and Karron 2013). La nucléocapside des AMPV mesure entre 13 et 15 nm de diamètre. L'organisation et la taille des particules virales sont conservées au sein du genre *Pneumoviridae* (Collins and Karron 2013).

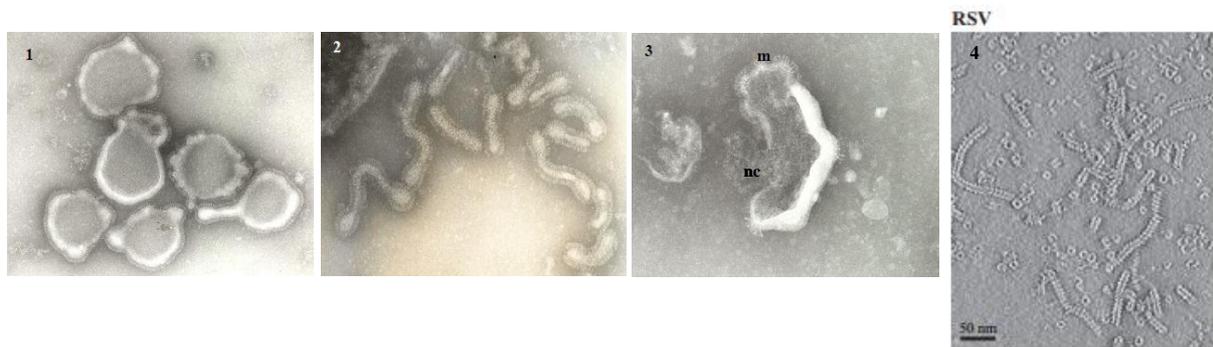


Figure 3 : Particules virales d'un AMPV-B observées en microscopie électronique à transmission 1) formes sphériques (x26000), 2) formes filamenteuses (x26000), 3) particule virale dont l'enveloppe (m) est rompue libérant la nucléocapside virale (NC) (x50000), 4) clichés de cryomicroscopie après coloration négative de la NC virale du virus respiratoire syncytial. Tirées de Toquin 2009 et Blocquel et al. 2012.

2.3 Organisation génomique

Le génome des *Metapneumovirus* se compose d'un ARN simple brin de polarité négative de 13-14 kb et comporte huit gènes en orientation 3'→5' : 3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5' (Figure 1). Cette organisation diffère de celle des *Orthopneumovirus* qui comportent 10 gènes 3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5'. L'ARN viral est flanqué d'une séquence « leader » en 3' et d'une séquence « trailer » en 5'. Les séquences leader et trailer présentent une complémentarité de séquence, leur appariement génère ainsi une structure reconnue par la polymérase virale qui est essentielle pour la transcription et la réplication du génome (Klumpp et al. 1997, Randhawa et al. 1997, Marriott et al. 2001, Fearn et al. 2002, Easton et al. 2004, Collins and Karron 2013). Les séquences leader et trailer des différents MPV sont conservées en termes de taille et de séquence (Marriott et al. 2001, Herfst et al. 2004, Brown et al. 2014), notamment entre les AMPV-C et les HMPV (79-85% d'identité). En effet, les extrémités des génomes d'AMPV-C et d'HMPV s'avèrent fonctionnellement interchangeables dans le cadre d'expériences faisant intervenir des mini-génomes (de Graaf et al. 2008) ou des génomes complets porteurs d'un gène rapporteur (Govindarajan et al. 2006) pouvant être pris en charge par un complexe de réplication dont les protéines appartiennent à un autre virus, dit hétérologue.

Chacun des huit gènes du génome des *Metapneumovirus* est flanqué en 3' et 5' des séquences consensus « gene start » (GS ayant pour consensus GGGACAAGT) et « gene end » (GE ayant pour consensus AGTTA(X_n)PolyA) (Yu et al. 1991, Ling et al. 1992, Yu et al. 1992, Brown et al. 2014). Ces séquences sont respectivement responsables de l'initiation et de l'arrêt de la transcription par la polymérase virale. Les séquences des GS et GE sont relativement conservées au sein des AMPV à l'exception de quelques différences nucléotidiques au niveau du gène L (Brown et al. 2014). L'arrêt de la transcription par le GE n'est pas systématiquement efficace, conduisant à la production d'ARN polycistroniques (Collins and Wertz 1983, Kuo et al. 1996, Alvarez and Seal 2005).

Des séquences intergéniques de taille variable (21-187 nt) séparent la séquence de polyadénylation du gène précédent de la séquence GS du gène suivant (Brown et al. 2014). Ces séquences ne sont que peu conservées entre les *Metapneumovirus* et entre les sous-groupes d'un même virus (Bukreyev et al. 2000, van den Hoogen et al. 2002, Moudy et al. 2004, Collins and Karron 2013, Brown et al. 2014).

2.4 Protéines des AMPV

Le génome des AMPV est composé de huit gènes contenant au total neuf cadres ouverts de lecture (ORF) dont deux chevauchants, codant pour un ensemble de neuf protéines. Ces protéines sont décrites ci-après en fonction de leurs rôles au sein du cycle viral.

2.4.1 Protéines du complexe de réplication

Le complexe de réplication regroupe quatre protéines virales (N, P, L et M2.1) s'associant directement ou indirectement à l'ARN viral pour constituer la ribonucléoprotéine (RNP) virale (Leyrat et al. 2014).

2.4.1.1 Nucléoprotéine (N)

Le premier gène présent à l'extrémité 3' du génome des *Metapneumovirus* code pour la Nucléoprotéine (N). N s'associe préférentiellement à l'ARN viral pour former la NC hélicoïdale, mais son expression en absence d'ARN viral la conduit à s'associer avec l'ARN cellulaire, reproduisant une structure identique à celle de la NC pour les *Rhabdoviridae* et les *Paramyxoviridae* (Ruigrok et al. 2011, Blocquel et al. 2012). La formation de la NC protège l'ARN viral des RNAses cellulaires (Iseni et al. 2000) et prévient sa détection par les senseurs intracellulaires de l'immunité (Chen et al. 2010). Les interactions de N avec l'ARN viral font intervenir à la fois les extrémités amino terminale (N-Ter) et carboxy terminale (C-Ter) de la protéine N et 7 nucléotides de l'ARN du RSV. Ce comportement peut être associé à l'ensemble des *Pneumoviridae* par homologies structurales de leur nucléoprotéine (Tawar et al. 2009). Une fois la protéine N associée à l'ARN viral, la structure en hélice formée fait intervenir des décamères de N associés à l'ARN viral pour l'HMPV (Renner et al. 2016). La formation des décamères de N autour de l'ARN viral est stabilisée par des interactions entre monomères de N faisant intervenir la région N-Ter de la protéine sans que celles-ci ne soient clairement établies (Cleveland et al. 2011, Renner et al. 2016) (Figure 4).

La protéine N interagit également avec la protéine virale P, avec laquelle elle se retrouve associée au sein d'inclusions cytoplasmiques. Des expériences de microscopie couplées à la technique du transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET) ont démontré suite à la co-expression de formes tronquées des protéines N et P que les 28 acides aminés (aa) localisés en N-Ter de N sont nécessaires au recrutement à la fois de P et de N au sein des inclusions, mais qu'ils ne sont par contre pas nécessaires pour que l'interaction entre P et N ait lieu. (Derdowski et al. 2008). Le domaine d'interaction N-P a été identifié en cristallographie, immunofluorescence et immunoprécipitation dans la région C-Ter de la protéine N de différentes *Mononegavirales* (Barr and Easton 1995, García-Barreno et al. 1996, Hengst and Kiefer 2000, Renner et al. 2016) dont des HMPV (Renner et al. 2016) (Figure 4).

La conservation de la protéine N en termes de taille et de composition en acides aminés est établie au sein du genre *Metapneumovirus*. Les sous-groupes d'AMPV-A, B et D codent une protéine N de 391 aa et les AMPV-C et HMPV codent pour une protéine N de 394 aa. La conservation est à hauteur de 70% d'identité amino peptidique entre l'ensemble des AMPV mais elle atteint 90% entre les AMPV-A, B et D et entre les AMPV-C et HMPV (Brown et al. 2014).

La conservation de N au sein des *Metapneumovirus* est un élément essentiel vérifié par l'utilisation de divers systèmes de génétique inverse au sein desquels différentes protéines N ont été échangées tout en conservant l'activité biologique de celle-ci pour le virus régénéré *in vitro*. Ces échanges ont fait intervenir la protéine N de l'AMPV-C pour la régénération de l'HMPV (Pham et al. 2005, de Graaf et al. 2008), ainsi que celle de l'AMPV-A et B pour la régénération de ces deux différents AMPV (Laconi et al. 2016). Par ailleurs, la conservation du gène codant la protéine N, alliée à son fort niveau d'expression (paragraphe 2.5.2), a permis la définition d'amorces et de sondes conservées permettant le diagnostic moléculaire de l'ensemble des sous-groupes d'AMPV (Bayon-Auboyer et al. 1999) mais également des différents *Metapneumovirus* (Lemaitre et al. 2018).

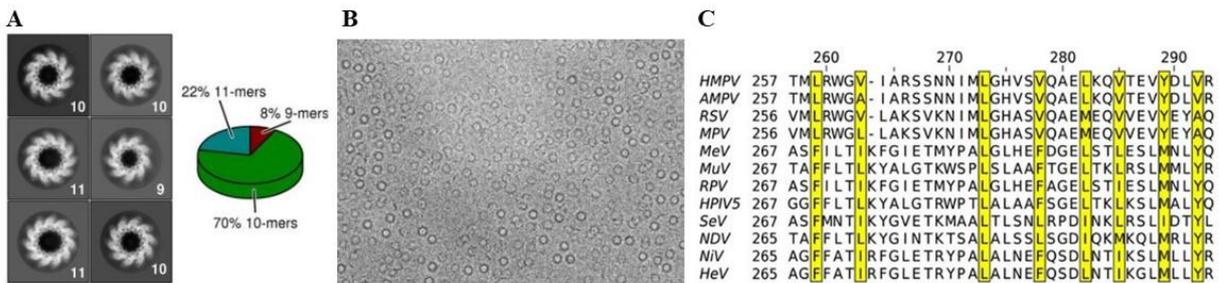


Figure 4 : Représentation des différents domaines d'interactions de N avec l'ARN et la protéine P. A) clichés de microscopie à super-résolution (2D-class averages) des anneaux formés de l'interaction N-ARN et représentation en diagramme circulaire des différentes populations d'oligomères N-ARN avec leur proportions respectives, B) clichés de microscopie électronique à transmission de complexe N-ARN de l'HMPV formant des anneaux, C) alignement de séquence du domaine C-Ter de N de membre des *Paramyxoviridae* et *Pneumoviridae*. Les résidus conservés du site de liaison de N avec P sont surlignés en jaunes. Adaptée de Renner et al. 2016.

2.4.1.2 Phosphoprotéine (P)

Le second ORF du génome des AMPV code pour la phosphoprotéine (P), qui se trouve sous des formes fortement phosphorylées dans les cellules, d'où son nom. La phosphoprotéine contient des domaines de liaisons aux protéines virales N, M2.1 et L (Leyrat et al. 2013, Renner et al. 2017) (Figure 5). Ces interactions lui permettent d'avoir un rôle de cofacteur réalisant le lien physique entre la NC et la protéine L et permettant la fonction des protéines virales M2.1 et L pour la réplication (Pereira et al. 2017). La protéine P des *Pneumoviridae* se retrouve active sous forme tétramérique par l'oligomérisation au niveau de résidus aminopeptidiques conservés (Castagne et al. 2004, Pereira et al. 2017, Renner et al. 2017) (Figure 5). Les régions N- et C-Ter de P contiennent les éléments de liaison à la protéine virale N (García-Barreno et al. 1996, Khattar et al. 2001, van den Hoogen et al. 2002, Easton et al. 2004, Renner et al. 2017). La séquence codant la région C-Ter de la protéine P est fortement conservée au sein des MPV, et il a été suggéré qu'elle pourrait coder un élément majeur responsable du maintien de l'intégrité de la nucléocapside virale suite à l'interaction P – N (Ling et al. 1995, Brown et al. 2014). Le domaine d'interaction entre P et L a été déterminé pour le RSV comme faisant également partie de la région C-Ter de P (Khattar et al. 2001). La présence de ces mêmes résidus conservés entre le RSV et les *Metapneumovirus* suggère fortement la région C-Ter des *Metapneumovirus* contiendrait par analogie elle aussi le domaine d'interaction entre P et L (Sourimant et al. 2015, Renner et al. 2017).

Dans la famille des *Pneumoviridae*, il a été trouvé que le niveau de phosphorylation de P conditionne aussi l'interaction de cette protéine avec la protéine M2.1. L'interaction entre les deux protéines se produit suite à la déphosphorylation de la Thréonine 108 de P du RSV (Tran et al. 2009). Cette modification de l'état de phosphorylation de P entraîne, par son interaction avec la protéine L, une augmentation de la processivité de la polymérase et facilite la production de copies antigénomiques de l'ARN viral suite à l'incorporation de la protéine M2.1 dans le complexe de réplication virale (Asenjo et al. 2008).

Les AMPV-A, B et D codent une protéine P de 278-279 aa alors que les AMPV-C et les HMPV codent une protéine P de 294 aa (Brown et al. 2014). Les protéines P des AMPV présentent 55% d'identité aminopeptidique entre elles avec notamment les AMPV-A, B et D ayant 72% d'identité entre eux. Les AMPV-C et HMPV quant à eux partagent 67% d'identité aminopeptidique contre seulement 55% d'identité avec le groupe précédent. Cette conservation aminopeptidique suggère que les AMPV-C sont plus proches des HMPV que des AMPV-A, B et D (Brown et al. 2014). La proximité génétique entre la protéine P des AMPV-A et B d'une part et celle des AMPV-C et HMPV d'autre part peut expliquer que les protéines P de ces virus puissent être échangées tout en conservant l'activité biologique de la protéine P *in vitro* et *in vivo* (Pham et al. 2005, Govindarajan et al. 2006, de Graaf et al. 2008, Laconi et al. 2016).

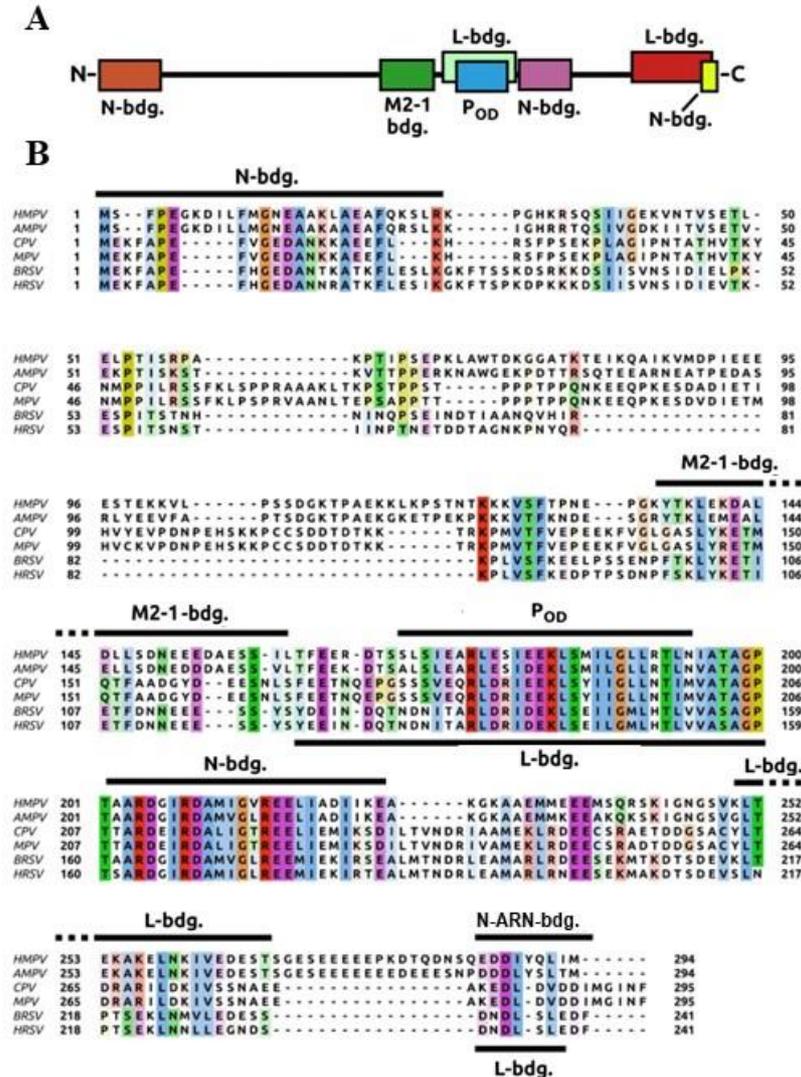


Figure 5 : Représentation schématique des différents domaines d'interactions de la protéine P des *Pneumoviridae*. A) Représentation des domaines fonctionnels de la protéine P de l'HMPV. Les domaines de liaison à N sont indiqués par une boîte marron, rose et jaune (N-bdg). Le domaine permettant l'oligomérisation de P en tétramères est indiqué par une boîte bleue (P_{OD}). Les domaines de liaisons à M2.1, L et N-ARN sont basés sur les homologies de séquence avec ceux du RSV (M2.1-bdg, L-bdg et N-ARN-bdg), B) alignement de séquence des protéines P des *Pneumoviridae* avec les annotations des régions fonctionnelles supposées en utilisant PROMALS3D et Jalview. Les régions fonctionnelles sont basées sur leurs homologies avec celles déjà décrites chez certains virus. Metapneumovirus humain et aviaire (HMPV et AMPV), Canine pneumonia virus (CPV), Murine pneumonia virus (MPV), Virus respiratoire syncytial bovin et humain (BRSV et HRSV). Adaptée de Renner et al. 2017.

2.4.1.3 Protéine M2 (M2)

Le gène M2 des *Pneumoviridae* est constitué de deux ORF chevauchants produisant deux protéines M2.1 et M2.2 (Collins et al. 1995). Ces protéines, bien que non essentielles pour l'accomplissement du cycle viral, influent sur l'efficacité de transcription et de réplication du génome viral *in vitro* et *in vivo* des AMPV (Easton et al. 2004, Ling et al. 2008).

2.4.1.3.a Protéine M2.1

L'ORF codant pour M2.1 produit une protéine retrouvée au niveau cytoplasmique associée à la RNP *in vitro* au sein de corps d'inclusion pour le RSV (Garcia et al. 1993).

M2.1 des *Metapneumovirus* est reconnue comme un facteur de transcription et d'anti-terminaison capable d'augmenter la processivité de la polymérase virale *in vitro* aboutissant à la production d'ARN antigénomiques complets (Fearn and Collins 1999, Buchholz et al. 2005). Ces ARN seront par la suite utilisés pour produire de nouveaux ARN génomiques viraux par le complexe de réplication virale (cf. chapitre 2.5.2). L'action de cette protéine permet au complexe de réplication virale de ne pas se dissocier de l'ARN viral lors de la lecture de la séquence GE présente en fin de chaque gène ce qui produit des ARN antigénomiques de plus en plus longs (Collins et al. 1995, Fearn and Collins 1999) jusqu'à la production d'une copie antigénomique complète de l'ARN viral. La protéine M2.1 n'apparaît pas essentielle à la réplication virale *in vitro* mais demeure essentielle pour sa réplication *in vivo*. L'utilisation d'un HMPV délété de sa séquence codante pour M2.1 (HMPV Δ M2.1) a permis lors de l'inoculation chez des hamsters de démontrer l'importance de cette protéine puisque sa perte entraîne une altération de l'infectiosité de l'HMPV Δ M2.1 chez cet hôte permissif pour l'HMPV (Buchholz et al. 2005).

Du fait de l'existence d'homologies de séquence et de structure au sein des *Pneumoviridae* entre le RSV et les *Metapneumovirus*, il a été proposé que l'extrémité C-Ter de la protéine M2.1 des MPV, contienne un domaine en hélice alpha responsable de l'interaction avec la protéine P, lui assurant sa fonction biologique lors de son interaction avec la RNP virale (Tran et al. 2009, Leyrat et al. 2014) (Figure 6). La région N-Ter quant à elle, forme une structure secondaire assimilée à un domaine de liaison au zinc « CCCH » par la présence de résidus cystéines et histidines conservés responsables de la liaison directe ou indirecte de la protéine M2.1 à l'ARN viral (Lai et al. 1999). L'absence du domaine de liaison au zinc de la protéine M2.1 réduit drastiquement la réplication et le pouvoir pathogène *in vivo* de l'HMPV (Cai et al. 2015). Cette région N-Ter présente une hélice alpha qui correspond au site d'oligomérisation de M2.1 permettant la formation de tétramères, nécessaire à l'activité biologique de M2.1 chez le RSV (Tanner et al. 2014) (Figure 6). La phosphorylation de cette protéine est requise pour assurer ses

fonctions sur la transcription virale et est un prérequis pour la réplication virale ainsi que la pathogénèse des HMPV *in vivo* (Cai et al. 2016).

La taille de la protéine M2.1 est variable en fonction des sous-groupes d'AMPV (AMPV-A et B 186 aa, C 184 aa et D 188 aa), mais demeure identique au sein des HMPV (187 aa). Malgré ces variations de taille, la protéine M2.1 est très conservée en termes d'identité aminopeptidique entre les différents AMPV (72%) et entre les AMPV-C et les HMPV (85%). La conservation de la séquence amino peptidique de M2.1 est cohérente avec le fait que cette protéine possède une fonction biologique importante dans l'établissement d'un cycle de transcription-réplication viral efficace (Brown et al. 2014). La conservation de M2.1 entre les AMPV-C et les HMPV rend possible l'échange de M2.1 au sein des complexes de réplication sans que leurs activités soient abolies pour la production de virus en génétique inverse (Govindarajan et al. 2006). Des expériences similaires ont établi une complémentarité fonctionnelle croisée entre les protéines M2 (dont M2.1) des AMPV-A et B pour la production de virus en génétique inverse (Laconi et al. 2016)

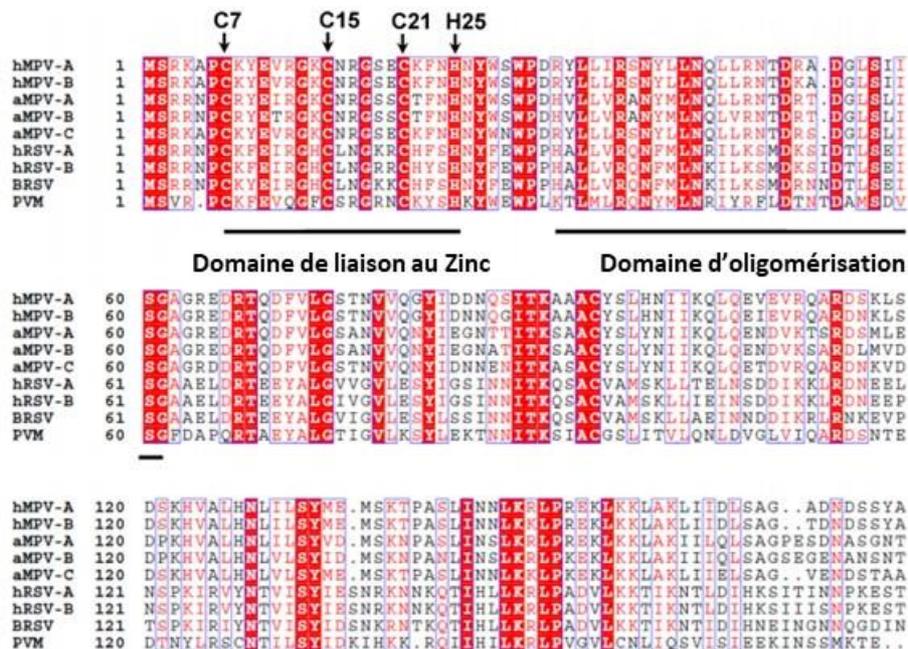


Figure 6 : Alignement des séquences des protéines M2.1 des *Pneumoviridae*. Les résidus conservés parmi l'ensemble des *Pneumoviridae* sont surlignés en rouge et les résidus pour lesquels une substitution a été observée sont écrits en rouge. Le domaine de liaison au Zinc (7 - 31) et celui d'oligomérisation (32 - 53) sont soulignés. Les résidus impliqués dans le domaine de liaison au Zinc (CCCH) sont indiqués par des flèches. Adaptée de Cai et al. 2015.

2.4.1.3.b Protéine M2.2

Le second ORF du gène M2 code pour la protéine M2.2 dont l'accumulation dans le cytoplasme de la cellule induit une diminution de la transcription d'ARNm viraux pour les *Pneumoviridae* (Ahmadian et al. 1999, Easton et al. 2004, Buchholz et al. 2005, Clubbe and Naylor 2011). La délétion de cette protéine en génétique inverse pour les AMPV-A et C de lignée américaine confirme que cette protéine n'est pas essentielle *in vitro* (Clubbe and Naylor 2011) mais suggère que cette protéine est requise pour avoir un niveau de réplication virale suffisant afin de maintenir la pathogénicité et l'immunogénicité de ces virus chez leur hôte naturel (dinde) (Ling et al. 2008, Yu et al. 2011). Un phénotype identique a été observé pour l'HMPVΔM2.2 *in vivo* chez des hamsters et des singes verts (Biacchesi et al. 2005, Buchholz et al. 2005, Schickli et al. 2008). De plus, une étude *in vitro* suggère que l'extrémité N-Ter (1-25 aa) de M2.2, via un domaine d'interaction avec d'autre protéine, porte l'activité de régulation de la transcription virale (Ren et al. 2012). Chez l'HMPV, cette protéine s'est également vue attribuer un rôle en lien avec l'évasion du système immunitaire inné en inhibant la voie de signalisation mitochondriale des MAVS (Mitochondrial antiviral-signaling protein) associée aux voies de signalisation de NFκB et du TNFα (Ren et al. 2012, Chen et al. 2016, Ren et al. 2017).

La protéine M2.2 des AMPV-A, B et D est composée de 73 aa, taille identique à celle des HMPV, les AMPV-C ont eux une protéine M2.2 plus courte (71 aa) (Brown et al. 2014). Les faibles pourcentages d'identités de séquence entre les AMPV (22%) mais aussi entre les AMPV-C et les HMPV (56%) indiquent une plasticité de la séquence M2.2 (Brown et al. 2014). Tout comme M2.1, cette protéine peut être échangée entre AMPV-A et B ainsi qu'entre AMPV-C et HMPV démontrant la proximité de protéine M2.2 de ces virus (Govindarajan et al. 2006, Laconi et al. 2016).

2.4.1.4 Polymérase (L)

Le dernier ORF commun à tous les *Mononegavirales* présente en 5' code pour la « Large Protein » (L). Cette protéine est localisée dans le cytoplasme des cellules infectées et constitue le support de la majorité des activités enzymatiques impliquées dans la transcription et la réplication virale la rendant essentielle pour l'accomplissement du cycle viral (Poch et al. 1990).

De par sa localisation en 5' sur le génome des *Mononegavirales*, c'est la protéine la plus faiblement exprimée (cf. chapitre 2.5.2). Les activités enzymatiques de L sont réparties en six domaines (noté I à VI) présents sur l'ensemble de sa séquence selon une distribution conservée chez l'ensemble des membres de l'ordre des *Mononegavirales* (Poch et al. 1990) (Figure 7).

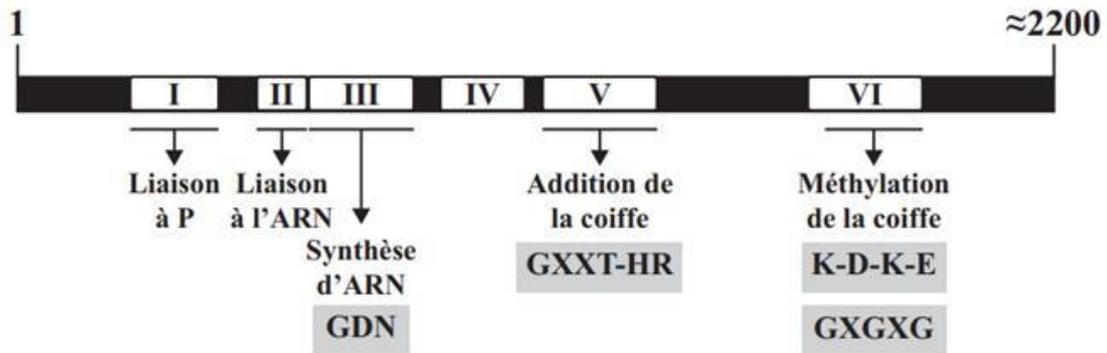


Figure 7 : Organisation modulaire de la protéine L des *Mononegavirales* représentant les domaines conservés (blanc) composant la protéine L, séparés par des régions variables (noir). Les motifs signature des activités de polymérisation de l'ARN (GDN), de la mise en place de la coiffe (GXXT-RH) et de sa méthylation (K-D-K-E et GXGXG) sont notés respectivement dans les domaines III, V et VI. Les domaines I et II, responsables de la liaison à P et à l'ARN, sont également indiqués. Les astérisques représentent les positions approximatives des régions charnières. Adaptée de Morin et al. 2012.

Le domaine I contient les éléments de liaison à la phosphoprotéine virale P (Chandrika et al. 1995, Cevik et al. 2004) qui sont essentiels au maintien de l'activité de L sur l'ARN viral. Le domaine II contient les éléments de liaison à l'ARN viral (Smallwood et al. 1999). Le domaine III présente 4 motifs reconnus comme essentiels à l'activité ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) de la protéine L (Poch et al. 1989, van den Hoogen et al. 2002). L'activité RdRp requiert l'interaction avec les protéines N et P pour être fonctionnelle (Hamaguchi et al. 1983, Pattnaik and Wertz 1990, Poch et al. 1990, Pattnaik and Wertz 1991, Horikami et al. 1992, Conzelmann and Schnell 1994). Le domaine IV n'a pas de fonction décrite à ce jour chez les *Mononegavirales*. Le domaine V porte l'activité poly-ribo-nucléotidyl-transférase (PRNTase) permettant la mise en place d'une coiffe à l'extrémité 5' de l'ARNm (Banerjee 1987, Barik 1993, Tekes et al. 2011). Le dernier domaine présent sur la protéine L, domaine VI, porte l'activité de méthyltransférase permettant la prise en charge des ARNm viraux par la machinerie de traduction cellulaire (Hammond and Lesnaw 1987, Ferron et al. 2002) ainsi que des activités de polyadénylation (Hunt et al. 1988) et phosphorylation (Svenda et al. 1997). L'activité méthyltransférase du domaine VI a notamment été identifiée comme une cible intéressante pour l'atténuation virale d'AMPV et la production de souches vaccinales (Sun et al. 2014).

En plus de ces domaines, la polymérase des *Pneumoviridae* contient un motif $K(X)_{21}GEGAGN(X)_{20}K$ qui correspond à un site de liaison à l'ATP déjà décrit chez d'autres virus (Fearn and Plemper 2017).

Afin d'exercer ces fonctions enzymatiques sur l'ARN viral, L doit nécessairement interagir avec la phosphoprotéine P pour pouvoir accéder à la nucléocapside virale (Renner et al. 2017) et *in fine* former la RNP ou complexe de réplication virale. Ce complexe, formé des protéines N, P, L et l'ARN viral, puis M2.1 de l'HMPV est schématiquement représenté en Figure 8.

La protéine L produite par les AMPV-A et B est de 2004 aa, pour les AMPV-C et les HMPV elle est de 2005 aa, et pour les AMPV-D de 2006 aa (Brown et al. 2014). Malgré sa taille conséquente, elle est particulièrement conservée entre les *Metapneumovirus* avec 64% d'identité de séquence entre tous les AMPV et 81% entre les AMPV-C et les HMPV (van den Hoogen et al. 2002, de Graaf et al. 2008, Brown et al. 2014).

La proximité génétique entre les protéines L des AMPV-A et B d'une part, et AMPV-C et des HMPV d'autre part a permis, lors d'échanges entre les protéines L de ces virus, de conserver le rôle biologique de la polymérase au sein d'une RNP hétérologue (Govindarajan et al. 2006, de Graaf et al. 2008, Laconi et al. 2016).

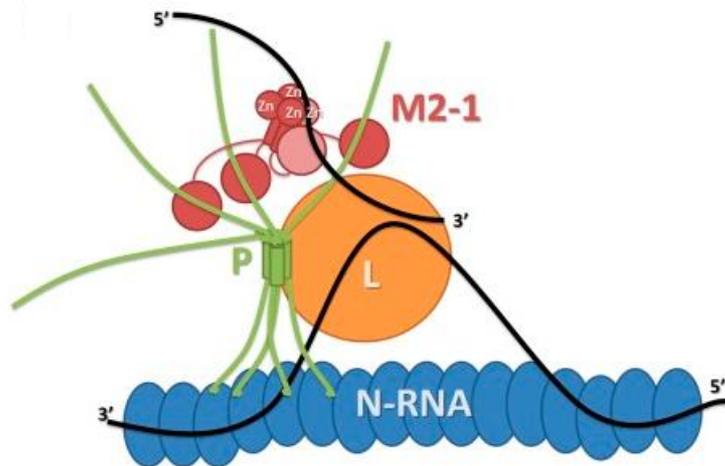


Figure 8 : Représentation schématique des interactions de l'ARN viral avec les protéines de la RNP de l'HMPV. La nucléoprotéine est représentée en bleu en association directe avec l'ARN viral en noir formant la NC (N-RNA). La phosphoprotéine (P) sous forme tétramérique en vert est associée avec la polymérase (L) en orange et la protéine M2-1 sous forme tétramérique en rouge avec son domaine de liaison au Zinc (Zn). Tirée de Leyrat et al. 2014.

2.4.2 Protéine de matrice (M)

Le troisième ORF présent sur le génome des AMPV code pour la protéine de matrice (M) qui est structurale. Cette protéine, sous forme de dimère, se fixe sur la partie intracellulaire de la membrane lipidique des cellules infectées (Easton et al. 2004) et est responsable de la morphologie de la particule virale (Sabo et al. 2011, Leyrat et al. 2014). La fixation de la protéine M se fait sur des sites enrichis en glycoprotéines virales facilitant l'interaction entre M et les extrémités cytoplasmiques des glycoprotéines F et/ou G (Ghildyal et al. 2002, Rodriguez et al. 2004). L'interaction entre M et les glycoprotéines virales est nécessaire afin d'obtenir la structure de la particule virale puisqu'en l'absence de ces glycoprotéines virales, M forme de longs filaments de morphologie différente (Leyrat et al. 2014). La présence d'ions calcium (Ca^{2+}) apparaît également essentielle afin d'assurer la stabilité et les fonctions biologiques de la protéine M dont font possiblement partie les phases d'entrée virale, d'assemblage et de bourgeonnement. Outre son rôle structural, la protéine M est un facteur essentiel de l'étape d'assemblage permettant l'incorporation de la NC à la particule virale. Sa perte abolit toutes nouvelles infections par altération de l'étape de bourgeonnement (Teng and Collins 1998). Chez les RSV, cette protéine interagit avec la RNP virale et abolit ses activités enzymatiques (Ghildyal et al. 2002). Cette étape est cruciale pour l'assemblage de nouveaux virions à la membrane cellulaire (Kaptur et al. 1991, Lenard 1996, Coronel et al. 2001). Plus récemment, il a été établi que l'interaction entre M et la nucléocapside se faisait par l'intervention de la protéine virale M2.1 et que ces interactions entre M et M2.1 dépendent des 110 aa à l'extrémité N-Ter de M (Li et al. 2008).

L'ORF codant la protéine M a une taille identique parmi les *Metapneumovirus* de 254 aa et de 256 aa pour le RSV, membre du genre *Orthopneumovirus*, autre membre de la famille des *Pneumoviridae*. Cette protéine se retrouve être très conservée au sein des AMPV avec 78-79% d'identité aminopeptidique. De plus, les AMPV-C et les HMPV partagent 87-88% d'identité (Brown et al. 2014). La présence d'un hexapeptide situé entre les résidus 14 et 19 (YTAAVQ), commun à tous les *Metapneumovirus* à l'exception de l'AMPV-C qui présente une mutation conservée V→I (YTAAIQ), est un élément indiquant l'importance de cette région sans qu'aucun rôle ne lui soit pour le moment attribué (van den Hoogen et al. 2002, Brown et al. 2014).

2.4.3 Glycoprotéines d'enveloppe

2.4.3.1 Protéine de fusion

Le quatrième ORF des MPV code pour la protéine de fusion (F). La protéine F est une glycoprotéine membranaire formant des trimères ancrés selon une orientation C-Ter intracellulaire et N-Ter extracellulaire définissant les glycoprotéines de type I (Dutch et al. 2000, Wen et al. 2012, Leyrat et al. 2014) (Figure 9). Le rôle biologique de F est d'assurer l'attachement, la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cytoplasmique et la pénétration de la NC virale dans la cellule cible. Dans le cas de l'HMPV, la protéine F interagit avec des intégrines cellulaires (heparan sulfate) présentes à la surface cellulaire afin de permettre la pénétration de la NC de la cellule cible (Schowalter et al. 2009, Chang et al. 2012). Chez le RSV, l'absence de séquence codante pour une protéine F fonctionnelle ne permet pas, dans le cadre d'essai en génétique inverse, la régénération de virus fonctionnels, suggérant que la protéine F est essentielle à l'accomplissement d'un cycle viral complet (Teng and Collins 1998).

La taille de la protéine F des AMPV-A, B et D est de 538 aa, 537 aa pour les AMPV-C et 539 aa pour les HMPV. La conservation de la séquence aminopeptidique atteint 72% pour les AMPV avec 81% d'identité entre l'AMPV-C et l'HMPV (Brown et al. 2014). Malgré leur proximité génétique, les protéines F des AMPV-C et des HMPV ne partagent pas la même activité fusogénique *in vitro* (de Graaf et al. 2009).

La glycoprotéine F présente un fort pouvoir immunogène et antigénique chez les diverses espèces cibles des *Metapneumovirus* (Yu et al. 1991, Tarpey et al. 2001, Tedcastle et al. 2014). Les variations observées entre les différentes protéines F des AMPV sont à mettre en parallèle de la spécificité des anticorps produits lors de l'infection des différents sous-groupe d'AMPV (Toquin et al. 2000, Brown et al. 2009). En effet, les anticorps dirigés contre les AMPV-A et B induisent des réactions croisées entre eux en ELISA alors que ces mêmes anticorps ne réagissent que faiblement avec les épitopes des AMPV-C (Eterradossi et al. 1992, Toquin et al. 2000, Brown et al. 2009). Toutefois on ne sait pas à l'heure actuelle comment les variations de séquence aminopeptidique observées dans F, par rapport à celles observées chez les autres protéines les plus variables telles que SH ou G, contribuent à la spécificité antigénique des AMPV.

La proximité génétique des protéines F d'AMPV-C et d'HMPV a permis, dans le cadre d'expériences croisées de complémentation en génétique inverse, de montrer que les activités d'attachement et de fusion de F pouvaient être restaurées au sein d'un fond génétique de l'HMPV par la protéine F d'un AMPV-C de lignée américaine. Cependant des différences de cinétiques de répllication ont été retrouvées lors de l'infection par ce virus chimérique de cellules de mammifères (Vero) et de cellules

aviaires (QT6), suggérant que la protéine F de ces virus est un des support du tropisme d'hôte des *Metapneumovirus in vitro* (de Graaf et al. 2009).

Suite à sa synthèse, F est localisée dans le cytoplasme sous la forme d'un précurseur inactif F0. Une fois dans l'appareil de Golgi, ce précurseur est clivé par des furines cellulaires en deux sous unités F1 et F2 liées par des ponts disulfures (Gonzalez-Reyes et al. 2001). Les protéines F des *Metapneumovirus* ont conservé la distribution des résidus cystéine impliqués dans la formation de ces ponts disulfures, 12 résidus dans F1 et 2 résidus dans F2 (van den Hoogen et al. 2002, Brown et al. 2014). Le site de clivage se trouve à une position conservée entre tous les *Metapneumovirus* (aa 99-102). Cependant la séquence du site de clivage n'est pas conservée entre tous les *Metapneumovirus*, mais se présente sous la forme R-X-X-R. Ainsi les sites présents pour les AMPV-A, B, C et D sont respectivement : RRRR, RKKR, RKAR et RQKR (Brown et al. 2014, Yun et al. 2015) (Figure 10). Les HMPV présentent quant à eux, un site de clivage RQSR qui est aussi reconnu par des furines cellulaires. Ce clivage de F0 est nécessaire pour l'acquisition du potentiel fusogène de la protéine F (Gonzalez-Reyes et al. 2001).

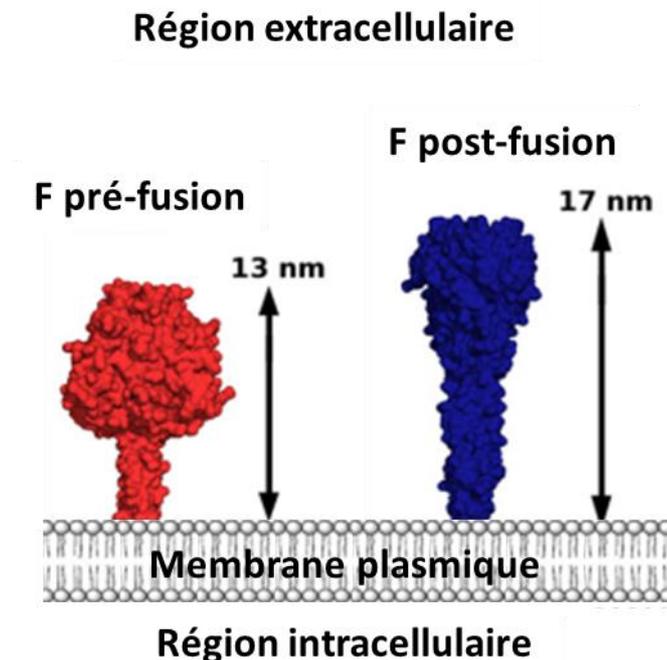


Figure 9 : Modèle de comparaison des domaines extracellulaire de la protéine F de l'HMPV pré et post fusion. Ces modèles ont été générés via le logiciel HOMER. Adaptée de Leyrat et al. 2014.

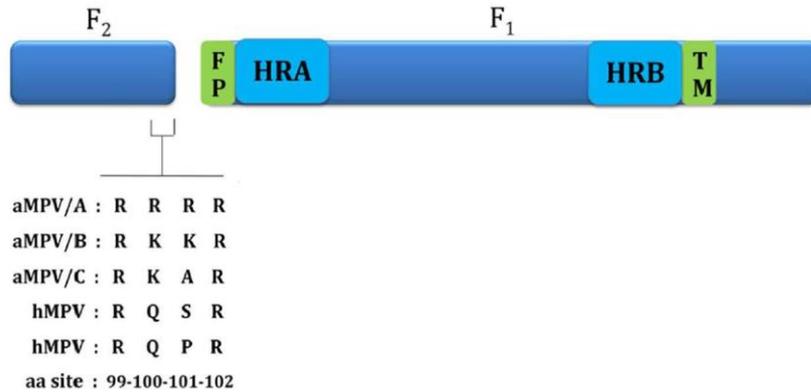


Figure 10 : Représentation schématique de la protéine F des AMPV avec la séquence du domaine de clivage RXXR. HRA et HRB, répétition d’heptade. Le peptide de fusion (FP) et le domaine transmembranaire (TM) sont indiqués par des carrés verts (Chambers et al. 1990). Adaptée de Yun et al. 2015.

2.4.3.1.a Sous-unité F1 (aa 103-538)

La sous unité F1 contient la partie transmembranaire et la partie C-Ter intra cytoplasmique de la protéine F. La région C-Ter de F1 joue un rôle lors de l’assemblage viral, fonction retrouvée chez divers *Paramyxoviridae* et *Pneumoviridae* au niveau des radeaux lipidiques de la membrane cytoplasmique (Dolganiuc et al. 2003, Chang et al. 2012) suite à l’interaction de la partie intra cytoplasmique de F avec la protéine M (Ghildyal et al. 2002, Rodriguez et al. 2004). L’extrémité N-Ter de F1 présente le peptide de fusion correspondant à une région hydrophobe (aa 103-125) qui est extrêmement conservé entre tous les *Metapneumovirus* avec une seule mutation pour l’AMPV-B (A115→T) (Gonzalez-Reyes et al. 2001, Brown et al. 2014) (Figure 10).

La sous unité F1 des *Pneumoviridae* porte les épitopes immunogéniques majeurs reconnus lors de l’infection permettant la production d’anticorps neutralisants (Brown et al. 2009, Wen et al. 2016).

2.4.3.1.b Sous-unité F2 (aa 1-98)

La sous-unité F2 des *Metapneumovirus* est impliquée dans la détermination du tropisme cellulaire de ces virus en modifiant l’activité fusogénique de la sous unité F1 *in vitro* (Schlender et al. 2003, de Graaf et al. 2009). La présence de deux résidus cystéine très conservés chez les *Metapneumovirus* – à l’exception d’une souche AMPV-C (AY579780) – indique que la sous unité F2 doit présenter une structure secondaire importante pour la fonction de F (Brown et al. 2014).

2.4.3.2 Protéine hydrophobe (SH)

La protéine SH des *Pneumoviridae* est une glycoprotéine de surface de type II (orientation N-Ter intracellulaire et C-Ter extracellulaire) dont la localisation a été déterminée lors de sa synthèse au niveau du réticulum endoplasmique du Golgi pour finalement être présentée à la surface des cellules (Deng et al. 2011). SH forme des oligomères (pentamère ou hexamère) à la surface des cellules en interagissant en grande partie via le domaine transmembranaire des monomères impliqués (Masante et al. 2014) (Figure 11). SH peut ainsi former des structures pouvant être assimilées à des viroporines pour le RSV (Carter et al. 2010) et l'HMPV (Tedcastle et al. 2014) correspondant à un canal ionique pouvant créer une perturbation de la perméabilité membranaire nécessaire à différentes étapes du cycle viral .

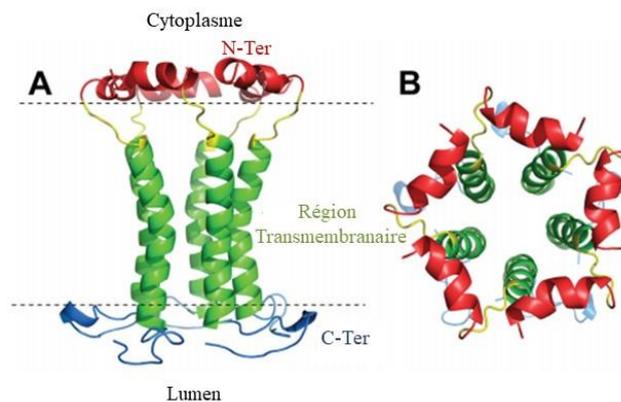


Figure 11 : Structure de la protéine SH du RSV sous forme pentamérique. Vue de profil (A) et du haut (B). L'orientation de la région N-Ter en rouge est intracytoplasmique et la région C-Ter en bleu est extracellulaire. Adaptée de Siok-Wan et al. 2011.

La protéine SH a été montrée chez les *Pneumoviridae* comme non essentielle à la réplication virale, la fusion avec la cellule hôte et l'assemblage de la particule virale *in vitro* (Karron et al. 1997, Naylor et al. 2004, de Graaf et al. 2013) et *in vivo* (Biacchesi et al. 2004, Biacchesi et al. 2005, Ling et al. 2008). Bien qu'elle soit non essentielle à la réplication des AMPV, la perte de cette protéine induit une légère diminution de la cinétique de réplication virale *in vitro*, en comparaison à un virus sauvage (Ling et al. 2008), et altère l'effet cytopathogène (ECP) viral sur cellules Vero en induisant la formation de syncytiums géants (Naylor et al. 2004, Ling et al. 2008) (Figure 12). Chez les HMPV, la protéine SH a été montrée comme ayant un rôle fondamental dans la régulation de l'activité fusogénique de la protéine F seule. En effet, l'expression de la protéine SH réduit d'environ 90% cette activité de fusion de F *in vitro* dans un contexte de co-expression de ces protéines par des plasmides transfectés (Masante et al.

2014). Il a aussi été démontré *in vitro* que la protéine SH de l'HMPV inhibe l'activité transcriptionnelle du facteur NFκB dont dépend la production de cytokine pro-inflammatoire TNFα (Bao et al. 2008) et l'activation de la voie de signalisation des interférons de type I via STAT1 (Hastings et al. 2016).

In vivo, un virus AMPV-A délété de SH a induit lors d'expérimentations animales chez des dindes, une séroconversion sans détection virale dans la trachée contrairement au virus sauvage (Ling et al. 2008). Cet élément suggère une possible modification du tropisme d'organe associée à la perte de SH. Ce phénomène pourrait aussi être dû à une altération de la capacité répliquative du virus *in vivo* suite à la perte de SH comme cela a déjà été décrit *in vitro*.

Les protéines SH du RSV et de l'HMPV sont fortement glycosylées (Biacchesi et al. 2005) et n'ont pas un fort pouvoir immunogène (Whitehead et al. 1999, Karger et al. 2001, Naylor et al. 2010, Tedcastle et al. 2014). Le rôle de SH des AMPV comme antigène reconnu par le système immunitaire humoral n'apparaît être que secondaire, mais chez la dinde les réponses sérologiques sont plus importantes lorsque SH est exprimée (Naylor et al. 2010). La perte de la protéine SH réduit les réactions croisées en ELISA entre les sous-groupes AMPV-A et B, indiquant que la présence ou l'expression de la protéine SH influent sur les réponses induites par d'autres épitopes viraux impliqués dans la spécificité antigénique des AMPV (Ling et al. 2008).

Chez les AMPV, la protéine SH est codée par un ORF de 175-180 aa avec 21% d'identité de séquence aminopeptidique entre les AMPV (Brown et al. 2014). Cette protéine est la plus conservée entre les AMPV-A, B et D avec 46% d'identité contre 21% d'identité entre les AMPV-A, B, C et D indiquant une plus grande divergence aminopeptidique entre les protéines SH des AMPV-C et celles autres AMPV. Cependant, la protéine SH des AMPV-C est plus proche de celles des HMPV avec 29% de conservation (Brown et al. 2014). Cette protéine est ainsi la seconde protéine la plus variable du génome des AMPV après la glycoprotéine G (cf. chapitre 2.4.3.3). La taille de la protéine SH codée par les AMPV est proche de celles des HMPV (177-183 aa) mais demeure bien plus importante que celle des *Orthopneumoviridae* (64-65 aa) (Fuentes et al. 2007).

Une complémentarité fonctionnelle entre les protéines SH des AMPV-A et B au sein du fond génétique de l'AMPV-A a été démontrée par la restauration du phénotype viral *in vitro* en comparaison avec l'AMPV-AΔSH (Ling et al. 2008) (Figure 12). La protéine SH d'un AMPV-C de lignée eurasienne n'a cependant pas permis de restaurer le phénotype sauvage, indiquant que la protéine SH de cet AMPV-C ne peut établir les mêmes interactions que la protéine SH des AMPV-A ou B, ou bien que la protéine SH de l'AMPV-C ne partage pas la même fonction que celle des AMPV-A et B. Cet élément corrobore une distance génétique plus importante entre les AMPV-C et les AMPV-A et B (Ling et al. 2008).

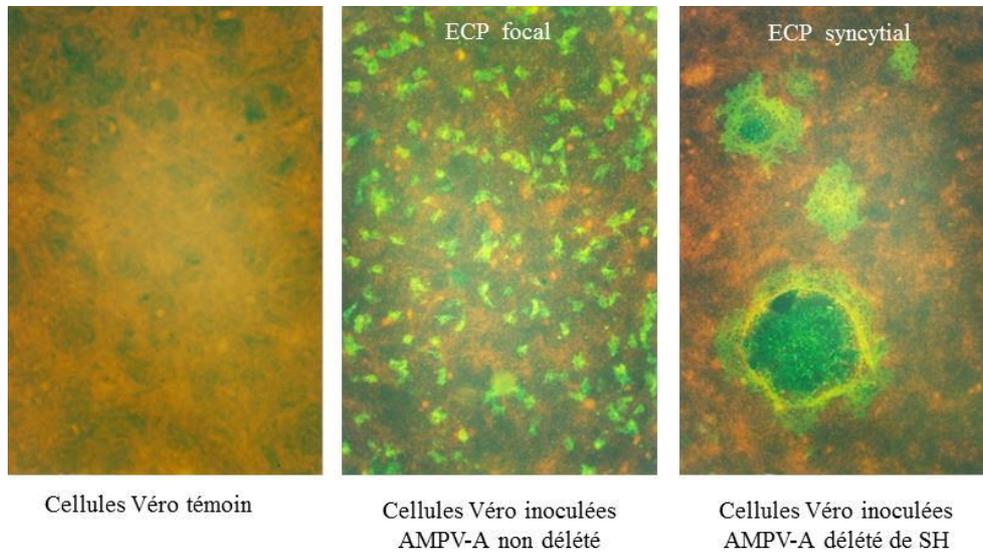


Figure 12 : Effets de la perte de SH sur le phénotype d'un AMPV-A *in vitro*. Photo d'immunofluorescence avec contre coloration au bleu d'Evans de cellules de mammifères (Vero), de gauche à droite, non infectées, infectées par un AMPV-A, infectées par un AMPV-A Δ SH. Tirée de Toquin 2009.

2.4.3.3 Glycoprotéine de surface (G)

La glycoprotéine G des AMPV est une protéine membranaire de type II ayant un profil d'hydrophobicité commun entre les *Pneumoviridae* (Olmsted et al. 1989, van den Hoogen et al. 2002, Liu et al. 2007). Cette protéine est prédite comme O-glycosylée (Toquin et al. 2003, Govindarajan et al. 2004, Leyrat et al. 2014) et possédant cinq potentiels sites de N-glycosylation (Toquin et al. 2003).

Par analogie avec la glycoprotéine G du RSV (Juhász and Easton 1994, Lwamba et al. 2005), la protéine G de l'AMPV pourrait avoir un rôle important dans les étapes précoces du cycle viral dont l'attachement aux glycosaminoglycanes (GaG) des cellules cibles (Easton et al. 2004, Biacchesi et al. 2005, Thammawat et al. 2008, Loo et al. 2013), bien que la protéine F soit à elle seule suffisante aux étapes d'attachement et de fusion de la particule virale à sa cellule cible *in vivo* et *in vitro* (Biacchesi et al. 2004, Govindarajan et al. 2010, Cox et al. 2012).

La protéine G de l'HMPV intervient dans la production de particules virales car elle permet la formation de « virus like particule (VLP) » même si cette capacité est décuplée par l'interaction de G avec les protéines virales F et M (Loo et al. 2013).

La perte d'une partie de la séquence codante pour la protéine G, lors de passage en série sur lignée cellulaire ou en génétique inverse, n'altère pas le phénotype *in vitro* des *Pneumoviridae* (Karron et al. 1997, Biacchesi et al. 2004, Kong et al. 2008, Govindarajan et al. 2010). Ces résultats suggèrent que l'intégrité de la protéine G n'est pas essentielle à l'accomplissement du cycle viral *in vitro*. L'utilisation de systèmes de génétique inverse a permis, lors de délétion de la protéine G, de montrer que cette protéine n'est pas requise pour les étapes d'attachement et de fusion à la membrane des cellules cibles pour l'HMPV (Biacchesi et al. 2004) et l'AMPV-C (Govindarajan et al. 2010). Cependant, la perte de cette protéine chez un AMPV-C induit une atténuation du pouvoir pathogène chez des dindes ainsi qu'une faible réponse immunitaire à l'encontre de l'AMPV-C Δ G inoculé (Govindarajan et al. 2010). De plus, il a été démontré qu'*in vitro*, la protéine G de l'HMPV inhibe l'activation de la voie interféron (Bao et al. 2008, Banos-Lara Mdel et al. 2015). A l'inverse, un AMPV-C doté d'un ORF G plus long de 1015 nts a été identifié chez des oies sauvages (Bennett et al. 2005), dans un contexte expérimental, ce virus n'est pas pathogène mais reste immunogène chez la dinde (Yu et al. 2010). D'autres observations relatent qu'un AMPV-C de lignée eurasienne pathogène pour les canards domestiques possédant un gène G « long » est non pathogène chez les dindes indiquant que différents spectres d'hôtes existent au sein des AMPV-C (Toquin et al. 2006). La protéine G de l'HMPV seule, n'est que faiblement immunogène et n'élicite pas d'anticorps neutralisant (Biacchesi et al. 2004, Skiadopoulos et al. 2006, Ryder et al. 2010, Tedcastle et al. 2014).

La séquence codant pour la protéine G des AMPV présente la plus grande variabilité en termes de taille, comprise entre 251 et 585 aa (Brown et al. 2014), et d'identité de séquence (Toquin et al. 2003, Govindarajan et al. 2004, Kong et al. 2008, Velayudhan et al. 2008). La faible conservation de la séquence aminopeptidique de G au sein des AMPV en fait la protéine la plus variable du génome des AMPV avec seulement 18% d'identité aminopeptidique au sein des AMPV (Brown et al. 2014).

2.5 Cycle viral

Compte tenu de la position taxonomique des AMPV, leur cycle viral devrait être similaire à celui décrit chez les autres *Pneumoviridae* (HMPV et RSV) (Easton et al. 2004, Schildgen et al. 2011) (Figure 13 et Tableau 1). Ce cycle viral comprend les étapes successives classiques d'attachement et d'entrée virale, de transcription – réplication – traduction, d'assemblage et de bourgeonnement. Cette dernière phase peut potentiellement, comme proposé pour l'HMPV et par l'action de la protéine P, prendre la forme d'une extension de la membrane de la cellule infectée pour établir un lien physique avec une autre cellule (El Najjar et al. 2016).

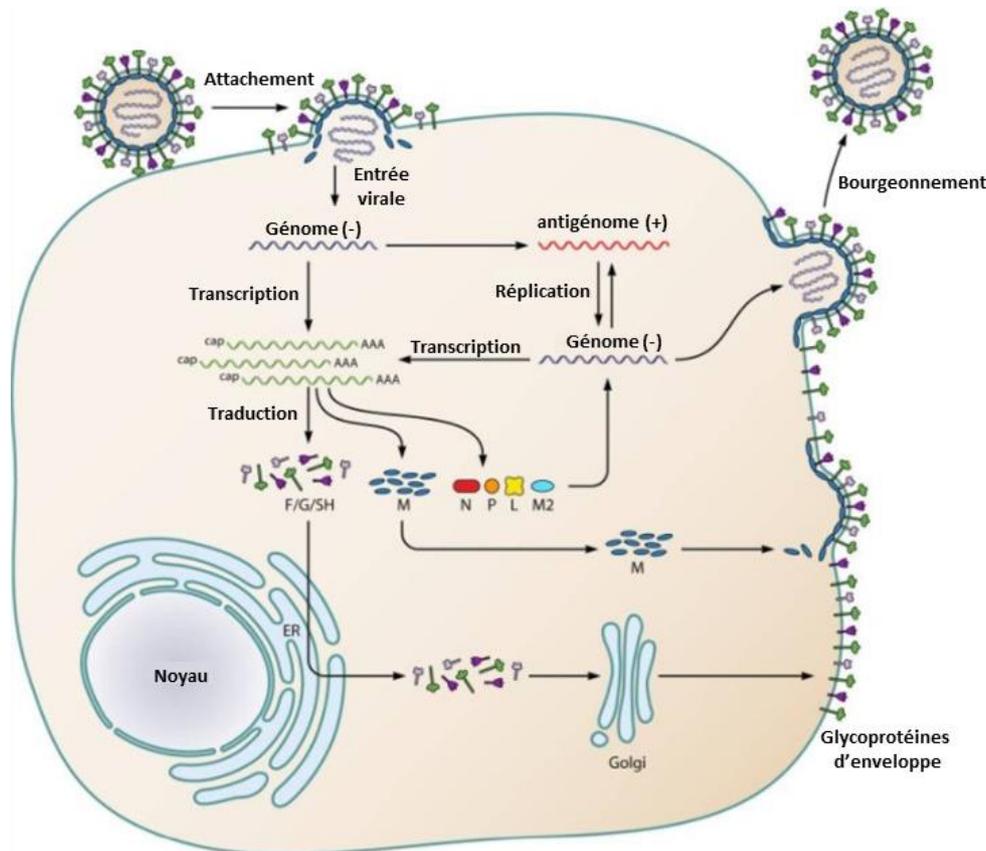


Figure 13 : Représentation schématique du cycle viral de l'HMPV s'appliquant aussi pour les AMPV. Après l'attachement du virion à la membrane cellulaire, l'enveloppe virale fusionne avec la membrane cellulaire libérant la RNP dans le cytoplasme. Après la transcription du génome viral, il y a production d'un antigénome complet qui est alors utilisé comme matrice pour la réplication virale. Cette matrice permet la production de nouvelles copies du génome viral qui sont ensuite encapsidés dans de nouveaux virions. Après traductions des ARN des gènes M, F, SH et G, ces protéines vont migrer à la membrane cellulaire via le réticulum endoplasmique (ER) et l'appareil de Golgi. Finalement, les nouvelles particules virales sont libérées par bourgeonnement à la membrane. Adaptée de Schildgen et al. 2011.

Tableau 1 : Caractéristiques des 9 protéines virales identifiées chez les AMPV.

Gène	Protéine	Taille (acide aminé)	Fonction
N	Nucleoprotéine	391-394	Encapsidation de l'ARN
P	Phosphoprotéine	278-294	Cofacteur de la polymérase
M	Protéine de matrice	254	Assemblage de la particule et bourgeonnement
F	Protéine de fusion	537-538	Attachement et fusion
M2	Protéine M2.1	184-188	Facteur de processivité / anti terminaison
	Protéine M2.2	71-73	Régulation de cycle de transcription/réplication de l'ARN
SH	Protéine hydrophobe	175-180	Rôle inconnu (structure = Viroporine)
G	Glycoprotéine de surface	251-585	Attachement à la membrane de la cellule cible
L	Polymérase	2004-2006	Activité catalytique pour la transcription/réplication virale

2.5.1 Attachement et entrée virale

Les glycoprotéines de surface F et G sont toutes les deux impliquées dans l'étape d'attachement à la membrane de la cellule cible. A ce jour, aucun récepteur cellulaire n'a été isolé comme cible préférentielle des AMPV alors que pour les HMPV l'attachement fait intervenir des héparanes sulfates cellulaires (Chang et al. 2012) et des glycosaminoglycanes (Loo et al. 2013). A elle seule la protéine F est suffisante pour l'étape d'attachement mais, en l'absence de G, l'efficacité d'attachement à la membrane est fortement impactée (Teng and Collins 1998).

Suite à cet attachement, la particule virale fusionne son enveloppe avec la membrane de la cellule cible et libère ainsi la NC ainsi que les protéines virales présentes au sein de la particule (P et L) dans le cytoplasme de la cellule. Cette fusion est possible par l'action de la protéine F (Biacchesi et al. 2004, Govindarajan et al. 2010, Cox et al. 2012) et se produit indépendamment d'une endocytose clathrine dépendante (Paudel and Shin 2015, Yun et al. 2016). Une fois l'ensemble de ces éléments présent dans le cytoplasme, le virus entre dans son cycle de transcription/ réplication suite à la formation de la RNP (ARN – N, P, L et M2.1).

2.5.2 Transcription

La transcription des AMPV suit le modèle de transcription commun à tous les virus du genre *Mononegavirales* et se déroule dans le cytoplasme (Cowton et al. 2006, Blocquel et al. 2012, Fearn and Plemper 2017), à l'exception des *Bornaviridae* pour lesquels la transcription s'effectue dans le compartiment nucléaire (Briese et al. 1992, Cubitt and de la Torre 1994). La polymérase virale se

positionne sur la séquence leader en 3' du génome viral se déplace le long de l'ARN génomique jusqu'à reconnaître une séquence d'initiation de la transcription (GS) du gène N, premier des 8 gènes des AMPV en position 3' (Figure 1). La transcription du gène s'effectue jusqu'à la reconnaissance du signal de terminaison de transcription (GE). Une fois que la séquence GE est atteinte, la polymérase peut, soit se dissocier de l'ARN génomique matrice, soit continuer sur celui-ci jusqu'au prochain signal GS en amont du prochain gène à transcrire. Dans le premier cas, la polymérase va alors réinitier la transcription du génome viral en repartant du leader situé en 3'. Dans le second cas, la polymérase synthétise le second gène présent sur la séquence d'ARN matrice. A la fin de ce second gène, la polymérase peut encore une fois se dissocier et réinitier la transcription au leader ou continuer et transcrire les gènes suivants. La capacité de la polymérase à réinitier au leader ou à continuer sur la séquence matrice implique une production plus importante d'ARNm des gènes proches du leader en 3' et une production moindre des gènes en position 5' du génome viral. Cette production en gradient des différents gènes est conservée chez tous les virus du genre *Mononegavirales* (Kreml et al. 2002, Blocquel et al. 2012).

Le gradient d'ARNm va induire un gradient de protéines virales produites. Ainsi, les protéines virales situées à proximité de l'extrémité 3' du génome viral s'accumulent dans le cytoplasme. Parmi ces protéines il y a M2.1 qui va agir comme un facteur d'élongation et d'anti terminaison et ainsi augmenter la processivité de la polymérase virale. Par conséquent la polymérase virale va être capable de continuer la synthèse d'ARN de polarité positif sans tenir compte des GE. *In fine*, ce mécanisme induit la production par la polymérase virale d'une copie antigénomique de polarité positive du génome viral. La copie antigénomique virale sera ensuite utilisée comme matrice pour la polymérase virale lors de la phase répllicative.

2.5.3 Réplication

L'antigénome viral est la matrice nécessaire à l'étape de réplication. L'ARN antigénomique de polarité positive présente en son extrémité 3' une copie antisens de la séquence permettant l'initiation de la transcription contenue dans le leader du génome de polarité négative. Lorsque le complexe de réplication viral se fixe à la séquence d'initiation situé en 3' de l'antigénome viral, il y a production de copies d'ARN génomiques virales de polarité négative. Ces ARN nouvellement produits sont aussitôt complexés avec les nucléoprotéines virales formant des NC ainsi qu'avec la polymérase et la phosphoprotéine formant des RNP. Les nouvelles RNP servent alors de matrice pour la transcription virale ou sont transportées jusqu'à la membrane cellulaire pour être encapsidées dans une nouvelle particule virale et bourgeonner.

2.5.4 Assemblage et bourgeonnement

Les RNP présentes dans le cytoplasme vont s'associer avec des molécules de la protéine M présentes sur la face interne de la membrane plasmique. Les interactions entre le complexe M – NC et glycoprotéines de surface virales (F, G, SH) (Easton et al. 2004) se trouvant en proportion plus importante au niveau des radeaux lipidiques (Chang et al. 2012) va permettre le bourgeonnement à partir de la membrane de la cellule infectée de nouvelles particules virales qui vont alors pouvoir infecter de nouvelles cellules.

2.6 Cibles de l'infection par un AMPV

Les AMPV sont très contagieux et ciblent tout particulièrement le système respiratoire supérieur (sinus, trachée) et inférieur (bronche, poumon) (Andral et al. 1985, Cook et al. 1999) de diverses espèces d'oiseaux dont notamment des espèces d'élevages telles que dindes, poulets et canards (Buys and Du Prees 1980, Picault et al. 1987, Toquin et al. 1999). Les AMPV sont également associés à des infections du tractus génital (épithélium de l'oviducte) des dindes, poulet et canards (Jones et al. 1988, Cook et al. 1996, Khehra and Jones 1999, Sun et al. 2014). D'autre part, dans l'avifaune sauvage, différentes campagnes de récolte d'échantillon ont permis de retrouver des AMPV au niveau de l'appareil respiratoire des animaux écuvillonnés (Jones et al. 1988, Shin et al. 2000, Turpin et al. 2008, Jardine et al. 2018).

Les AMPV se répliquent sur de nombreuses lignées cellulaires adhérentes de mammifères et d'oiseaux (Tiwari et al. 2006). Les lignées les plus communément utilisées pour propager les AMPV sont issues de cellules épithéliales de reins de primates (BSC-1, Vero) (Giraud et al. 1986, Giraud et al. 1987) ou des cellules musculaires de cailles QT-35 (Goyal et al. 2000). Nous pouvons également citer les cellules rénales de hamster (BSRT7) et les cellules primaires de fibroblastes d'embryon de poulet (Grant et al. 1987, Williams et al. 1991). Sur ces cellules, les lésions induites par les AMPV correspondent à une destruction du tapis cellulaire voire à la formation de syncytiums correspondant à de grandes cellules multinucléées, cela étant illustré en Figure 14 sur des cellules Vero.

Des cultures d'anneaux de trachées (TOC) d'embryons de dindes, poulets et canards maintenues en survie *ex vivo* ont été utilisées (Cook 2000, Toquin et al. 2006) et permettent la mise en évidence de l'effet ciliostatique des AMPV à l'exception de l'AMPV-C souche américaine lorsqu'elle est étudiée sur anneaux de trachées de poulet (Cook et al. 1999). L'inconvénient des TOC est leur difficulté de préparation, leur durée de survie limitée et le fait que les AMPV s'y répliquent à faible titre. Une contrainte similaire apparaît également lors de l'inoculation par voie intra-vitelline d'œufs embryonnés de dindes et poulets (Alexander et al. 1986).

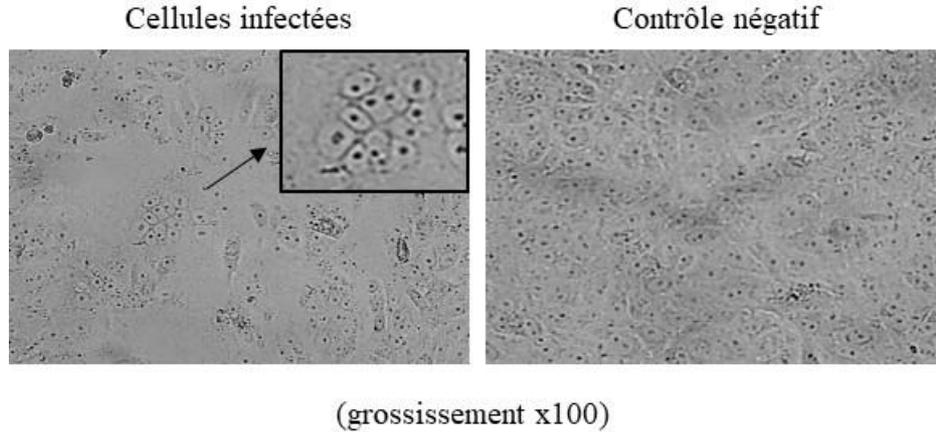


Figure 14 : Effet cytopathogène (ECP) causés par l'infection de cellules Vero avec l'AMPV-C de lignée eurasiennne. Observation en microscopie optique en lumière blanche. Les régions indiquées par les flèches correspondent à la présence de cellules multinucléées. Adaptée de Szerman et al. (2019).

2.7 Propriétés physicochimiques

Les AMPV possédant une enveloppe, ils sont donc sensibles à certains traitements physicochimiques induisant une perméabilisation ou déstructuration de leur enveloppe comme par exemple l'action de détergents ou les contraintes mécaniques liées à des procédés de séchage (Jones 1996, Firquet et al. 2014, Firquet et al. 2015).

Au niveau de leur thermo-sensibilité, un AMPV-B perd tout pouvoir infectieux après 26 semaines à 4°C ou 15 minutes à 56°C. Un AMPV-C isolé en Amérique du Nord s'est montré plus sensible à la température que l'AMPV-B avec une perte de pouvoir infectieux après 12 semaines à +4°C, 4 semaines à +20°C, 2 jours à +37°C et 6 heures à +50°C (Townsend et al. 2000, Toquin 2009). D'autres études confirment que les AMPV sont inactivés après 30 minutes à 56°C (Collins et al. 1986). Au niveau sensibilité aux variations de pH, un AMPV-B perd tout pouvoir infectieux après 4 heures suite à l'exposition à 4°C avec des pH de valeurs extrêmes (pH < 5 ou pH > 9) (Toquin 2009) tandis que l'AMPV-C de lignée américaine conserve son pouvoir infectieux après 1 heure d'exposition a des pH de 4.5 et de 9 (Townsend et al. 2000).

L'action de solvants sur les virus enveloppés, dont les AMPV font partie, se traduit par la destruction des structures présentes sur les surfaces lipidiques des virus (McDonnell 2006). L'inactivation des AMPV a été précédemment obtenue avec de l'éthanol, du chloroforme et du diéthyl-ether à température ambiante après 12 heures de contact (Toquin 2009).

Les désinfectants comme par exemple l'eau de Javel (hypochlorite de sodium) ont une action supposée sur l'oxydation des acides aminées et des nucléotides par la présence de leurs ions chlorures. Les désinfectants réduisent ainsi drastiquement le pouvoir infectieux des virus (Rusin P. 2001, Gough and Jones 2008). Concernant les AMPV et plus précisément l'AMPV-C, l'action de désinfectant a abouti à des résultats variables en fonction des concentrations et des temps de contact testés (Patnayak et al. 2008).

3. Maladies causées par les AMPV

3.1 Espèces cibles

Les AMPV ont été retrouvés et reconnus comme pathogènes chez diverses espèces d'oiseaux d'élevage dont des dindes (Buys and Du Prees 1980), poulets (Buys et al. 1989) canards (Toquin et al. 1999) pintades (Gough et al. 1988, Litjens et al. 1989, Cook and Cavanagh 2002) et des faisans (Gough et al. 2001). L'AMPV-C est le sous-groupe d'AMPV retrouvé chez le plus vaste panel d'espèces d'élevage sur les continents Eurasiens et Américains avec des dindes (Kleven 1997, Senne et al. 1997), canards (Toquin et al. 2006, Sun et al. 2014), poulets (Picault et al. 1987, Wei et al. 2013) et des faisans (Lee et al. 2007). Chez les dindes, l'infection par un AMPV se produit quel que soit l'âge de l'animal (McDougall and Cook 1986), mais les symptômes observés sont plus importants quand l'infection intervient dans les toutes premières semaines de la vie des volailles.

Dans l'avifaune sauvage, des cas de détection d'AMPV par des techniques de sérologie sans que les virus ne soient détectés par les techniques de biologie moléculaire ou d'isolement *in vitro* (Bennett et al. 2002, Bennett et al. 2004, Turpin et al. 2008). Parmi l'avifaune sauvage l'autruche (Cadman et al. 1994), l'hirondelle, le goéland (Heffels-Redman 1998), la corneille américaine, le héron garde-bœufs, le pigeon bizet, l'oie et le moineau ont été infectés par des AMPV. Les oiseaux sauvages sont notamment suspectés d'être impliqués dans la contamination des élevages de volailles en Amérique du Nord (Shin et al. 2000, Turpin et al. 2008, Cha et al. 2013).

Les données fournies par la littérature (1980 – 2013) montrent que l'étude du spectre d'hôte des différents sous-groupes d'AMPV au sein des espèces d'élevage principalement infectées n'a jamais été intégralement effectuée. Historiquement, les dindes apparaissent comme l'espèce la plus sensible à l'infection par les AMPV puisque des AMPV des quatre sous-groupes (A, B, C de lignées américaine et D) ont été reconnus pathogènes chez cette espèce. Les poulets ont été rapportés comme sensibles à l'infection par les AMPV-A, B et C de lignée eurasienne. Quant aux canards, ceux-ci semblent n'être sensibles qu'à l'infection par des AMPV-C (Cf Tableau 3, page 74). Ces études, ne retraçant que les espèces chez lesquelles les virus ont été isolés, elles n'apportent pas d'informations concernant la capacité des AMPV à infecter chacune de ces trois espèces. Cependant, diverses données provenant de nombreuses études expérimentales permettent d'enrichir les connaissances sur le spectre d'hôte des AMPV avec notamment : la séroconversion de dindes infectées par un AMPV-C de lignée eurasienne (Toquin et al. 2006), la séroconversion de poulets infectés par un AMPV-C de lignée américaine (Cook et al. 1999), la séroconversion et l'isolement viral possible à partir de canards infectés par l'AMPV-C de lignée américaine (Shin et al. 2000, Toquin et al. 2006).

3.2 Distribution géographique et impact économique

Tous les principaux pays producteurs de volailles à l'exception de l'Australie ont rapporté des cas d'infections par au moins un AMPV (Cook 2000) (Figure 15). La première observation d'un AMPV a été réalisée en Afrique du Sud en 1978 chez des dindes (Buys and Du Prees 1980). Les AMPV ont par la suite été retrouvés chez des poulets toujours en Afrique du Sud (Buys and Du Prees 1980, Buys et al. 1989) et puis en Europe dès 1981 chez des dindes (Andral et al. 1985). Sur le continent européen, le Royaume-Uni (O'Brien 1985, McDougall and Cook 1986), la France (Giraud et al. 1986), l'Italie (Fabris and D'aprile 1990), l'Allemagne (Hafez 1987, Naylor and Jones 1993), la Belgique (Van de Zande et al. 1998), l'Espagne, l'Ukraine, la Roumanie (Franzo et al. 2017) et la Hongrie (Juhasz and Easton 1994) ont rapporté dans des élevages de volailles, des cas de rhinotrachéites et de syndrome infectieux de gonflement de la tête (SHS) associés à l'infection respectivement des dindes et des poulets par un AMPV. Le continent américain n'a été affecté par les AMPV que plus tardivement avec une première observation d'un AMPV en 1996 aux États-Unis (Kleven 1997, Senne et al. 1997). Par la suite le Brésil (Dani et al. 1999) et le Mexique (Rivera-Benitez et al. 2014) ont eux aussi rapporté des cas d'infections de volailles d'élevages par des AMPV.

Les AMPV ont aussi été mis en évidence en Asie, en Afrique et au Moyen Orient avec l'observation d'AMPV en Corée (Kwon et al. 2010), en Chine, au Nigéria (Owoade et al. 2008), au Japon (Tanaka et al. 1995, Mase et al. 2003), en Russie, en Iran (Franzo et al. 2017), en Israël (Weisman et al. 1988), en Turquie (Ongor et al. 2010), en Egypte (Abdel-Azeem et al. 2014) et en Jordanie (Gharaibeh and Algharaibeh 2007).

La mise en évidence de la présence d'AMPV a été très largement faite via des tests sérologiques (Cook and Cavanagh 2002) et par détection moléculaire (RT-PCR) des gènes G, SH et F (Naylor et al. 1997, Bayon-Auboyer et al. 1999, Shin et al. 2000). Ainsi, les sous-groupes d'AMPV-A et/ou B ont été retrouvés dans la grande majorité des pays tandis que les États-Unis n'ont été touchés que par un AMPV-C (Figure 15). Dans les élevages, l'infection par un AMPV a d'importantes répercussions économiques faisant suite à la diminution de la prise de poids, la diminution de l'indice de consommation et de conversion, la morbidité (30-100%) et la mortalité (0-60%, essentiellement due aux infections bactériennes secondaires) associées à l'infection (Stuart 1989, Jones and Rautenschlein 2013).

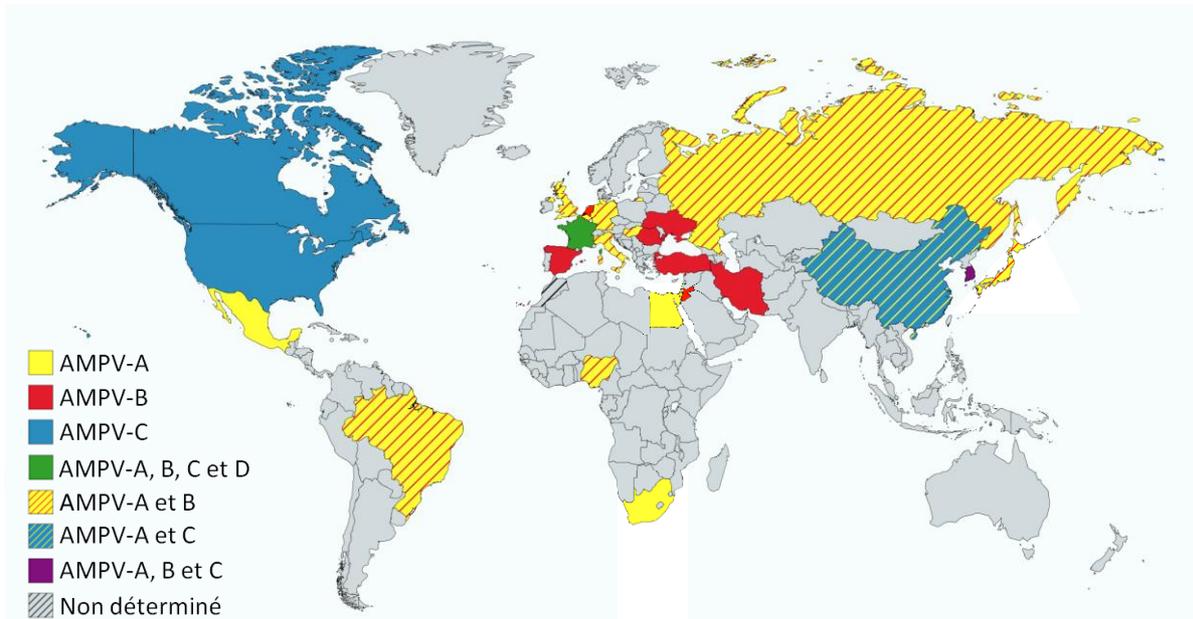


Figure 15 : Répartition géographique des AMPV selon les données disponibles dans la littérature.

3.3 Aspects cliniques

Les signes cliniques associés aux infections par les AMPV apparaissent après une courte période d'incubation allant de 3 à 7 jours (Jones et al. 1987) et consistent en des troubles de l'appareil respiratoire et de l'appareil reproducteur des volailles.

Dans la sphère haute, les symptômes consistent en des écoulements liquides (séreux) pouvant devenir muqueux au niveau des narines, des difficultés respiratoires (éternuements, ronflements, toux et râles), une inflammation du sinus infra orbitaire et de possibles écoulements oculaires mousseux. Il a été constaté que les signes cliniques chez les poulets sont expérimentalement plus discrets que chez les dindes (Jones 2001). L'ensemble de ces signes respiratoires peuvent aussi être accompagnés par un état apathique de l'animal (dépression, anorexie et plumage ébouriffé), voire par des signes nerveux (torticolis) lorsque l'inflammation des sinus et des tissus sous-cutanés adjacents s'étend jusqu'à l'oreille interne des animaux infectés (Brugère-Picoux and Amer 1992).

L'infection de l'appareil reproducteur conduit, en élevage, à des chutes de ponte se traduisant par une diminution de la quantité et de la qualité des œufs produits chez les dindes, poules et canes pondeuses ou reproductrices (Jones et al. 1988, Toquin et al. 1999, Cook 2000, Sun et al. 2014). La réplication virale au niveau de la muqueuse utérine peut s'accompagner de défauts de la progression de l'œuf ou lors de l'oviposition (prolapsus utérin).

Dans les conditions expérimentales, les symptômes observés sont moins importants que ceux décrits en élevage (Picault et al. 1987, Majo et al. 1997). Ces différences sont dues à la présence dans les conditions naturelles de pathogènes secondaires qui exacerbent la pathologie provoquée par l'AMPV et peuvent aboutir à la mort de la volaille infectée (Naylor et al. 1992, Majo et al. 1997, Van de Zande et al. 1998, Van de Zande et al. 2001, Alkhalaf et al. 2002, Reinhardt et al. 2005). Parmi les agents impliqués dans les infections secondaires chez les volailles sont retrouvés les bactéries *Escherichia coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale* (Cook et al. 1991, Van de Zande et al. 2001, Jirjis et al. 2004, Marien et al. 2005), des *Mycoplasma gallisepticum* (Naylor et al. 1992) *Mycoplasma synoviae* (Khehra et al. 1999), *Chlamydophila psittaci* (Loock et al. 2006), et d'autres agents viraux tels que le virus de la maladie de Newcastle (Turpin et al. 2002, Ganapathy et al. 2005) et des Herpesvirus (Van de Zande et al. 2001).

Plus les oiseaux sont jeunes, plus ils semblent être susceptibles de développer d'importants symptômes lors de l'infection par un AMPV. La période où les signes cliniques sont les plus importants se situe chez la dinde entre 2 à 10 semaines en conditions d'élevage (Andral and Louzis 1982, Lister and Alexander 1986, Hafez 1993). Expérimentalement, les dindes se sont montrées plus sensibles que les autres espèces de volailles aux AMPV (Lister and Alexander 1986, Stuart 1989).

La durée de la convalescence des volailles dépend amplement des conditions dans lesquelles elles se trouvent et de la présence ou non d'infections secondaires. En conditions expérimentales, le temps de convalescence suite à l'infection par un AMPV seul n'excède pas 7 à 10 jours (Van de Zande et al. 1999) alors que dans le cas d'infections secondaires, le temps de convalescence est fortement augmenté pouvant atteindre 5 semaines et plus (Cook et al. 1991, Naylor et al. 1992, Seal 2000, Jones 2001, Gough 2008).

Des lésions macroscopiques et microscopiques sont observées suite à l'infection de dindes, poulets et canards par un AMPV. La prévalence et l'importance de ces lésions dépendent de la présence d'autres pathogènes associés aux infections secondaires (Jirjis et al. 2004) :

- Au niveau de la trachée il a été constaté qu'il se produisait une perte de mobilité des cils des cellules tapissant l'épithélium trachéal, conduisant à un excès de mucus dans la trachée ainsi que dans les cornets nasaux (Jones et al. 1986, Jones et al. 1988, Majo et al. 1997). Cette perte de fonction de l'épithélium de la trachée s'accompagne aussi d'une perte de structure dû à une infiltration de lymphocytes, granulocytes et monocytes dans ce tissu (Giraud et al. 1986, Jones et al. 1986, Jones et al. 1988, Majo et al. 1995, Cha et al. 2007). Les poulets atteints de SHS peuvent de plus présenter des œdèmes au niveau de la tête, du cou, de la crête et des barbillons (Majo et al. 1996).
- Au niveau de l'appareil reproducteur, l'infection induit des défauts dans le développement des œufs qui présentent alors une coquille déformée et très fine. Le tractus génital présente également un épaissement de son épithélium et des dépôts d'albumen dans l'oviducte, ainsi que dans la cavité abdominale en cas de « ponte abdominale » (Jones et al. 1988, Cook et al. 1996). Des expériences d'immunofluorescence ont aussi établi la présence de virus au niveau de l'utérus et de l'oviducte de dindes expérimentalement inoculées par un AMPV-A (Cook et al. 1996).

3.4 Aspects épidémiologiques

La transmission des AMPV en élevage dépend de la densité d'animaux, de l'hygiène ainsi que des mesures de biosécurité mises en place. Cette transmission peut se faire de manière horizontale par contact direct entre un animal contaminé excréteur et un autre animal sain (Alkhalaf et al. 2002). La transmission indirecte peut faire intervenir la contamination du matériel présent dans l'élevage (eau de boisson, litières etc...) et la voie aérienne par la présence d'AMPV sous forme d'aérosol (Lister and Alexander 1986) qui est une des voies de transmissions privilégiée pour les AMPV puisque ces virus ciblent principalement les organes respiratoires. L'eau de boisson, précédemment citée comme potentiel support de dissémination des AMPV, a aussi été très utilisée en élevage pour l'administration de vaccins vivants atténués contre les AMPV (ces mêmes vaccins sont aujourd'hui surtout distribués par nébulisation, donc en privilégiant la voie aérienne). Les litières, composant le sol des parquets d'élevage, ont aussi été mises en cause dans la transmission des AMPV à des animaux sains (Velayudhan et al.

2003). La teneur en ammoniac des litières, résultant de la fermentation de celles-ci, la ventilation, l'humidité et la densité d'animaux sont aussi des facteurs impliqués dans l'accroissement de la morbidité et de la mortalité. Les mouvements du personnel des élevages ou de matériel ont aussi été suspectés d'être impliqués dans la transmission d'un AMPV-C de lignée américaine à des canards sentinelles situés à proximité immédiate d'un élevage de dindes infectées par ce même virus aux Etats-Unis (Shin et al. 2000, Shin et al. 2002).

L'avifaune sauvage dont font partie des oiseaux migrateurs a aussi été citée comme un potentiel réservoir d'AMPV-C de lignée américaine aux Etats-Unis, ce qui suggère que des transmissions inter-espèces pourraient régulièrement se produire et être un important moyen de propagation des AMPV sur le continent nord-américain (Shin et al. 2000, Bennett et al. 2005, Cha et al. 2013). La saisonnalité associée aux infections récurrentes d'AMPV dans les régions à forte densité d'élevage, printemps-automne, renforce l'hypothèse selon laquelle les mouvements d'oiseaux migrateurs, potentiels porteurs sains, servent de réservoir et disséminent ainsi les AMPV (Shin et al. 2000, Bennett et al. 2005, Cha et al. 2013).

3.5 Diagnostic

Le diagnostic de l'infection par un AMPV peut être réalisé de multiples manières, cependant, l'établissement d'un diagnostic différentiel spécifique aux AMPV n'est pas une chose aisée à faire sur le terrain. Du fait de son tropisme pour les voies respiratoires, l'infection par un AMPV peut en effet être confondue avec les agents pathogènes induisant des signes cliniques indifférenciables de la rhinotrachéite infectieuse (RTI). Parmi les agents potentiellement responsables de RTI il y a *Chlamydophila psittaci* (Andral et al. 1985), *Mycoplasma gallisepticum* (Naylor et al. 1992), des adénovirus ainsi que des *Paramyxoviridae* et *Orthomyxoviridae* (virus de la maladie de Newcastle, virus influenza) (Andral et al. 1985, Meulemans et al. 2001).

La confirmation de la présence d'un AMPV s'effectue par des techniques de virologie, de sérologie et de biologie moléculaire :

- L'isolement viral *in vitro* est une technique qui permet de mettre en évidence la présence d'AMPV infectieux sans distinction de son sous-groupe. Une des principales contraintes imposées par cette technique est relative au moment d'écouvillonnage de l'animal, puisque la mise en évidence de la présence d'AMPV dans la trachée et les cornets nasaux n'est possible que juste avant ou pendant l'apparition des signes cliniques (Cook et al. 1991, Brown et al. 2019). En effet, l'excrétion des AMPV dans ces organes s'arrête en conditions expérimentales entre 7 et 10 jours post infection. L'isolement viral peut être réalisé sur cultures cellulaires ou œufs embryonnés (cf. supra paragraphe 2.6). Des cultures d'anneaux de trachées maintenus en survie *in vitro* permettent d'étudier le potentiel ciliostatique des AMPV, mais cette méthode de diagnostic ne permet pas d'isoler tous les AMPV puisqu'un AMPV-C de lignée américaine s'est avéré ne pas avoir de potentiel ciliostatique sur anneaux de trachées de poulet (Buys and Du Prees 1980, Cook et al. 1999, Toquin et al. 2006).
- La sérologie a été très utilisée pour établir un diagnostic post infection ou mesurer les réponses post vaccinales (Baxter-Jones et al. 1986, Giraud et al. 1986, Toquin 2009), bien qu'il existe une différence dans l'intensité de la réponse sérologique induite chez des poulets suite à une infection ou une vaccination, cette réponse étant plus faible que celle obtenue chez des dindes. Parmi les techniques disponibles il y a la méthode immuno-enzymatique indirecte (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)(Giraud et al. 1987), l'immunofluorescence indirecte (IF) (Baxter-Jones et al. 1986) et la neutralisation virale (VN) (Giraud et al. 1986). L'ELISA est la plus répandue pour détecter la séroconversion, dès 7 jours post infection. La séroconversion des dindes se maintient expérimentalement jusqu'à 6 à 8 semaines post infection (Giraud et al.

1987). Un des facteurs de sensibilité essentiels pour un dépistage par ELISA est le choix de l'antigène viral, qui est crucial pour une bonne spécificité et sensibilité du test ELISA (Etteradossi et al. 1992, Etteradossi et al. 1995, Toquin et al. 1996, Toquin et al. 1999, Toquin et al. 2000). La proximité antigénique entre les AMPV-A et B s'illustre très bien sur les ELISA puisqu'un antigène préparé à partir d'une souche d'AMPV-A permet aussi bien la détection d'un AMPV-B, avec cependant une plus grande sensibilité pour le sous-groupe d'appartenance de l'antigène (Etteradossi et al. 1992, Etteradossi et al. 1995, Chiang et al. 2000). Des réactions croisées ont été constatées entre les AMPV-A, B, D d'une part les AMPV-C d'autre part, permettant notamment la mise en évidence de ces différents sous-groupes (Toquin et al. 2000). En outre, des réactions croisées entre les antigènes d'AMPV-C et les anticorps anti HMPV (et réciproquement) ont aussi été rapportées, révélant la proximité antigénique entre l'AMPV-C et l'HMPV (Alvarez et al. 2004, Luo et al. 2009). Une conséquence de cette spécificité liée à l'antigène utilisé en ELISA serait que, tout AMPV émergent dont les épitopes seraient fortement différents de ceux des AMPV connus à ce jour pourrait être moins bien détecté en ELISA, nécessitant donc la mise en place d'un nouvel antigène, dit « homologue », pour restaurer la sensibilité du diagnostic par ELISA. C'est par exemple ce qui est arrivé lorsque les AMPV-C ont émergé aux Etats-Unis, les virus induisant des séroconversions indétectables avec les ELISA basés sur des antigènes dérivés des AMPV-A ou AMPV-B, mais parfaitement détectables dès lors que des antigènes ELISA dérivés des AMPV-C sont devenus disponibles.

- Le développement des outils de biologie moléculaire a grandement facilité la détection d'AMPV provenant de diverses matrices. Les réactions de transcription inverse suivies d'amplification en chaîne par polymérase (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) ainsi que les RT-PCR quantitatives (qRT-PCR) et les qRT-PCR en temps réel (Real-Time qRT-PCR) ciblant divers gènes des AMPV ont facilité la mise en évidence de la présence du génome des AMPV et leur typage. Les premières RT-PCR mises en place pour effectuer de la détection d'AMPV ciblaient les gènes M ou F mais ont rapidement été remplacées par la détection du gène N puisque celui-ci est plus conservé (Cavanagh 2001). La détection par les méthodes moléculaires basées sur le gène N est spécifique des AMPV et se base sur la recherche de séquences très conservées, sans que celles-ci risquent d'être modifiées. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle ne permet pas la différenciation des AMPV en fonction de leur sous-groupe (Bayon-Auboyer et al. 1999). A l'opposé les RT-PCR ciblant le gène G des AMPV-A et B peuvent être spécifiques du sous-groupe d'AMPV testé et permettre de les différencier (Naylor et al. 1997, Bayon-Auboyer et al. 1999). La détection du gène M a aussi été utilisée

pour détecter et différencier l'AMPV-C de lignée américaine des AMPV-A et B (Shin et al. 2000). L'utilisation de qRT-PCR ciblant le gène G des AMPV-A, B, D et le gène SH des AMPV-C a permis la détection, l'identification et la quantification des quatre sous-groupe d'AMPV (Guionie et al. 2007). Dernier développement, une nouvelle Real-Time qRT-PCR ciblant le gène N des *Metapneumovirus* permet actuellement de détecter tous les AMPV connus à ce jour, ainsi que des HMPV (Lemaitre et al. 2018). Cette technique permet la détection de matériel génétique viral avec une sensibilité de 10 à 1000 copies/ μ L, y compris lorsque le virus n'est plus infectieux, alors que des quantités similaires ne seraient pas suffisantes pour une détection par d'autres techniques. Cependant des difficultés associées aux protocoles et cinétiques d'écouvillonnages, comme déjà rapporté pour la mise en évidence par isolement viral ~~sérologie~~, s'appliquent encore à cette méthode moléculaire de détection. Les limites de la détection moléculaire des AMPV sont liées au laps de temps durant lequel l'infection par les AMPV induit une excrétion (2 à 10 jours post infection) (Ling et al. 2008) et à la nature des organes pouvant être facilement écouvillonnés pour optimiser les chances de détection (trachée, cornets nasaux) (Cook et al. 1999).

3.6 Prévention et contrôle

Aucune mesure de prophylaxie sanitaire officielle spécifique aux AMPV n'existe à ce jour. Cependant il a été montré que la gestion d'éléments zootechniques tels que la ventilation, la température, la densité des volailles, la qualité de la litière, le contrôle des pathogènes impliqués dans les infections secondaires ainsi que la désinfection du matériel et des équipements permettraient de mieux prévenir l'infection d'un élevage et de réduire le développement ou la gravité des signes cliniques. De plus, des mesures de biosécurité visant à prévenir l'exposition directe ou indirecte des volailles en élevages aux autres volailles ou aux oiseaux sauvages sont essentielles pour éviter l'introduction des AMPV, puisque les autres élevages infectés et potentiellement l'avifaune sauvage constituent les principaux réservoirs pour les AMPV.

La prophylaxie médicale consiste en l'utilisation de vaccins vivants atténués (Le Gros 1988, Buys et al. 1989, Cook 2000, Sun et al. 2014) ou inactivés (Cook 2000). Les vaccins atténués ont été obtenus suite aux passages sériés sur différents types de cultures cellulaires (Cellules Vero, fibroblaste d'embryons de poulets, œufs embryonnés) de différentes souches d'AMPV. Les vaccins vivants atténués sont administrés par nébulisation, dans l'eau de boisson des volailles ou sous forme de goutte par voie oculaire. Chez les dindes et les poulets, l'utilisation de vaccins vivants atténués induit une réponse

humorale modérée et de durée limitée mais une bonne réponse cellulaire. Celle-ci est la plus sollicitée notamment au niveau des muqueuses du tractus respiratoire des volailles (Liman and Rautenschlein 2007), elle est aussi indispensable pour que les vaccins vivants jouent efficacement leur rôle de primo-immunisation dans les programmes vaccinaux destinés aux animaux à vie longue (reproducteurs). Il a été rapporté qu'il existe chez les jeunes dindes et poulets une protection croisée conférée par les vaccins vivants atténués basé sur l'AMPV-A ou B lors d'expérimentation faisant intervenir un challenge avec les AMPV-A, B et C de lignée américaine (Cook et al. 1995, Eterradossi et al. 1995, Cook 2000). Chez les volailles adultes, des vaccins inactivés associés à un adjuvant huileux sont administrés suite à la première vaccination par un vaccin vivant atténué, de façon à obtenir des niveaux immunitaires élevés et homogènes, propres à protéger les poules et dindes reproductrices des infections susceptibles de provoquer des chutes de ponte et ceci pendant toute la durée de la reproduction (soit parfois jusqu'à plus de 60 semaines chez la poule).

Malgré le développement de ces vaccins, des cas de protection partielle, de réinfection ou de réversion des vaccins atténués à la virulence ont été rapportés après vaccination avec un ou des virus vivants atténués (Le Gros 1988, Naylor and Jones 1994, Catelli et al. 2006, Lupini et al. 2011, Cecchinato et al. 2014). Il reste donc primordial pour l'avenir de développer de nouvelles stratégies vaccinales pour mieux contrôler l'infection des volailles d'élevages par les AMPV. Par ailleurs aucun vaccin n'existe à ce jour en Europe pour protéger contre les AMPV-C.

4. Systèmes de génétique inverse appliqués aux *Mononegavirales*

4.1 Définition

La génétique dite « classique » vise à caractériser un génotype à partir de l'observation d'un phénotype. A l'opposé, la génétique inverse s'intéresse au phénotype découlant d'une modification spécifique introduite dans la séquence génétique étudiée. En virologie, les systèmes de génétique inverse permettent de régénérer des virus infectieux portant des séquences génétiques précises clonées sous forme d'ADN complémentaire (ADNc) afin d'étudier les caractères phénotypiques associés à ces séquences.

La première utilisation d'un système de génétique inverse permettant une synthèse *de novo* de virus à partir d'un ADNc a été réalisée pour le Poliovirus (Racaniello and Baltimore 1981). Le Poliovirus étant un virus à ARN simple brin, mono-segmenté, de polarité positive et polyadénylé, son génome est directement infectieux dès qu'il est introduit dans une cellule permissive. Cette caractéristique n'est pas partagée par les virus de l'ordre des *Mononegavirales* dont font partie les *Metapneumovirus* (AMPV, HMPV) qui sont de polarité négative et dont le génome n'est donc pas infectieux tel quel. Le défi de la génétique inverse appliquée aux *Mononegavirales* fut d'être capable de reproduire l'unité de transcription virale apte à prendre en charge l'ARN génomique produit à partir d'un vecteur plasmidique. Pour cela, les premiers systèmes de génétique inverse appliqués à des virus à ARN négatif tels que les virus Influenza (Luytjes et al. 1989) puis spécifiquement aux *Mononegavirales* avec le RSV (Collins et al. 1991), requéraient l'utilisation d'un virus sauvage dit « auxiliaire » qui apportait les protéines impliquées dans la formation d'un complexe de répllication fonctionnel. Pour obtenir un virus recombinant, L'ARN viral synthétisé *in vitro* était alors transfecté dans des cellules infectées par un virus sauvage « auxiliaire », puis les virus recombinants et auxiliaires devaient être séparés.

Par la suite, il a été montré que les protéines virales N, P et L étaient essentielles et suffisantes à apporter dans la cellule transfectée pour qu'un ARN viral de virus à ARN négatif soit transcrit (Pattnaik and Wertz 1990, Pattnaik and Wertz 1991). Cette découverte a induit la génération de plasmides contenant les séquences codantes pour les protéines N, P et L (Pattnaik et al. 1992, Calain and Roux 1993, Conzelmann and Schnell 1994) permettant d'éviter l'utilisation de virus auxiliaire.

Dans le même temps, le virus de la vaccine (souche WR), de par sa nature de virus à ADN double brin, a pu être modifié pour incorporer et exprimer la séquence codante pour l'ARN polymérase du bactériophage T7 (T7pol) (Fuerst et al. 1986). L'intérêt de la T7pol est que cette ARN polymérase ADN dépendante se fixe spécifiquement sur des séquences promotrices connues et absentes de toutes les cellules eucaryotes. L'ajout des séquences promotrices de la T7pol (pT7) en amont des ADNc clonés

dirige alors la transcription du gène cloné en aval. Le virus de la vaccine modifié pour exprimer la polymérase T7 (vTF7) a une grande efficacité pour la transcription de gène apporté en *trans* dans un modèle de cellule eucaryote (Figure 16), sa première utilisation ouvrant la voie à la génétique inverse fut la régénération de particules virales déficientes interférentes du virus de la stomatite vésiculeuse à partir de plasmides contenant le pT7 en amont de la copie clonée du génome déficient (Pattnaik and Wertz 1990).

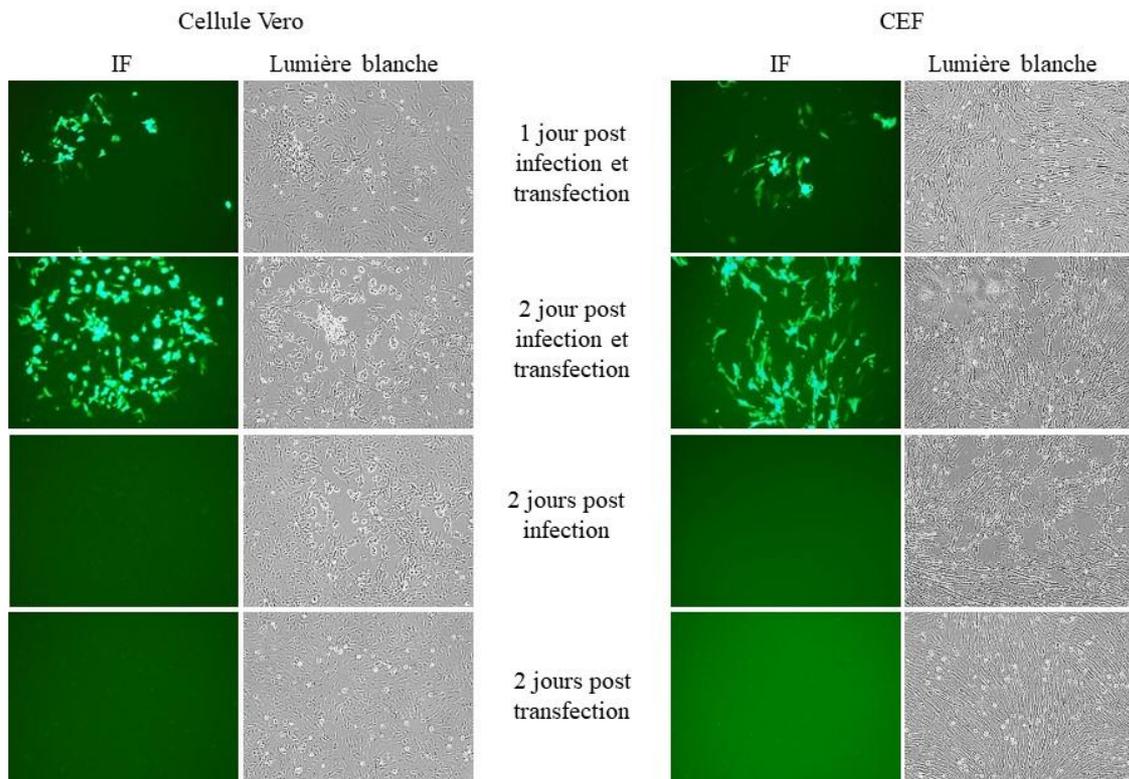


Figure 16 : Effets cytopathogènes (ECP) observés en microscopie optique (x100) suite à l'utilisation du vTF7 pour l'expression de la polymérase T7 dans des cellules Vero et des fibroblastes d'embryons de poulets (CEF) exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) de 10 jours. Les cellules ont été infectées puis transfectées avec un plasmide exprimant la Green Fluorescent Protein (GFP) sous le contrôle d'un promoteur T7 uniquement. L'apparition de la fluorescence est alors associée à la réplication du vTF7 dans les cellules transfectées avec le plasmide GFP. (Szerman N. ANSES Ploufragan 2017).

4.2 Le premier système de génétique inverse pour une *Mononegavirale*

L'ensemble de ces travaux aboutirent au premier système de génétique inverse pour une Mononegavirale entièrement basé sur des supports plasmidiques, qui permit la régénération du virus de la rage (Rabies Virus, RV) (Ordre Mononegavirales ; famille Rhabdoviridae) en génétique inverse en utilisant des plasmides codants les protéines dites « support » (N, P et L) et un plasmide contenant l'antigénome complet du RV, suivi de la séquence du ribozyme du virus de l'hépatite δ (HDVr), le tout encadré des séquences promotrice et terminatrice de la T7pol (respectivement notés pT7 et T7t) (Schnell et al. 1994). Le HDVr correspond à une séquence d'ARN qui possède une activité autocatalytique clivant l'ARN situé en à son extrémité 5'. L'utilisation du HDVr en aval de l'ARN cloné et en amont du T7t permet, lors de la transcription par la T7pol, de couper l'extrémité 3' de l'ARN néosynthétisé au nucléotide souhaité, évitant ainsi la production d'ARN de tailles variables, ce qui pouvait arriver lors de l'utilisation du T7t seul (Pattnaik et al. 1992). L'ensemble des plasmides utilisés était sous la dépendance du promoteur pT7, et leur transcription était obtenue grâce à un virus vaccine recombinant exprimant la T7pol (vTF7), utilisé comme virus « helper » (cf. chapitre 4.3) (Schnell et al. 1994). Cette avancée majeure permit notamment de mieux comprendre le rôle de séquences non codantes présentes et conservées dans le génome du RV. Cette démonstration de l'utilisation d'un système de génétique inverse entièrement basé sur des plasmides pour l'étude des fonctions des éléments contenus sur le génome viral fut la base de tous les systèmes de génétique inverse appliqués aux virus à ARN négatif.

4.3 Les améliorations de ce système

Les inconvénients du système développé par Schnell et al. (1994) résident dans l'utilisation d'un virus « helper », ici celui de la vaccine modifiée pour exprimer la polymérase T7 (vTF7). Ce virus helper est une souche qui conserve une aptitude répliquative et peut interférer avec diverses étapes du cycle répliquatif du virus à régénérer. Ainsi au niveau cellulaire, une compétition pour les composants cellulaires nécessaires à la réplication virale, une cinétique de réplication différente mais aussi le bourgeonnement à la membrane peuvent être des éléments interférents. Par ailleurs au niveau extra cellulaire, le surnageant contient les virions néosynthétisés du vTF7 ainsi que ceux du virus régénéré, ce qui implique des étapes de filtrations pour isoler le virus régénéré du vTF7. Ces étapes de filtrations n'étant pas adaptées pour la purification de virus pléomorphes, différentes techniques ont été mises en place pour synthétiser ou remplacer l'utilisation la polymérase T7.

4.3.1 Virus « helper »

Diverses modifications du virus recombinant vTF7 ont été effectuées pour réduire la capacité répliquative du virus sans perturber la production de T7pol. Ainsi, l'utilisation de virus helper défectif pour sa répliquaison dans certain modèle cellulaire (MVA-T7) ont permis de se soustraire aux étapes de purifications précédemment évoquées (Schneider et al. 1997). D'autres techniques mêlant utilisation d'inhibiteurs de la synthèse d'ADN et utilisation de vTF7 se sont aussi révélées efficaces. Le MVA-T7 étant un virus à ADN linéaire double brin, l'inhibition de la synthèse d'ADN empêche toute répliquaison de son génome conduisant à l'inhibition de la production de virions néoformés du MVA-T7 (Kovacs et al. 2003).

L'utilisation de virus helper non répliquatif s'est avérée être beaucoup plus facile à mettre en œuvre tout en conservant une bonne expression de la T7pol. C'est ainsi que l'utilisation d'un virus de la vaccine aviaire (*Fowlpox virus*, F-vT7) fut utilisé pour exprimer transitoirement la T7pol dans les cellules de mammifères qui ne sont pas permissives pour la répliquaison de ce virus d'origine aviaire (Britton et al. 1996). Le F-vT7 fut utilisé pour la première fois pour la régénération d'un AMPV de sous-groupe A sur des cellules Vero, permissives pour l'AMPV mais pas pour le F-vT7 (Naylor et al. 2004).

4.3.2 Système cellulaire « helper »

Pour éviter toute utilisation de virus helper, différentes lignées cellulaires ont été transformées par des plasmides permettant l'expression stable et constitutive de la T7pol (Radecke et al. 1995, Buchholz et al. 1999). Ces systèmes cellulaires, notamment BSR-T7 (Buchholz et al. 1999), ont depuis été très largement utilisés pour la régénération de virus par génétique inverse.

4.3.3 Promoteurs

De façon à optimiser les événements de régénération virale dans le contexte de la génétique inverse, différents éléments génétiques régulant l'expression des inserts contenus dans les plasmides ont été utilisés. Ces éléments génétiques sont les promoteurs eucaryotes et procaryotes reconnus par les ARN polymérase cellulaires.

Le promoteur du cytomégalo virus (pCMV) reconnu par l'ARN polymérase II cellulaire est aussi l'un des promoteurs les plus communément utilisés, du fait de sa très forte activité transcriptionnelle dans les cellules épithéliales et endothéliales de mammifères (Nelson et al. 1990, Meier and Stinski 1996). Ce promoteur contient en effet des éléments de fixation à de très nombreux facteurs de transcription eucaryotes, ce qui en fait le promoteur induisant la plus forte activité transcriptionnelle connue à ce jour. Cependant l'efficacité du pCMV peut très fortement varier et dépend du type cellulaire chez lequel il

est utilisé (Qin et al. 2010). La première utilisation de ce promoteur pour la régénération d'une Mononegavirale a été effectuée dans le cadre de l'optimisation de la technique de génétique inverse pour la régénération de virus rabique recombinant (Inoue et al. 2003).

4.3.4 Ribozyme en tête de marteau

Le ribozyme en tête de marteau (HammerHead Ribozyme, HHr) a été pour la première fois observé chez des viroïdes de plantes (Hutchins et al. 1986) avant d'être retrouvé chez d'autres organismes (Epstein and Gall 1987, Martick et al. 2008). A l'opposé du HDVr, le HHr possède une activité catalytique à son extrémité 3' ce qui conduit au clivage précis de l'ARN transcrit à son extrémité 5' lorsque l'HHr est placé en amont de l'ARN cloné. Le HHr fut utilisé en génétique inverse pour générer des extrémités 5' exactes, améliorant encore l'efficacité de régénération du virus rabique (*Rhabdoviridae - Lyssavirus*) (Le Mercier et al. 2002).

4.4 Etat de l'art des systèmes existant pour les AMPV

Le premier système de génétique inverse pour un AMPV fut construit par Naylor et al. (2004) pour l'AMPV-A. Le système alors développé faisait intervenir la transfection de cellules Vero infectées par le virus helper F-vT7 avec des plasmides codant chacun pour un élément la RNP (N, P, M2 et L) et un plasmide codant l'antigénome de l'AMPV-A, tous sous contrôle du pT7, seul le plasmide codant l'antigénome viral contenait les séquences du HDVr et du T7t. Le virus recombinant produit par génétique inverse contenait une large délétion dans son génome ne permettant pas la production des protéines de surfaces SH et G. La perte de ces deux protéines produisait un ECP atypique par la taille des syncytiums formés qui étaient bien plus importants que ceux causés par l'AMPV-A sauvage. De plus, le virus délété de ses protéines SH et G avait une croissance sensiblement altérée.

Suite à cette première régénération d'un AMPV-A *in vitro*, ont été régénérés des virus codant pour i) la séquence consensus de l'AMPV-A (CVL 14), ii) L'AMPV-A délété de l'ORF de SH, iii) l'AMPV-A délété de l'ORF de G, iv) un AMPV-A délété de l'ORF de M2.2 et v) des AMPV-A dont l'ORF de SH a été échangé avec l'ORF de SH des AMPV-B et C de lignée eurasienne (Ling et al. 2008). Ces virus furent caractérisés *in vitro* et *in vivo* chez des dindes (hôte chez lequel l'AMPV-A avait été isolé). La délétion de SH seule, générant le même ECP qu'observé par Naylor et al. 2004, confirma un probable rôle de SH dans la régulation de la fusion. D'autre part, la délétion de SH produisait les virus dont la réplication fut la plus altérée aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Le virus délété de SH était bien capable d'infecter les dindes mais le virus n'était plus détecté dans la trachée, organe largement décrit comme hébergeant la réplication virale des AMPV (Cook 2000). Les délétions individuelles des protéines SH et G de l'AMPV-A ont aussi permis d'établir la fonction de ces protéines dans le développement de symptômes et dans l'induction d'anticorps neutralisants (Naylor et al. 2010). Dans le protocole d'immunisation utilisé chez des dindonneaux de 1 jour, il apparaît que les protéines SH et G n'ont qu'un rôle secondaire dans la mise en place d'une immunité humorale neutralisante à l'encontre du virus et que la protéine F est porteuse d'un ou plusieurs épitopes majeurs reconnus par le système immunitaire des dindes, cibles des anticorps neutralisants.

L'utilisation de ce même système de génétique inverse a également permis d'étudier l'impact de la délétion, ou de mutations individuelles, de la protéine M2.2 chez l'AMPV-A, travail qui a notamment permis d'élucider la fonction de la protéine M2.2 dans le contrôle de la réplication virale *in vitro* (Clubbe and Naylor 2011).

Enfin, le rôle de certains acides aminés de la polymérase virale a aussi été investigué suite à la réversion à la virulence d'une souche vaccinale après la vaccination de dindes avec un virus AMPV-A vivant

atténué (Brown et al. 2011). Cette étude a notamment révélé une modification de la virulence associée à une mutation de la protéine L (N 1403 – D) permettant au virus de se répliquer à des températures plus élevées, similaires à celles retrouvées dans l'appareil respiratoire profond (poumon) des volailles.

En 2016, Laconi et al. ont réussi à produire des AMPV-A et AMPV-B en utilisant des plasmides codant pour les protéines supports (N, P, L et M2) de chacun de ces deux AMPV. Ces expériences ont permis de mettre en évidence la complémentation fonctionnelle croisée entre les protéines du complexe de réplication de ces deux sous-groupes d'AMPV. Cette complémentation traduit la proximité génétique des AMPV-A et B (cf. chapitre 2.4) (Laconi et al. 2016).

Un système de génétique inverse basé sur la séquence d'une souche d'AMPV-C isolée à partir de dindes aux USA a été développé en faisant intervenir pour la première fois pour un AMPV les cellules BSRT7 (Govindarajan et al. 2006). Les plasmides codant individuellement pour les protéines N, P, L et M2 ont été clonés sous le contrôle du pT7 et le plasmide codant l'antigénome viral muté ou non était sous le contrôle du pT7 avec les éléments HDVr et T7t à son extrémité 3'. La régénération des virus recombinants a été réalisée en utilisant diverses combinaisons des protéines supports N, P, M2 et L de l'AMPV-C ou de l'HMPV. La régénération des virus ayant été possible avec ces différentes protéines supports, ceci apporte un élément indiquant une complémentarité fonctionnelle entre les protéines N, P, M2 et L des AMPV-C et des HMPV (Govindarajan et al. 2006), là encore cohérente avec la proximité génétique des virus considérés. Ce système de génétique inverse a également été étudié pour étudier la délétion de la protéine G de l'AMPV-C de lignée américaine. La protéine G s'est révélée comme non essentielle aux étapes précoces de l'infection (attachement, entrée et réplication) mais diminuait le développement de signes cliniques ainsi que la séroconversion de dindes infectées par ce virus ΔG (Govindarajan et al. 2010). Un autre système de génétique inverse basé sur l'AMPV-C de lignée américaine avec des constructions plasmidiques identiques à celui de Govindarajan et al. 2006 mais faisant intervenir un protocole de coculture entre cellules BSRT7 et Vero permettant respectivement la transcription des plasmides transfectés et l'amplification des virus AMPV-C recombinants, a rendu possible l'étude de la fonction du domaine VI de la protéine L comme méthyltransférase et ouvert la possibilité du développement d'une souche vaccinale atténuée de ce virus (Sun et al. 2014).

5. Rôle de la protéine SH chez les autres *Mononegavirales*

La protéine SH est retrouvée chez tous les *Pneumoviridae* ainsi que chez certains virus de la famille des *Paramyxoviridae*, dont les virus du genre *Rubulavirus*, tels que le Parainfluenza Virus 5 (PIV5) aussi appelé Simian Virus 5 (SV5) (He et al. 1998) et le Mumps Virus (MuV) (Wilson et al. 2006), ainsi que les virus du genre *Jeilongvirus* dont font partie le J Paramyxovirus (JPV), le Beilong virus (BeiPV) et le Tailam virus (TImPV) (Abraham et al. 2018) (Figure 17). Toutes ces protéines membranaires SH partagent des caractéristiques d'hydrophobicité prédite malgré de grandes disparités en termes de taille et d'orientation (Type I ou II) (Chen et al. 2000, Wilson et al. 2006, Fuentes et al. 2007, Gan et al. 2012, Abraham et al. 2018) (Tableau 2). La taille des protéines SH codées par les AMPV est proche de celles des HMPV (177-183aa) (Brown et al. 2014) mais plus importante que celle des RSV (64-65aa) (Fuentes et al. 2007) du SV5 (44aa) (He et al. 1998), du MuV (57 aa) (Takeuchi et al. 1996) et des *Jeilongvirus* (JPV 69 et BeiPV, TImPV 76 aa) (Li et al. 2011, Vanmechelen et al. 2018) (Tableau 2). A ce jour, aucun élément n'a été rapporté dans la littérature pouvant expliquer l'origine commune de ces protéines ainsi que les possibles événements évolutifs susceptibles d'avoir entraîné la diversité de tailles et de caractéristiques de celles-ci.

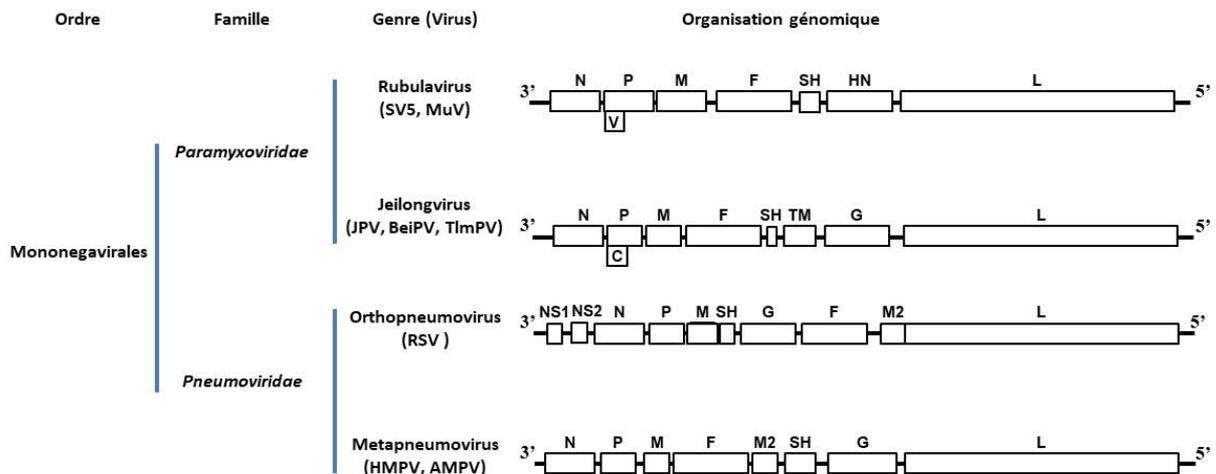


Figure 17 : Classification et organisation génomique des virus de l'ordre des *Mononegavirales* exprimant une protéine SH.

Tableau 2 : Virus du genre Mononegavirales possédant une protéine SH et caractéristiques de ces protéines

Famille	Genre	Virus	Taille de SH	Orientation
<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Rubulavirus</i>	Virus Simien 5 (SV5)	44 aa	Type II
		Virus Ourlien (MuV)	57 aa	Type I
	<i>Jeilongvirus</i>	Paramyxovirus J (JPV)	69 aa	Type I
		Virus Beilong (BeiPV) et Tailam (TlmpV)	76 aa	Type I
<i>Pneumoviridae</i>	<i>Orthopneumovirus</i>	Virus Respiratoire Syncytial (RSV)	64-65 aa	Type II
	<i>Metapneumovirus</i>	Métapneumovirus Humain (HMPV)	177-183 aa	Type II
		Métapneumovirus Aviaire (AMPV)	175-180 aa	Type II

Le développement et l'utilisation des systèmes de génétique inverse appliqués aux *Mononegavirales* a permis la production de virus délétés, ou de virus SV5 chimériques dont la protéine SH a été échangée avec celles du MuV (Wilson et al. 2006), du JPV (Li et al. 2011) et du RSV (Fuentes et al. 2007). L'étude de la fonction biologique de cette protéine chez les *Metapneumoviridae* et les *Paramyxoviridae* a ainsi permis de montrer que cette protéine est non essentielle *in vitro* chez les *Paramyxoviridae* (Takeuchi et al. 1996, He et al. 1998, Wilson et al. 2006, Abraham et al. 2018) et les autres *Pneumoviridae* (Karron et al. 1997, Biacchesi et al. 2004, de Graaf et al. 2013). La délétion de la protéine SH des *Paramyxoviridae* (SV5, MuV et JPV) et *Pneumoviridae* (HMPV et RSV) entraînait *in vitro* une augmentation de la production du Tumor Necrosis Factor α (TNF α), cytokine pro-inflammatoire impliquée dans le déclenchement de la mort cellulaire par apoptose. Pour ces virus, à l'exception de l'HMPV, l'induction de la signalisation du TNF α résultait en une apoptose cellulaire plus importante lorsque les cellules étaient infectées par un virus délété de SH (Wilson et al. 2006, Fuentes et al. 2007, Li et al. 2011, de Graaf et al. 2013, Abraham et al. 2018). Il a aussi été démontré que les protéines SH du MuV, JPV et RSV sont capables de restaurer le phénotype sauvage du SV5 préalablement délété de sa protéine SH en limitant l'apoptose cellulaire *in vitro* dépendante du facteur TNF α (Wilson et al. 2006, Fuentes et al. 2007, Li et al. 2011). Le rôle partagé d'inhibition de la voie de signalisation du TNF α a aussi été observé pour le HMPV mais sans que la complémentation fonctionnelle avec les autres *Paramyxoviridae* et *Pneumoviridae* ait été testée (Bao et al. 2008). Ces résultats indiquent une forte conservation du rôle anti-apoptotique de cette protéine à travers les *Pneumoviridae* et *Paramyxoviridae* ainsi que l'importance du maintien d'une protéine SH fonctionnelle chez tous ces virus bien que les séquences de celles-ci puissent fortement varier. Cette conservation reflète l'existence d'une pression de sélection pour la conservation de la fonction de cette protéine chez tous ces virus sans qu'une possible convergence évolutive n'ait été à ce jour établie (Chen et al. 2000, Masante et al. 2014, Ivancic-Jelecki et al. 2018).

Travaux personnels

Chapitre 1 : Spécificité d'hôte des Méta-pneumovirus Aviaires

Publié dans *Avian Pathology* 2019

Introduction

En se basant sur les données fournies par la littérature (1980 – 2014), l'étude expérimentale du spectre d'hôte des AMPV au sein des espèces d'élevage principalement infectées n'a jamais été effectuée dans le cadre d'une étude unique mettant en œuvre dans des conditions standardisées des virus d'épreuve appartenant aux quatre sous-groupes d'AMPV et étudiant les virus inoculés en parallèle chez leurs trois principales espèces hôtes.

Différentes études effectuées à l'occasion d'infections naturelles donnent toutefois des indications sur la sensibilité des différentes espèces de volailles :

- Chez la dinde (*Meleagris gallopavo*), les quatre sous-groupes ont été isolés à l'occasion d'infections naturelles (Alexander et al. 1986, Kleven 1997, Naylor et al. 1997, Senne et al. 1997, Bayon-Auboyer et al. 2000). La dinde est notamment la seule espèce chez laquelle le sous-groupe D a été détecté (Bayon-Auboyer et al. 2000). Aux Etats Unis, seul l'AMPV-C de lignée américaine (Us-AMPV-C) a été observé chez cette espèce (Kleven 1997, Senne et al. 1997).
- Chez le poulet (*Gallus gallus*), les sous-groupes A, B et C ont été détectés en élevage (Picault et al. 1987, Fabris and D'aprile 1990, Dani et al. 1999, Mase et al. 2003, Owoade et al. 2008, Wei et al. 2013, Rivera-Benitez et al. 2014). Pour les virus AMPV-C détectés chez le poulet en Chine, les données disponibles (gène M seul) ne permettent pas de préciser la ou les lignées génétiques d'AMPV-C rencontrées (Wei et al. 2013).
- Chez les canards Pékin (*Anas platyrhynchos*) et barbarie (*Cairina moschata*), seuls des virus de sous-groupe C ont été détectés. Deux lignées génétiques ont été identifiées, une dite « eurasienne » (notée Fr-AMPV-C) en France (Toquin et al. 1999) et en Chine (Sun et al. 2014), l'autre dite « américaine » (Us-AMPV-C) aux Etats Unis (Shin et al. 2000). Il s'agissait dans ce dernier cas de canards colverts sentinelles placés à proximité d'un élevage de dindes infectées. Chez les palmipèdes vivant à l'état sauvage en Amérique du nord, un AMPV-C de lignée Américaine a été isolé aux Etats-Unis chez la Bernache du Canada (*Branta canadensis*) (Bennett et al. 2005) et des AMPV-C ont été détectés (RT-PCR puis séquençage du gène M) à partir d'écouvillons nasaux ou oropharyngés réalisés chez des oies (Bennett et al. 2004, Turpin et al. 2008) et des canards sauvages (Jardine et al. 2018).

L'ensemble de ces données sur le terrain fournissent une bonne représentation de la détection des AMPV chez différentes espèces de volailles. Cependant, les techniques utilisées ne sont pas toutes comparables

entre elles (détection moléculaire, isolement viral, sérologie). Il est aussi important de tenir compte des nombreux facteurs environnementaux ayant un impact sur la prévalence des AMPV sur le terrain dont notamment la présence de pathogènes secondaires. De plus, les données concernant l'AMPV-C chez les palmipèdes en Amérique du nord ne fournissent que des informations partielles entre les études avec soit de la détection moléculaire, soit de la sérologie et rarement de l'isolement viral. Pour déterminer expérimentalement le spectre d'hôte de ces AMPV-A, B, C et D, de nombreuses équipes ont conduites plusieurs études d'infectiologies expérimentales chez les différentes espèces. Un tableau résume de manière exhaustive les virus et espèces impliqués dans ces études (Tableau 3, page 74).

Infections expérimentales des dindes, poulets et canards avec les différents AMPV

Les AMPV-A, B et D, isolés chez des dindes en France à partir de 1981 ont été inoculés chez des dindes EOPS pour confirmer leur pathogénicité chez leurs hôtes d'origine (Giraud et al. 1986, Toquin et al. 2006). Ces dindes ont présenté des signes cliniques (toux, écoulement nasal, trachéite), une détection moléculaire à partir d'écouvillons trachéaux et une séroconversion à l'encontre des AMPV inoculés suggérant que ces AMPV sont bien pathogènes au sein de cette espèce et que ces virus se répliquent dans la trachée. L'inoculation de différentes souches d'AMPV-A et B, toujours isolés à partir de dindes mais au Royaume-Uni ainsi qu'en Belgique, a aussi produit des signes cliniques comparables à ceux précédemment décrits dans le cas des souches virales d'origine française, avec des résultats de détection moléculaire au niveau de la trachée ainsi que de séroconversion à l'encontre des AMPV inoculés similaires à ce qui avait été observé (Naylor et al. 1997, Van de Zande et al. 1999, Liman and Rautenschlein 2007, Ling et al. 2008). De plus le titrage des AMPV-A et B provenant de différents tissus de l'appareil respiratoire (sinus, trachée et poumon) révélait un titre plus faible d'un Log10 pour l'AMPV-B que pour l'AMPV-A. Des observations de l'épithélium de ces différents tissus en immunofluorescence suggéraient que l'AMPV-A était capable de se propager plus efficacement au niveau épithélial et était le seul à être retrouvé au niveau des bronches, l'AMPV-B étant préférentiellement retrouvé au niveau de supérieur (Van de Zande et al. 1999).

L'inoculation expérimentale des AMPV-A et B (isolés chez des dindes respectivement au Royaume-Uni et en Italie) chez le poulet de chair conventionnel et EOPS a induit des signes cliniques similaires à ceux décrits chez les dindes ainsi que le syndrome infectieux du gonflement de la tête (SIGT ou SHS pour swollen head syndrom) lorsque l'inoculation virale est associée avec des infections bactériennes secondaires (Jones et al. 1987, Majo et al. 1997). La détection moléculaire de ces AMPV à différents niveaux du tractus respiratoire (sinus, trachée, poumon) suggérait qu'à l'inverse des résultats obtenus chez les dindes, l'AMPV-B était capable d'envahir

l'ensemble du tractus respiratoire des poulets et que l'AMPV-A ne se retrouvait que dans l'appareil respiratoire supérieur (sinus et trachée) (Aung et al. 2008). Par ailleurs, l'inoculation d'un AMPV-B isolé chez le poulet en France, provoquant le SHS, était capable de reproduire le SIGT chez des pintades conventionnelles (Picault et al. 1987).

L'inoculation des AMPV-A, B et D à des canards de barbarie EOPS n'a pas permis de reproduire de signes cliniques, ni de réisoler le virus, ni d'induire de séroconversion détectable en ELISA avec un antigène homologue. Il a été proposé que les canards de barbarie EOPS sont réfractaires à l'infection par les AMPV-A, B et D dans un contexte expérimental (Toquin et al. 2006).

L'ensemble des résultats d'infection expérimentale avec les AMPV-A, B et D (tous isolés chez des dindes) chez des dindes, poulets et canards suggèrent que l'AMPV-A pourrait être plus adapté à son hôte d'origine, la dinde, et que l'AMPV-B pourrait être plus adapté que l'AMPV-A pour l'infection d'un hôte différent, ici les poulets. Les données manquent quant à la sensibilité du poulet vis-à-vis des AMPV-D. Les canards sont quant à eux décrits comme réfractaires à l'infection par les AMPV-A, B et D.

L'AMPV-C de lignée eurasiennne (Fr-AMPV-C), isolé en France en 1998 dans un élevage de canes reproductrices (Toquin et al. 1999), provoque chez des canards de barbarie EOPS des signes cliniques respiratoires correspondant à un encombrement des voies respiratoires (râles bronchiques, jetage nasal). Ces signes s'accompagnent d'une détection moléculaire dans la trachée et d'un isolement viral ainsi que d'une séroconversion détectée en ELISA vis-à-vis d'un AMPV-C (Fr ou Us) (Toquin et al. 2000, Toquin et al. 2006). Chez des dindes et poulets, l'inoculation du Fr-AMPV-C n'a pas induit de signe clinique, cependant une séroconversion de ces animaux a été décelée (Cook et al. 1999, Toquin et al. 2000). Dans cette précédente étude il n'y a pas eu de détection moléculaire ainsi que d'isolement viral des Fr-AMPV-C inoculés aux dindes et poulets.

Différents AMPV-C de lignée américaine (Us-AMPV-C) isolés dans des élevages de dindes aux Etats-Unis, inoculés à des dindes conventionnelles ou EOPS, ont induit l'apparition de signes cliniques similaires à ceux causés par les AMPV-A, B et D. Chez ces dindes, le virus inoculé pouvait être détecté par isolement viral ou RT-PCR au niveau des sinus, de la fente choanale (Jirjis et al. 2000, Turpin et al. 2002, Govindarajan et al. 2010), de la trachée (Toquin et al. 2006) ou des poumons (Turpin et al., 2002). Les dindes séroconvertissaient vis-à-vis du Us-AMPV-C (Cook et al. 1999, Shin et al. 2002, Toquin et al. 2006, Govindarajan et al. 2010).

Travaux personnels : Spécificité d'hôte des Métapneumovirus aviaires

Dans une autre expérimentation, des poulets EOPS inoculés avec une souche de l'Us-AMPV-C n'ont pas présenté de signes cliniques mais seulement une séroconversion envers le virus inoculé (Cook et al. 1999). De façon comparable, un virus Us-AMPV-C inoculé à des canards pékin conventionnels et des canards de barbarie EOPS n'a pas induit le développement de signes cliniques, mais le virus était détectable au niveau des sinus et de la trachée par isolement ou technique de biologie moléculaire (RT-PCR, qRT-PCR) (Shin et al. 2001, Toquin et al. 2006) et une séroconversion à l'encontre des AMPV-C était décelée en ELISA par l'utilisation d'antigènes homologue (Shin et al. 2001) ou hétérologue (Fr-AMPV-C, Toquin et al. 2006).

Ces résultats suggèrent que, de façon similaire à ceux du Fr-AMPV-C, un Us-AMPV-C isolé à partir de dindes est pathogène pour son hôte d'origine (dinde) et produit une infection asymptomatique lors de l'infection d'un hôte différent (poulet et canard). Il est intéressant de noter que l'inoculation d'un Us-AMPV-C isolé aux Etats-Unis chez une oie sauvage, à une espèce différente de son hôte d'origine (la dinde), a produit des résultats similaires (absence de signes cliniques mais séroconversion chez les sujets inoculés) (Bennett et al. 2005).

Tableau 3 : Résumé exhaustif des différentes approches expérimentales entreprises avec les AMPV chez différentes espèces de volailles conventionnelles ou EOPS.

	Espèce	AMPV-A	AMPV-B	Fr-AMPV-C	Us-AMPV-C	AMPV-D
Conventionnelle	Dinde	Jones et al 1992 Naylor et al 1992	Naylor et al 1997		Jirjis et al 1999 Bennett et al 2005	
	Dinde reproducteur	Jones et al 1988 Cook et al 1996				
	Poulet de chair	Jones et al 1987 Aung et al 2008	Aung et al 2008			
	Canards pékin				Shin et al 2001	
EOPS	Dinde		Giraud et al 1987	Toquin et al 2000 - 2006	Jirjis et al 2002 Govindarajan et al 2010	Toquin et al 1999 (challenge vaccinal)
	Poulet	Majo et al 1996 - 1997	Picault et al 1987	Toquin et al 2000		
	Canard			Toquin et al 2000 - 2006	Toquin et al 2006	Toquin et al 2006

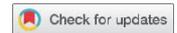
En dépit de ces nombreuses études, des lacunes récurrentes ont pu être identifiées i) Absence de donnée sur l'infection expérimentale de poulet par les AMPV-D, ii) Absence de donnée sur la transmission horizontale à des sujets naïfs, iii) Utilisation de méthodes de détections moléculaire non standardisées (ciblant les gènes M, F, ou G), iv) multiples méthodes d'inoculations, v) âge des volailles différents. L'objectif de ce travail est de reprendre l'ensemble de ces travaux et combler les lacunes identifiées pour retracer au mieux la sensibilité et la capacité des dindes, poulets et canards être infectés par et à transmettre les AMPV-A, B, C et D. Pour cela, une série d'expérimentations animales ont été entreprises en conditions confinées de niveau A2 de manière à retracer précisément le spectre d'hôte de chacun des sous-groupes ou lignées d'AMPV-A, B, C (de lignée américaine notée Us-AMPV-C ou de lignée eurasiennne notée Fr-AMPV-C) et D. Les expérimentations ont fait intervenir les trois espèces de volailles majoritairement cibles des AMPV, à savoir : dinde, poulet et canard, toutes exemptes d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) pour éviter les interférences avec d'autres agents pathogènes. Les animaux ont été inoculés à chaque fois au même âge, avec une dose d'épreuve et selon un protocole identique. Les suivis clinique, virologique et sérologique ont été conduits à chaque fois de la même manière.

Pour cela, cinq expérimentations ont été organisées, chacune avec un virus d'épreuve (AMPV-A, B, Us-C, Fr-C, D) étudié en parallèle chez les trois espèces cibles (dinde, poulet et canard). Les dindes, poulets et canards ont été étudiés à respectivement 28, 28 et 18 jours d'âge, ces âges correspondant à ceux auxquels les signes cliniques, dans l'expérience du laboratoire, sont facilement observables. Pour chaque espèce et au sein de chaque expérimentation, deux lots ont été constitués : l'un de 13 sujets destinés à être inoculés (hébergés sous pression négative, dans une animalerie séparée pour chaque espèce aviaire), l'autre de 10 sujets témoins non infectés (hébergés sous pression positive, dindes, poulets et canards témoins hébergés dans la même animalerie). Dans les animaleries hébergeant les dindes, poulets et canards destinés à être infectés, treize animaux ont été inoculés par voie intranasale (pour retracer la voie naturelle d'infection) avec une dose d'épreuve standardisée de $10^{3.5}$ TCID₅₀/animal. Un groupe de 5 sujets non inoculés a ensuite été introduit à partir de l'animalerie témoin, 3 jours post infection. Ce dernier lot, décrit comme « lot contact », permettait d'étudier la transmission horizontale des virus, des animaux inoculés vers les animaux naïfs. Chaque espèce était donc étudiée au travers d'un « lot inoculé » (13 sujets), d'un lot « contact » (5 sujets) et d'un lot « témoin non inoculé » (5 sujets).

Travaux personnels : Spécificité d'hôte des Métapneumovirus aviaires

Les animaux ont été suivis pendant 28 jours post inoculation. Le suivi clinique incluait une notation d'abord quotidienne puis bi-hebdomadaire des symptômes, à l'aide d'une grille de notation standardisée (Toquin et al. 2006) permettant de comparer l'incidence et l'intensité de ces signes cliniques chez les différentes espèces. Le suivi virologique a été effectué aux mêmes dates par écouvillonnage trachéal. Le suivi sérologique a été basé sur des prises de sang réparties sur les étapes critiques de la réponse immunitaire (avant infection, 10 jours PI puis 28 jours PI).

Les travaux présentés dans l'article suivant (publié dans la revue *Avian Pathology*) synthétisent les résultats des cinq expérimentations effectuées avec les différents sous-groupes par l'équipe d'accueil.



Host specificity of avian metapneumoviruses

Paul A. Brown^a, Chantal Allée^a, Céline Courtillon^a, Nathan Szerman^a, Evelyne Lemaitre^a, Didier Toquin^a, Jean-Michel Mangart^b, Michel Amelot^b and Nicolas Eterradossi^a

^aVIPAC Unit (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety), Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, Ploufragan, France; ^bSELEAC Unit Anses (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety), Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, Ploufragan, France

ABSTRACT

To date, four subgroups of avian metapneumoviruses have been defined (AMPV-A, B, C and D) based on genetic and antigenic differences. The extent of infection in the three principal species (turkeys, chickens and ducks) by these subgroups is, however, not well defined. Here, a series of controlled and ethically approved experimental infections were performed in specific pathogen-free turkeys, chickens and ducks with each of the four AMPV subgroups. For subgroup C, one strain isolated from turkeys in the USA (turkey AMPV-C) and one isolated from ducks in France (duck AMPV-C) were compared. Globally, these extensive experimental trials demonstrated that AMPV-A, B, turkey C and D were well adapted to Galliformes, especially turkeys; however, chickens showed limited clinical signs and differences in seroconversion and transmission. Notably, chickens did not transmit AMPV-A to contacts and were shown for the first time to be susceptible to AMPV-D. The duck AMPV-C was well adapted to ducks; however, chickens and turkeys seroconverted and were positive by virus isolation. In addition, seroconversion of contact turkeys to duck AMPV-C demonstrated horizontal transmission of this virus in a non-palmiped species under our experimental conditions. Interestingly, in chickens and turkeys, duck AMPV-C isolation was possible despite a lack of detection of viral RNA. Likewise, the turkey AMPV-C virus was well adapted to turkeys yet was also isolated from chickens despite a lack of detection of viral RNA. These results would suggest a selection for viral genetic sequences that differ from the original strain upon adaptation to a 'non-conventional host'.

ARTICLE HISTORY

Received 22 November 2018

Accepted 13 February 2019

KEYWORDS

Avian metapneumovirus;
subgroups; host range;
turkeys; chickens; ducks

Introduction

Avian metapneumoviruses (AMPVs) cause respiratory and genital disorders in poultry, most notably, turkeys, chickens and ducks (Jones & Rautenschlein, 2013; Eterradossi et al., 2015) and are a major economic concern for the industry. Initially detected in turkey flocks in South Africa in the late 1970s (Buys et al., 1989), the virus was known as turkey rhinotracheitis virus (TRT). Since then, many studies (Giraud et al., 1986; McDougall & Cook, 1986; Wilding et al., 1986; Cava-nagh & Barrett, 1988; Collins & Gough, 1988; Brown et al., 2014) have led to the current classification: order Mononegavirales, family Pneumoviridae, genus Metapneumovirus (Afonso et al., 2016). To date, four subgroups of AMPV (A, B, C and D) and two lineages of subgroup C have been identified based on antigenic and genetic differences (Juhász & Easton, 1994; Eterradossi et al., 1995; Seal, 1998; Bayon-Auboyer et al., 1999; Toquin, Guionie, Jestin et al., 2006; Brown et al., 2014), and literature indicates a difference in host range for these. Concerning the principal species, all subgroups have been detected in turkeys (Alexander et al., 1986; Giraud et al., 1986; Naylor et al., 1997;

Senne et al., 1997; Bayon-Auboyer et al., 2000); however, it is important to note that the subgroup C viruses detected in this species are of a specific North American lineage (turkey AMPV-C). To date, no subgroup C virus of Eurasian lineage (duck AMPV-C), detected in ducks, has been reported in turkeys. AMPV-A, B, and C have been detected in chickens (Picault et al., 1987; Jones et al., 1991; Mase et al., 2003; Wei et al., 2013). A and B have been well documented in this species; however, the C virus has only been reported in one case in China (Wei et al., 2013). Only sequence of the conserved M gene is available for this virus and thus it is not known if its full-length genome sequence clusters with the turkey or duck AMPV-C lineage or if indeed it forms the third lineage. Concerning ducks, only subgroup C viruses of duck lineage have been detected (Toquin et al., 1999; Sun et al., 2014).

Although these data give a good broad picture of the host range of the different subgroups, it is not yet clear to what extent each subgroup infects a particular host. Indeed, three experimental studies have indicated that the AMPV host range picture could be more

complicated (Cook et al., 1999; Shin et al., 2001; Toquin, Guionie, Allee et al., 2006). Interestingly, in those studies, seroconversion was observed in the absence of clinical signs in chickens, Peking ducks and Muscovy ducks inoculated with turkey AMPV-C (Cook et al., 1999; Shin et al., 2001; Toquin, Guionie, Allee, et al., 2006), and in turkeys inoculated with Muscovy duck AMPV-C (Toquin, Guionie, Allee, et al., 2006). Furthermore, turkey AMPV-C was successfully isolated from the nasal turbinate of Peking ducks in the study of Shin et al. (2001) and from the tracheas of Muscovy ducks in the study of Toquin, Guionie, Allee, et al. (2006). Such data demonstrating the potential for the different AMPV C lineages to infect “non-conventional” hosts, and in the absence of clinical signs, could imply that the other subgroups have the same potential, although there is no report to date of natural infection of ducks by AMPV-A, B or D.

Thus, for the first time and in an attempt to define more precisely the host range of the different AMPV sub-groups, this study reports the findings of a harmonized series of controlled and ethically approved experimental infections performed between 2014 and 2016 in specific pathogen-free (SPF) turkeys, chickens and ducks with each of the four AMPV subgroups. Birds were monitored for four weeks following experimental inoculation.

Materials and methods

Viruses

All viruses had been previously isolated in Vero cells according to the method of Giraud et al. (1987). All viruses had been collected from France unless otherwise stated. AMPV-A 85051 was a 3rd passage of a 1985 turkey isolate (Toquin et al., 2000), AMPV-B 86004 a 5th passage of a 1986 turkey isolate (Bayon-Auboyer et al., 1999), AMPV-C 193adv 9802 a 3rd passage of a 1997 turkey isolate from the United States, collected after 12 passages in chick embryo fibroblasts (kind gift of Dr D. Senne, APHIS), AMPV-C 99178 a 1st passage of a 1999 Muscovy duck isolate (Toquin et al., 1999) and AMPV-D 85035 a 3rd passage of a 1985 turkey isolate (Bayon-Auboyer et al., 2000). All virus stocks were titrated according to Reed and Muench (1938) in Vero cells maintained in 96-well plates, using 10-fold dilutions of the virus stocks and eight repeats per dilution.

Birds

Twenty-eight-day-old SPF turkeys (*Meleagris gallopavo*) and chickens (*Gallus gallus domesticus*), and 18-day-old SPF Muscovy ducks (*Cairina moschata*) were used at day 0 of the bird experiments. All SPF birds were from Anses Ploufragan-Plouzané-Niort laboratory, France. Ages used in the experiments were

chosen as they represent the age when the birds reach a higher susceptibility to respiratory infections.

Bird experiments

Five bird trials were performed under identical conditions. In the first trial, SPF turkeys, chickens and ducks were inoculated with AMPV-A 85051, in the second with AMPV-B 86044, in the third with AMPV-D 85035, in the fourth with AMPV-C 193adv 9802, and in the fifth with AMPV-C 99178.

In each trial, three A2 containment cells (Cc1, 2 and N. were allocated to infection studies and a fourth (Cc4) for mock-inoculation. Turkeys were housed in one cage in Cc1, chickens in one cage in Cc2 and ducks in one cage in Cc3. In Cc4, turkeys, chickens and ducks were housed in separate cages (Figure 1(a)). In

Cc1, 2 and 3, 13 birds were inoculated via the intranasal route with 100 μ l of virus at $10^{4.5}$ TCID₅₀/ml in MEM supplemented with HEPES (MEMH), penicillin and streptomycin at 20 mM, 200 u/ml, 0.2 mg/ml final concentration respectively. In Cc4, eight birds of each species were mock-inoculated with 100 μ l of the supplemented MEM medium described above. Three days post inoculation (dpi), five turkeys, five chickens and five ducks that had not been mock-inoculated, but were housed in Cc4, were introduced as contact subjects to Cc1, 2, and 3, respectively. Details of the days when sampling was performed in each Cc and the type of sample taken with its downstream analysis are shown in Figure 1(a, b), respectively. A total of 26 turkeys, 26 chickens and 26 ducks were used per experiment.

For sampling ethics, virus inoculated birds in Cc1, 2 and 3 were separated into two series that were sampled alternatively every second day, so that the same birds were not subjected to swabbing of the trachea every day.

Clinical signs

Clinical signs were observed by trained examiners, using previously reported criteria (Toquin, Guionie, Allee et al., 2006). Briefly, birds were observed for nasal discharge, nasal crust on one or two nostrils and mild or serious cough or rale.

Detecting viral RNA loads by qRT-PCR

RNA was extracted from tracheal swabs that had been resuspended in 1.2 ml of MEMH supplemented with penicillin and streptomycin at 200 u/ml and 0.2 mg/ml final concentrations, respectively. Extractions were performed using MagAttract Virus Mini M48 Kit (Qiagen) according to the manufacturers' instructions. The levels of AMPV-specific RNA in these extracts were then assessed using subtype-specific qRT-PCRs as previously described (Guionie et al., 2007). Results

a) Organization and sampling within each experiment

Containment cell (Cc)	Number of cages	Species	Group	Sample series (S)	Number of birds	Sampling days (dpi)										
						0	2	3	4	5	6	7	9/10	14	28	
Cc1	1	Turkey (T)	Inoculated	S1	8											
				S2	5											
			Contacts	S3	5											
Cc2	1	Chicken (C)	Inoculated	S1	8											
				S2	5											
			Contacts	S3	5											
Cc3	1	Duck (D)	Inoculated	S1	8											
				S2	5											
			Contacts	S3	5											
Cc4	3	T, C, D	Controls		8 / species											

b) Experimental procedures and sample analysis

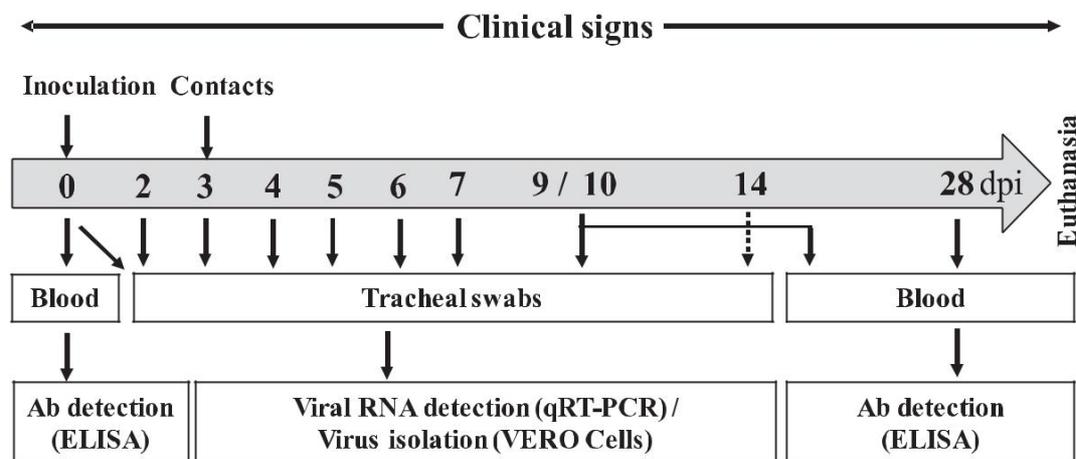


Figure 1. (a) Table summarizing how each trial was organized and detailing the specific days when birds were sampled (grey shaded boxes). Two different series (S1 and S2) within the virus-inoculated groups Cc1, 2 and 3 were constructed so that the same birds were not subjected to unpleasant swabbing of the trachea everyday. (b) Flow diagram of the experimental procedure from the day of inoculation (0) to the end of the trial (28 dpi).

are given as mean viral RNA copy (cp), expressed in \log_{10} /reaction (5 μ l).

Detecting excretion of infectious virus

Tracheal swabs that had been re-suspended as described earlier were inoculated directly onto Vero cells (250 μ l/well of a 6 well plate) for virus isolation as previously described (Giraud et al., 1987; Toquin, Guionie, Allee, et al., 2006). Inoculated cell layers were observed daily under light microscopy and checked for AMPV typical cytopathogenic effect (CPE) (both focal and syncytial). Samples were considered negative after three serial passages in Vero cells.

Detecting anti-AMPV-A, B, C or D antibody

Serological testing was performed with an in-house ELISA using subgroup specific antigens as previously described (Toquin et al., 2000).

Results

Clinical signs

Turkeys inoculated with either AMPV-B, D or the turkey AMPV-C isolate had observable clinical signs from 3 to 11, 3 to 7, and 3 to 6 dpi, respectively. These encompassed watery eyes with a clear, then turbid nasal exudate, occasionally accompanied by a dry tra-cheal cough. Turkeys inoculated with AMPV-A demonstrated the same clinical signs around the eyes and beak from 3 to 10 dpi, although these were much less pronounced. No coughing was observed. In all cases turkeys had recovered by 10 or 11 dpi and from this point on remained free from clinical signs. Contact turkeys developed the same clinical signs as their respective inoculated co-inhabitants within 2 or 3 days after introduction. No clinical signs were observed in turkeys inoculated with the duck AMPV-C isolate.

Ducks inoculated with the duck AMPV-C isolate had observable clinical signs from 5 to 10 dpi with

heavy congestion in the trachea (rales audible at 2 or 3 metres) and occasional sneezing with nasal discharge. Ducks had recovered by 12 dpi and, from this point, remained without any clinical signs until the end of the experiments. Contact ducks developed the same clinical signs as their respective, inoculated co-inhabitants within 4 or 5 days after introduction. No clinical signs were observed in ducks following inoculation with AMPV-A, B, D or the turkey AMPV-C isolate. Clinical signs were very limited or absent in chickens in all trials.

Detection of viral RNA, anti-AMPV antibodies and isolation of viruses

The following data summarizes [Figure 2](#), which should be used alongside this text.

In inoculated and contact turkeys

Turkeys demonstrated similar responses to infection with either AMPV-A, B, D or the turkey AMPV-C isolate in terms of the onset and duration of detectable viral RNA in the trachea, excretion of infectious virus, and the production of anti-AMPV antibody. In each case viral RNA was detected from 2 or 3 dpi to 7 dpi in the tracheas of inoculated turkeys and in the tracheas of contact turkeys 5 days post contact (7 dpi, [Figure 2](#)). Viral RNA loads were highest in turkeys infected with AMPV-D with a maximum of $10^{6.21}$ cp/5 μ l. This figure was one log₁₀ higher than those observed in turkeys infected with either AMPV-B or the turkey AMPV-C isolate (maximums, $10^{5.27}$ and $10^{5.28}$ cp/5 μ l, respectively). Maximum viral RNA loads in the tracheas of turkeys infected with AMPV-A were notably lower at $10^{3.78}$ cp/5 μ l. Virus was isolated in Vero cells from tracheal swabs of inoculated and contact turkeys in these four trials from 2 or 3 dpi to 7 dpi and 5 days post contact (7 dpi, [Figure 2](#)), respectively. Infected Vero cells demonstrated typical focal (AMPV-A, B, D and turkey AMPV-C) and syncytial (AMPV-A and turkey AMPV-C) type CPE. Inoculated and contact turkeys of each trial seroconverted, with the exception of one turkey in the AMPV-B trial.

Concerning turkeys infected with the duck AMPV-C isolate, no viral RNA was detected in the tracheal swabs throughout the trial. However, virus was isolated in Vero cells from tracheal swabs of inoculated birds at 3 dpi. Infected Vero cells demonstrated syncytial type CPE akin to duck AMPV-C.

At 28 dpi, all inoculated birds and two out of five contact birds were AMPV-C seropositive.

In inoculated and contact chickens

Chickens had very similar responses to AMPV-B infection as turkeys, with viral RNA being detected from 2 or 3 dpi to 7 dpi in the trachea of inoculated chickens and at 5 days post contact in the tracheas of contact

chickens. Maximum viral RNA loads were of a similar magnitude as those observed in turkeys at $10^{5.51}$ cp/5 μ l. Virus was also isolated in Vero cells from tracheal swabs of inoculated and contact chickens from 2 or 3 dpi to 7 dpi and 5 days post contact (7 dpi, [Figure 2](#)), respectively. Infected Vero cells demonstrated focal type CPE akin to AMPV-B. Seroconversion was observed in all but one inoculated chicken and in all contact birds by 28 dpi. A limited response was observed in chickens infected with AMPV-A in terms of numbers of birds positive for viral RNA in the trachea (five out of 13 chickens), although viral RNA loads in these birds

were of similar magnitude as those observed in turkeys (maximum $10^{3.89}$ cp/5 μ l) and virus was isolated. All but one inoculated chicken was AMPV-A seropositive at 28 dpi. No viral RNA, infectious virus or anti-AMPV-A antibodies were detected in contact chickens. Inoculated and contact chickens of the AMPV-D, turkey AMPV-C and duck AMPV-C trials, were negative for viral RNA throughout and only inoculated chickens were seropositive to these viruses at 28 dpi. However, virus was isolated in Vero cells from the tracheas of inoculated chickens from 2 to 7 dpi and from 3 to 6 dpi following infection with turkey AMPV-C and duck AMPV-C, respectively. Infected Vero cells demonstrated focal + syncytial and syncytial-type CPE akin to turkey and duck AMPV-C, respectively.

In inoculated and contact ducks

Ducks had very similar responses after infection with duck AMPV-C to those observed in turkeys after infection with AMPV-B, D and turkey AMPV-C. Viral RNA was detected from 2 to 6 dpi with maximum viral RNA loads of $10^{6.07}$ cp/5 μ l. Virus was isolated in Vero cells from the tracheal swabs of inoculated and contact ducks from 2 to 5 dpi and 5 days post contact (7 dpi, [Figure 2](#)), respectively. Infected Vero cells demonstrated syncytial-type CPE akin to duck AMPV-C. Seroconversion was observed in all inoculated and contact ducks at 28 dpi. No viral RNA, infectious virus or anti-AMPV antibodies were detected in ducks inoculated with AMPV-A, B, D or the turkey AMPV-C virus with the exception of one duck that seroconverted to the turkey AMPV-C virus.

In control birds

Control turkeys, chickens and ducks of each of the five clinical trials were negative throughout the experiments (data not shown).

Discussion

Current literature indicates that AMPV-A and B are mainly viruses of turkeys and chickens, that the North American and Eurasian AMPV-C viruses are mainly viruses of turkeys or ducks, respectively, and that the AMPV-D is a virus of turkeys. However, it

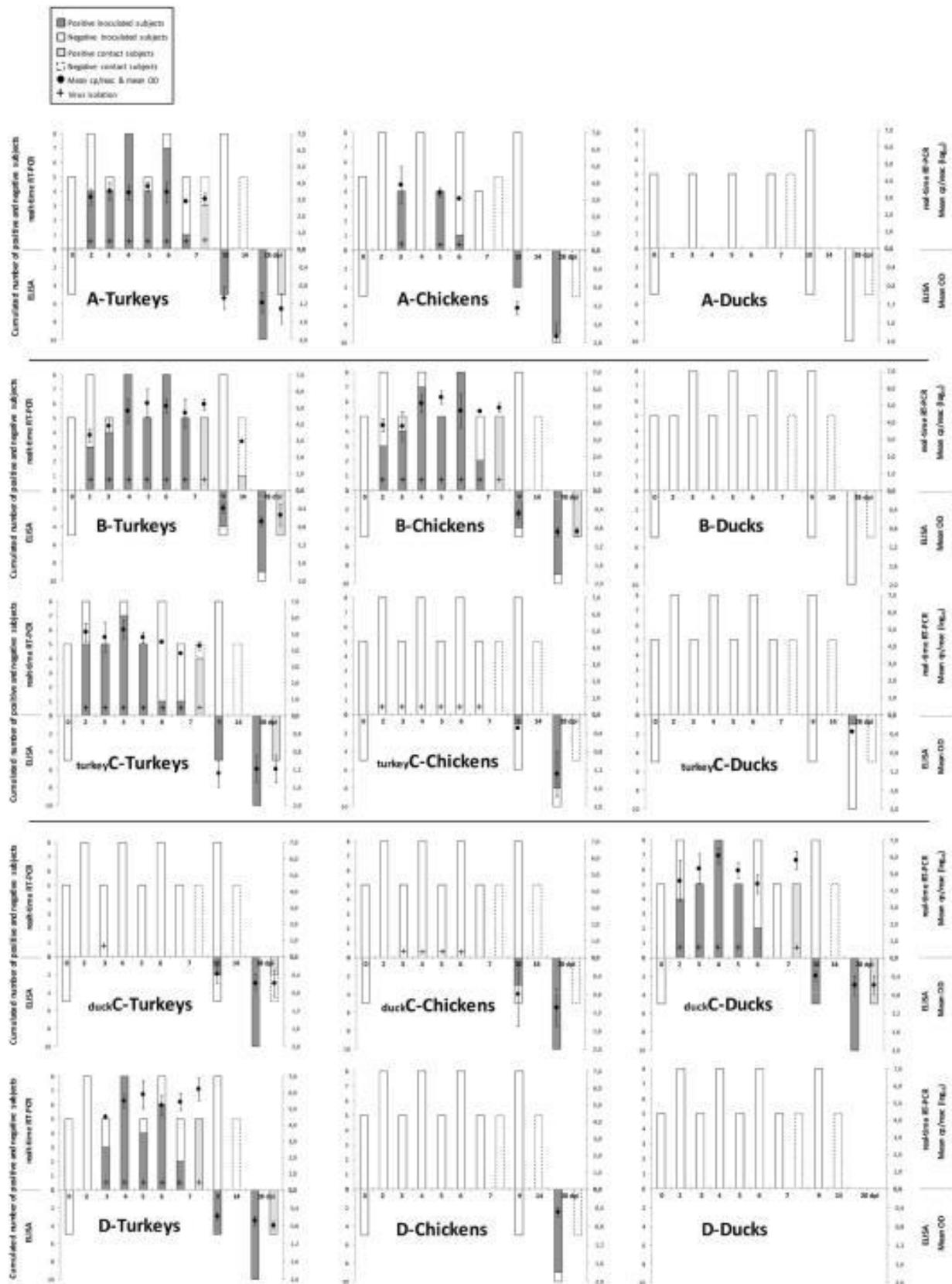


Figure 2. Results of the five bird trials undertaken in this study. Each row of three graphics shows how turkeys, chickens and ducks responded to a particular subgroup of AMPV, from top to bottom: AMPV-A, B, turkey C, duck C and D. The X-axis in each histogram shows the days post inoculation. The Y-axis to the left of each histogram should be used to read the cumulative number of positive and negative subjects by real-time qRT-PCR in the bars above the X-axis, and by ELISA in the bars below the X-axis. The Y-axis to the right of each histogram should be used to read the detail of RNA detection (dots above the X-axis), expressed as mean RNA copies/ reaction, and of antibody detection (dots below the X-axis) expressed as mean ELISA optical density (OD). + Symbols identify positive virus isolation.

also shows that, under experimental conditions, ducks and chickens can become seropositive to the turkey C lineage and that turkeys can become seropositive to the duck C lineage of AMPV-C (Cook et al., 1999; Shin et al., 2001; Toquin, Guionie, Allee et al., 2006). Until now, however, no single series of harmonized experimental trials have been performed that provide one set of reference data concerning the extent of infection of AMPV-A, B, both C lineages and D in the three principal species (turkeys, chickens, and ducks) in terms of clinical signs induced, serological responses, onset and duration of detectable viral RNA in the trachea, excretion of infectious virus and horizontal transmission to naïve contacts.

From the current study, it is clear that both turkeys and chickens are susceptible to AMPV-A and B infection; however, subtle differences were observed. Firstly, in terms of clinical signs, at the peak of infection (around 3–6 dpi) chickens presented very little, as has been previously reported (Jones et al., 1987; Majo et al. 1995; Cook, 2000; Jones & Rautenschlein, 2013), whereas turkeys had clear visible cold-like signs with dry tracheal coughs and mucus secretions from the beak. Secondly, chickens did not transmit AMPV-A horizontally to naïve contacts which was a surprising result, as infectious virus was isolated from the trachea as late as 6 dpi. Perhaps this means that infectious virus in the trachea is not easily secreted into the environment in the absence of coughing and that virus replication higher up in the respiratory pathway, such as in the nasal turbinates where virus can be more easily secreted in mucus from the beak for example, is required for efficient transmission. In support of this idea is the fact that, in all cases where horizontal transmission was observed in galliforms, nasal exudates were present.

The transposition of experimental findings to the field in which infections can be, and often are, complicated by opportune secondary pathogens, is always to be treated with caution. However, this incapacity of chickens to transmit AMPV-A horizontally may be one explanation for the global predominance of sub-group B over A in galliforms.

The AMPV-D virus is clearly well adapted to turkeys as this species was the only species in which inoculated and contact birds were positive in all laboratory tests. That said, seroconversion was observed in inoculated chickens, showing for the first time that this species is susceptible to AMPV-D infection. The lack of viral RNA detection and isolation of virus from the trachea though, may suggest that the replication level of AMPV-D in chickens, under experimental conditions, is limited. It is also possible that AMPV-D has a different target organ for replication in the chicken. This merits further investigation. Looking at these results, it is surprising that AMPV-D viruses have only been detected in turkeys in one case in France in the 1980s (Bayon-Auboyer et al., 2000); however,

this may reflect the fact that most molecular diagnostic tools applied in cases of AMPV suspicion for galliforms are AMPV-A, B or C specific. Thus, field studies using either broad range or subgroup-specific diagnostic assays merit implementation, to either assess the presence of any AMPV subgroup including potentially un-discovered or future emerging AMPVs, or achieve a more precise distribution of the four known subgroups, respectively. Muscovy ducks were not at all susceptible to AMPV-A, B and D infection, as previously reported (Toquin, Guionie, Allee et al., 2006).

Results of experimental infections with the duck and turkey lineages of AMPV-C showed that, in addition to a standard infection profile in their respective original host species, the duck virus can infect turkeys and both the duck and turkey virus can infect chickens. Both inoculated and contact turkeys also seroconverted to the duck AMPV-C virus demonstrating, for the first time, horizontal transmission events of duck AMPV-C in a non-palmiped under controlled experimental conditions. Interestingly, in both cases where the different lineages of AMPV-C infected a “non-conventional host” virus was isolated from tracheas despite a lack of viral RNA detection in the same tracheal samples by a well-characterized AMPV-C specific qRT-PCR (Guionie et al., 2007) targeting the small hydrophobic gene. As molecular diagnostics are considered more sensitive than virus isolation, it is expected that the viral genomes of the duck and turkey AMPV-Cs underwent some level of modification within the chicken as did the duck AMPV-C in the turkey. As the small hydrophobic gene is the second most variable gene of the AMPV genome, and reverse genetics studies have shown that deleting this protein results in phenotype changes in vitro, and attenuation in vivo, then it may not be surprising to find genetic modifications in or around this area upon adaptation to a “non-conventional host”. If modifications to the AMPV-C viral sequences have occurred, however, in the current study these would appear not to have altered small hydrophobic functionality in vitro, as no change in CPE was observed for these viruses in Vero cells.

Future studies will concern deep sequencing of these isolated viruses and their parental inoculum. This will give in-depth information on sequence changes that occurred within the virus population, possibly demonstrating evolution and selection of virus sequences that were more fitting to the “non-conventional” host. Also, in light of the current findings, it is envisaged to undertake similar studies to look at the susceptibility of minor poultry species, such as Guinea fowl, quail and pheasant, in which AMPVs have also been documented.

Ethical statement

All bird experiments were performed in agreement with the national regulations on animal welfare from

the French Ministry for higher education and research, and after approval from the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety's (ANSES) ethical committee (N°16 document 14-024).

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by Conseil Général des Côtes d'Armor [grant number 400B], Comité Interprofessionnel de la Dinde Française, Université Bretagne Loire and ANSES for their financial support; Conseil Régional de Bretagne [grant number 508B].

References

Afonso, C.L., Amarasinghe, G.K., Banyai, K., Bao, Y., Basler, C.F., Bavari, S., Bejerman, N., Blasdel, K.R., Briand, F.X., Briese, T., Bukreyev, A., Calisher, C.H., Chandran, K., Cheng, J., Clawson, A.N., Collins, P.L., Dietzgen, R.G., Dolnik, O., Domier, L.L., Durrwald, R., Dye, J.M., Easton, A.J., Ebihara, H., Farkas, S.L., Freitas-Astua, J., Formenty, P., Fouchier, R.A., Fu, Y., Ghedin, E., Goodin, M.M., Hewson, R., Horie, M., Hyndman, T.H., Jiang, D., Kitajima, E.W., Kobinger, G.P., Kondo, H., Kurath, G., Lamb, R.A., Lenardon, S., Leroy, E.M., Li, C.X., Lin, X.D., Liu, L., Longdon, B., Marton, S., Maisner, A., Muhlberger, E., Netesov, S.V., Nowotny, N., Patterson, J.L., Payne, S.L., Paweska, J.T., Randall, R.E., Rima, B.K., Rota, P., Rubbenstroth, D., Schwemmler, M., Shi, M., Smither, S.J., Stenglein, M.D., Stone, D.M., Takada, A., Terregino, C., Tesh, R.B., Tian, J.H., Tomonaga, K., Tordo, N., Towner, J.S., Vasilakis, N., Verbeek, M., Volchkov, V.E., Wahl-Jensen, V., Walsh, J.A., Walker, P.J., Wang, D., Wang, L.F., Wetzell, T., Whitfield, A.E., Xie, J.T., Yuen, K.Y., Zhang, Y.Z. & Kuhn, J.H. (2016). Taxonomy of the order mononegavirales: update 2016. *Archives of Virology*, 161, 2351–2360.

Alexander, D.J., Gough, R.E., Wyeth, P.J., Lister, S.A. & Chettle, N.J. (1986). Viruses associated with turkey rhinotracheitis in Great Britain. *The Veterinary Record*, 118, 217–218.

Bayon-Auboyer, M.H., Arnauld, C., Toquin, D. & Etteradossi, N. (2000). Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. *Journal of General Virology*, 81, 2723–2733.

Bayon-Auboyer, M.H., Jestin, V., Toquin, D., Cherbonnel, M. & Etteradossi, N. (1999). Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhino-tracheitis virus. *Archives of Virology*, 144, 1091–1109.

Brown, P.A., Lemaitre, E., Briand, F.X., Courtillon, C., Guionie, O., Allee, C., Toquin, D., Bayon-Auboyer, M.H., Jestin, V. & Etteradossi, N. (2014). Molecular comparisons of full length metapneumovirus (MPV) genomes, including newly determined French AMPV-C and -D isolates, further supports possible subclassification within the MPV genus. *PLoS One*, 9, e102740.

Buys, S.B., du Preez, J.H. & Els, H.J. (1989). The isolation and attenuation of a virus causing rhinotracheitis in turkeys in

South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 56, 87–98.

Cavanagh, D. & Barrett, T. (1988). Pneumovirus-like characteristics of the mRNA and proteins of turkey rhinotracheitis virus. *Virus Research*, 11, 241–256.

Collins, M.S. & Gough, R.E. (1988). Characterization of a virus associated with turkey rhinotracheitis. *Journal of General Virology*, 69, 909–916.

Cook, J.K. (2000). Avian rhinotracheitis. *Revue Scientifique et Technique*, 19, 602–613.

Cook, J.K., Huggins, M.B., Orbell, S.J. & Senne, D.A. (1999). Preliminary antigenic characterization of an avian pneumovirus isolated from commercial turkeys in Colorado, USA. *Avian Pathology*, 28, 607–617.

Etteradossi, N., Toquin, D., Guittet, M. & Bennejean, G. (1995). Evaluation of different turkey rhinotracheitis viruses used as antigens for serological testing following live vaccination and challenge. *Veterinary Medicine*, 42, 175–186.

Etteradossi, N., Toquin, D., Picault, J.P. & Jestin, V. (2015). Métapneumoviruses Aviaires. In J. Brugère-Picoux (Ed.), *Manuel de Pathologie Aviaire* (pp. 156–163). Paris: AFAS.

Giraud, P., Bennejean, G., Guittet, M. & Toquin, D. (1986). Turkey rhinotracheitis in France: preliminary investigations on a ciliostatic virus. *The Veterinary Record*, 119, 606–607.

Giraud, P., Le Gros, F.X., Bouquet, J.F., Toquin, D. & Bennejean, G. (1987). Turkey rhinotracheitis: isolation of a viral agent and first trials with experimental inactivated or attenuated vaccines. In 36th Western Poultry Disease Conference (pp. 94–95), Davis, CA.

Guionie, O., Toquin, D., Sellal, E., Bouley, S., Zwingelstein, F., Allee, C., Bougeard, S., Lemiere, S. & Etteradossi, N. (2007). Laboratory evaluation of a quantitative real-time reverse transcription PCR assay for the detection and identification of the four subgroups of avian metapneumovirus. *Journal of Virological Methods*, 139, 150–158.

Jones, R.C., Baxter-Jones, C., Savage, C.E., Kelly, D.F. & Wilding, G.P. (1987). Experimental infection of chickens with a ciliostatic agent isolated from turkeys with rhino-tracheitis. *The Veterinary Record*, 120, 301–302.

Jones, R.C., Naylor, C.J., Bradbury, J.M., Savage, C.E., Worthington, K. & Williams, R.A. (1991). Isolation of a turkey rhinotracheitis-like virus from broiler breeder chickens in England. *The Veterinary Record*, 129, 509–510.

Jones, R.C. & Rautenschlein, S. (2013). Avian metapneumovirus. In D.E. Swayne (Ed.), *Diseases of Poultry* (pp. 112–138). Ames, IA: Wiley-Blackwell.

Juhasz, K. & Easton, A.J. (1994). Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *Journal of General Virology*, 75, 2873–2880.

Majo, N., Allan, G.M., O'Loan, C.J., Pages, A. & Ramis, A.J. (1995). A sequential histopathologic and immunocytochemical study of chickens, turkey poults, and broiler breeders experimentally infected with turkey rhinotracheitis virus. *Avian Diseases*, 39, 887–896.

Mase, M., Yamaguchi, S., Tsukamoto, K., Imada, T., Imai, K.

A. Nakamura, K. (2003). Presence of avian pneumovirus subtypes A and B in Japan. *Avian Diseases*, 47, 481–484.

McDougall, J.S. & Cook, J.K. (1986). Turkey rhinotracheitis: preliminary investigations. *The Veterinary Record*, 118, 206–207.

Naylor, C., Shaw, K., Britton, P. & Cavanagh, D. (1997). Appearance of type B avian pneumovirus in Great Britain. *Avian Pathology*, 26, 327–338.

- Picault, J.P., Giraud, P., Drouin, P., Guittet, M., Bennejean, G., Lamande, J., Toquin, D. & Gueguen, C. (1987). Isolation of a TRTV-like virus from chickens with swollen-head syndrome. *The Veterinary Record*, 121, 135.
- Reed, L.J. & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent end points. *American Journal of Hygiene*, 27, 493–497.
- Seal, B.S. (1998). Matrix protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first U. S. avian pneumovirus isolate is distinct from European strains. *Virus Research*, 58, 45–52.
- Senne, D.A., Edson, R.K., Pederson, J.C. & Panigrahy, B. (1997). Avian Pneumovirus Update. Schaumburg, IL: American Veterinary Medical Association.
- Shin, H.J., Njenga, M.K., Halvorson, D.A., Shaw, D.P. & Nagaraja, K.V. (2001). Susceptibility of ducks to avian pneumovirus of turkey origin. *American Journal of Veterinary Research*, 62, 991–994.
- Sun, S., Chen, F., Cao, S., Liu, J., Lei, W., Li, G., Song, Y., Lu, J., Liu, C., Qin, J. & Li, H. (2014). Isolation and characterization of a subtype C avian metapneumovirus circulating in Muscovy ducks in China. *Veterinary Research*, 45, 74.
- Toquin, D., Bayon-Auboyer, M.H., Etteradossi, N. & Jestin, V. (1999). Isolation of a pneumovirus from a Muscovy duck. *The Veterinary Record*, 23, 680.
- Toquin, D., Bayon-Auboyer, M.H., Senne, D.A. & Etteradossi, N. (2000). Lack of antigenic relationship between French and recent North American non-A/non-B turkey rhinotracheitis viruses. *Avian Diseases*, 44, 977–982.
- Toquin, D., Guionie, O., Allee, C., Morin, Y., Le CoQ, L., Zwingelstein, F., Jestin, V. & Etteradossi, N. (2006). Compared susceptibility of SPF ducklings and SPF turkeys to the infection by avian metapneumoviruses belonging to the four subgroups. In U. Heffels-Redman & E.F. Kaleta (Eds.), *V. International Symposium on Avian Corona and Pneumoviruses and Complicating Pathogens* (pp. 70–76). University of Giessen Rauschholzhausen, Germany: VVB Laufersweiler Verlag.
- Toquin, D., Guionie, O., Jestin, V., Zwingelstein, F., Allee, C. & Etteradossi, N. (2006). European and American subgroup C isolates of avian metapneumovirus belong to different genetic lineages. *Virus Genes*, 32, 97–103.
- Wei, L., Zhu, S., Yan, X., Wang, J., Zhang, C., Liu, S., She, R., Hu, F., Quan, R. & Liu, J. (2013). Avian metapneumovirus subgroup C infection in chickens, China. *Emerging Infectious Diseases*, 19, 1092–1094.
- Wilding, G.P., Baxter-Jones, C. & Grant, M. (1986). Ciliostatic agent found in rhinotracheitis. *The Veterinary Record*, 118, 735.

Conclusions

L'objectif de ces travaux était la détermination, dans des conditions expérimentales contrôlées, du spectre d'hôte des 4 sous-groupes d'AMPV au sein de 3 des espèces d'élevage représentant les galliformes (dinde et poulet) et les palmipèdes (canards). Les résultats de ces expérimentations *in vivo* confirment les données fournies par la bibliographie et apportent des informations supplémentaires concernant les capacités de chaque virus à infecter un hôte, le cas échéant sans induction de symptôme, ainsi que sur les événements de transmission horizontale intra-espèce.

Chez les dindes EOPS :

Ainsi, il apparaît que chez les dindes EOPS expérimentalement inoculées, les AMPV-A, B, Us-AMPV-C et D induisent de légers troubles respiratoires et se transmettent horizontalement à des dindes naïves chez lesquelles ces virus induisent les mêmes signes cliniques. L'infection des dindes inoculées induit une séroconversion qui est aussi détectée chez les dindes contacts. Le virus Fr-AMPV-C est le seul à n'avoir ni n'induit de signes cliniques chez des dindes EOPS inoculées et contacts, ni été détecté dans la trachée de celles-ci (qRT-PCR ciblant le gène SH), et ce, malgré un isolement viral positif à partir de la trachée de deux des dindes inoculées. En dépit de l'absence de signes cliniques, le virus Fr-AMPV-C a induit chez ces mêmes dindes EOPS expérimentalement inoculées et contacts une séroconversion détectable à 28 jours post infection. Ce résultat enrichit ceux antérieurement obtenus lors d'expériences qui n'incluaient pas de dindes contact (Toquin et al. 2006), et démontre l'efficacité de la transmission horizontale du Fr-AMPV-C chez la dinde dans ce modèle expérimental.

Ces éléments suggèrent une possibilité de portage asymptomatique et de transmission interindividuelle du Fr-AMPV-C chez les dindes. Il conviendrait donc de prolonger nos travaux par une étude de séroprévalence des Fr-AMPV-C dans les élevages de dindes conventionnelles, notamment dans les régions où l'on pratique aussi l'élevage de canard (susceptible d'intervenir comme réservoir du Fr-AMPV-C). Ces études devraient faire appel à des tests ELISA réellement spécifiques de l'AMPV-C pour éviter les croisements sérologiques avec les autres sous-groupes d'AMPV circulant chez la dinde. De telles études seraient nécessaires car il n'y a pour l'instant jamais eu d'isolement du Fr-AMPV-C chez la dinde, cependant il faut noter que les isolements viraux sont pratiqués à l'occasion d'infections symptomatiques et l'absence de signes cliniques chez les dindes infectées par le Fr-AMPV-C pourrait être la cause d'une absence de recherche de ce pathogène. La recherche d'anticorps – pour autant que le test utilisé soit spécifique – paraît préférable à une recherche virologique ou métagénomique car indépendante du site de réplication virale (seulement deux des dindes inoculées présentaient du virus dans la trachée).

Une telle étude permettrait de préciser si la dinde peut constituer un réservoir asymptomatique du Fr-AMPV-C, ce qui peut avoir des conséquences sur l'exposition des autres espèces de volaille, ou si l'émergence du Fr-AMPV-C chez la dinde est un évènement ponctuel qui a pu être favorisé dans nos travaux par l'inoculation expérimentale. La diffusion épizootique extrêmement rapide de AMPV-C chez la dinde aux Etats-Unis (Goyal et al. 2003) plaide en faveur d'une population de dindes d'élevage naïves, donc n'hébergeant pas de façon asymptomatique un AMPV-C (en tous cas pas antigéniquement proche du virus émergent)

Chez les poulets EOPS :

Seul l'AMPV-B inoculé aux poulets EOPS a induit le développement limité de signes cliniques (écoulement nasal), s'est transmis aux poulets naïfs contacts et a pu être réisolé ou être détecté par voie moléculaire ou sérologique chez les sujets inoculés ou contacts. L'ensemble de ces résultats suggère que l'AMPV-B est très adapté à une circulation chez le poulet. Pour les autres sous-groupes, l'ensemble des lots de poulets inoculés par les différents AMPV a séroconverti à l'encontre des virus inoculés, ce qui suggère que les poulets EOPS utilisés étaient expérimentalement sensibles à ces infections. Cependant, l'infection des sujets inoculés s'est accompagnée d'un niveau variable de détection du virus d'épreuve : réisolement, détection moléculaire et séroconversion pour AMPV-A, réisolement et séroconversion pour les Fr et Us AMPV-C, séroconversion seule pour AMPV-D. Ces réponses des sujets inoculés à l'infection par les virus d'épreuve ne se sont jamais accompagnées d'une diffusion des virus inoculés vers les sujets naïfs contacts. Ces résultats apportent de nouveaux éléments de compréhension sur la possibilité d'infecter les poulets avec l'ensemble des AMPV : l'inaptitude des poulets EOPS inoculés avec AMPV-A, Us-AMPV-C, Fr-AMPC-C et D à transmettre l'infection à des sujets contacts suggère en effet que, dans certaines conditions telles que les conditions expérimentales utilisées ici, l'infection du poulet par ces virus pourrait constituer un « cul-de-sac » épidémiologique.

Pour ce qui concerne l'absence de signes cliniques, nos observations ne correspondent pas à ce qui a été décrit lors de précédentes expérimentations avec le sous-groupe A (Jones et al. 1987, Aung et al. 2008), cependant les poulets utilisés étaient conventionnels (donc potentiellement porteurs de contaminants bactériens susceptibles de contribuer à une aggravation des signes cliniques). Pour ce qui est de la transmission horizontale, il n'est pas possible de conclure quant à la cohérence des résultats puisque ces autres études n'incluaient pas de sujets contacts. L'hypothèse d'une infection « cul-de-sac » par AMPV-A chez le poulet ne semble pas cohérente avec la situation décrite au Mexique (Riviera Benitez et al. 2014), puisque ce pays a rapporté de nombreuses détections moléculaires, sérologiques et d'isolements viraux d'AMPV-A dans des lots de poulets. Il pourrait être justifié de vérifier si les souches d'AMPV-A isolées chez la dinde au début des années 1980 en Europe et celles détectées plus récemment

chez le poulet en Amérique du Sud pourraient présenter des différences dans leur tropisme d'espèce. Pour ce qui concerne la souche d'AMPV-A isolée au début des années 1980 et étudiée ici (souche 85051), une capacité de diffusion moindre chez le poulet est en tous cas cohérente avec la situation épidémiologique en Europe. Celle-ci a en effet été marquée – en tous cas au Royaume-Uni – par un remplacement progressif des AMPV-A (présents au début de l'épizootie européenne de rhinotrachéite infectieuse de la dinde) par des AMPV-B qui semblent adaptés à infecter à la fois le poulet et la dinde, et donc avoir une population d'hôtes potentiels plus large (Naylor et al. 1997, Van de Zande et al. 1998, Chacon et al. 2007).

Les poulets inoculés par les Us-AMPV-C, Fr-AMPV-C et AMPV-D ont eux aussi présenté une séroconversion spécifique à l'encontre de leurs inoculums respectifs. Les lots inoculés avec les Us-AMPV-C et Fr-AMPV-C ont présenté une détection virologique positive, et ce en l'absence de détection moléculaire. Comme la détection moléculaire est normalement plus sensible que le réisolement viral (Bayon-Auboyer et al. 1999), cet élément suggère que des modifications de l'expression ou de la séquence du gène SH pourraient avoir eu lieu suite à la répllication de ces AMPV-C chez le poulet, hôte non habituel pour ces virus isolés chez la dinde ou le canard. L'hypothèse d'un rôle du gène SH dans l'adaptation des AMPV-C à une espèce hôte galliforme ou palmipède est explorée de façon plus approfondie dans le chapitre suivant.

Dans le cadre des infections par l'AMPV-D, l'absence de détection moléculaire et virologique indique que ce virus ne se réplique pas dans la trachée des poulets mais potentiellement dans d'autres organes du tractus respiratoire (sinus, poumon), ou du tractus génital. Un tropisme d'organe différent a déjà été décrit pour les AMPV-A et B mais il ne concernait que la capacité de ces différents virus à se répliquer au niveau des voies respiratoires basses (poumon) (Aung et al. 2008).

Chez les canards de barbarie EOPS :

Les canards de barbarie EOPS inoculés avec le Fr-AMPV-C et les canards contacts des sujets précédents sont les seuls à avoir présenté à la fois des signes cliniques (toux, râle, jetage nasal), une détection virale (par isolement et qRT-PCR) et une séroconversion, résultats qui illustrent la capacité spécifique à ce virus d'infecter et de se transmettre horizontalement chez les canards.

A l'inverse, l'inoculation de l'Us-AMPV-C, originaire de dinde ne s'est accompagnée chez les canards inoculés ou contacts d'aucun signe clinique, d'aucune détection virale (ni isolement ni RT-PCR) et d'aucune séroconversion à l'exception d'une réponse sérologique de très faible intensité chez un seul des sujets inoculés. Si l'absence de signes cliniques suite à l'inoculation de l'Us-AMPV-C, correspond à ce qui avait été précédemment observé expérimentalement (Toquin et al. 2006) et sur le terrain sur des

canards colvert sentinelles (Shin et al. 2002), en revanche l'absence de séroconversion et de réisolement viral ne correspondent pas à ce qui avait été précédemment observé au sein de l'équipe (Toquin et al., 2006). Les résultats obtenus chez les dindes au cours de nos expérimentations avec le même inoculum confirment que le virus Us-AMPV-C utilisé dans cette expérimentation était bien infectieux. Ces divergences dans les résultats expérimentaux justifieraient donc une expérience de confirmation. En tout état de cause, les résultats obtenus ici chez le canard avec un US-AMPV-C isolé chez la dinde sont cohérents avec les résultats obtenus, toujours chez le canard, avec les autres AMPV isolés chez la dinde (AMPV-A, B et D), à savoir : absence de signes cliniques, non transmission, absence de réisolement viral et absence de détection moléculaire. Ces résultats suggèrent que le canard de barbarie EOPS est, selon nos conditions expérimentales, réfractaire à l'infection par les AMPV-A, B, Us-C et D. Ces éléments justifient la suite de l'étude au cours de laquelle on s'intéressera aux bases moléculaires susceptibles d'expliquer les différences de phénotype observées ici entre le Fr-AMPV-C et l'Us-AMPV-C

Chapitre 2 : Etudes du rôle de la protéine SH chez les AMPV-C

Publié dans *Virology* 2019

Introduction

1 – Mise au point d'un système de génétique inverse pour le Fr-AMPV-C

Afin de tenter de déterminer les éléments génétiques des AMPV-C impliqués dans la diversité de tropisme d'hôte de ces virus et dans leur pathogénicité chez des hôtes distincts (dinde et canard) (Brown et al. 2019), un système de génétique inverse a été développé pour une souche d'AMPV-C isolée chez le canard. Ce système, basé sur les modèles qui préexistaient pour l'AMPV-A (Naylor et al. 2004) et pour l'Us-AMPV-C (Sun et al. 2014) lorsque ce travail a été initié, a été pour la première fois adapté à la séquence consensus d'une souche d'AMPV-C de lignée eurasienne isolée en France (Fr-AMPV-C) et pathogène pour les canards (Toquin et al. 1999) : la souche 99178, dont la séquence consensus avait été entièrement déterminée au sein du laboratoire d'accueil (Brown et al., 2014). Ce virus sauvage sera désigné dans la suite de ce travail par $_{wt}$ Fr-AMPV-C (« wt » pour « wild-type »).

Dans un premier temps, le système de génétique inverse a été utilisé pour régénérer un virus recombinant dont la séquence correspond exactement à la séquence consensus précédemment déterminée (Brown et al. 2014). Ce virus recombinant sera désigné par $_{rc}$ Fr-AMPV-C (« rc » pour « recombinant »). Pour construire le système de génétique inverse, différents plasmides codant pour les protéines impliquées dans la formation du complexe de réplication (N, P, M2 et L) du virus $_{wt}$ Fr-AMPV-C ont été construits par clonage des ADN complémentaires des gènes N, P, M2 (vecteur plasmidique pCDNA3) et L (vecteur plasmidique pSMART) du virus $_{wt}$ Fr-AMPV-C. Les plasmides d'expression utilisés incorporent les promoteurs du cytomégalovirus (pCMV) et de la polymérase du bactériophage T7 (pT7) (pour le plasmide pCDNA3), ou le promoteur pT7 seul (pour le plasmide pSMART). Le pCMV est un vecteur d'expression fort, basé sur la RNAPolIII dont l'expression est constitutive dans toutes les cellules eucaryotes, il ne nécessite donc pas d'apport *in trans* de la polymérase. A l'inverse, le pT7 est utilisable seulement par la polymérase du bactériophage T7 (T7pol) qui doit donc être fournie *in trans* pour que la transcription ait lieu. L'utilisation de la T7pol pour la régénération d'AMPV-A avait précédemment nécessité l'utilisation d'un virus assistant (helper) dérivé du virus de la variole aviaire et génétiquement modifié pour exprimer la T7pol (Fowlpox T7) (Naylor et al. 2004), de façon comparable à ce qui avait été réalisé dans le premier système de génétique inverse développé pour une *Mononegavirale* (Schnell et al. 1994) avec un virus assistant dérivé du virus de la vaccine. Dans notre système, il a été choisi d'apporter la T7pol *in trans*, en transfectant les plasmides décrits précédemment dans des cellules BSRT7 (Buchholz et al. 1999), dérivées de la lignée continue BHK21 qui a été transformée pour exprimer de façon stable et constitutive cette polymérase.

Les protéines dérivées des plasmides décrits au paragraphe précédent forment le complexe de réplication lorsqu'elles sont associées à un ARN antigénomique viral (polarité positive), lui-même produit par les cellules transfectées à partir d'un plasmide (noté pFr-AMPV-C) qui contient un ADN complémentaire complet (incluant les extrémités non codantes du génome) de la séquence consensus du virus $_{wt}Fr$ -AMPV-C. Le plasmide pFr-AMPV-C a été produit par clonage successif en bouts francs de huit fragments, selon un protocole semblable à celui décrit par Naylor et al. 2004, approche qui a permis d'introduire la totalité de la séquence consensus du virus $_{wt}Fr$ -AMPV-C dans le vecteur pSMART. Pour permettre de produire de nouveaux virions, la régénération de virus en génétique inverse nécessitait donc la co-transfection d'un mélange dans des proportions appropriées de l'ensemble des cinq plasmides évoqués (N, P, M2, L et pFr-AMPV-C), au sein d'une même cellule BSRT7. Sur le modèle de ce qui a été décrit en parallèle à nos travaux pour la régénération d'AMPV-C de lignée américaine (Zhang et al. 2016), cette étape a fait intervenir une co-transfection dans des cellules BSRT7, suivie d'une mise en co-culture des BSRT7 transfectées avec des cellules Vero (utilisées comme un support plus permissif que les cellules BSRT7 pour la réplication et la propagation de l'AMPV régénéré).

La régénération du virus $_{rc}Fr$ -AMPV-C a été confirmée *in vitro* i) par l'apparition d'un effet cytopathogène (ECP) correspondant à celui observé pour le virus $_{wt}Fr$ -AMPV-C (Toquin et al. 1999), ii) par observation en immunofluorescence indirecte, après marquage des cellules infectées par le virus régénéré à l'aide d'un antisérum de dinde anti-Fr-AMPV-C, ainsi que iii) par le séquençage complet du génome du virus régénéré par les techniques de SANGER et de séquençage haut débit (NGS). De par sa nature de copie moléculaire de la souche sauvage, le virus recombinant ne pouvait être différencié du virus sauvage en se basant sur sa séquence consensus : en effet, le choix avait été fait de n'introduire aucun marqueur génétique dans le plasmide pFr-AMPV-C, pour être sûr de ne pas altérer le phénotype viral ou interférer avec la régénération. Pour confirmer formellement que le virus responsable de l'ECP était bien issu d'une régénération par génétique inverse, et non d'une contamination de laboratoire par le virus sauvage, une nouvelle stratégie a donc été utilisée faisant appel au NGS. Le virus recombinant provenait d'un seul plasmide dont la séquence était connue et contrôlée, la population virale issue de ce plasmide devait alors apparaître théoriquement plus homogène que celle de la souche sauvage propagée sur animaux et sur cellules en laboratoire. En parallèle, une autre méthode consistant en l'insertion d'un marqueur génétique spécifique au virus régénéré *in vitro* (site de restriction BamHI surnuméraire introduit par synonyme dans le gène F) a également été utilisée pour confirmer les résultats par la production d'un $_{rc}Fr$ -AMPV-C porteur d'une mutation (Naylor et al. 2004, Govindarajan et al. 2006).

Le phénotype du virus r_c Fr-AMPV-C régénéré a été comparé à celui du virus sauvage *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, les ECP induits par les deux virus, ainsi que les cinétiques de réplication virale de 0 à 9 jours post infection sur cellules Vero ont été comparés. *In vivo* chez le canard de barbarie (espèce cible du virus wt) et jusqu'à 21 jours post infection, ce sont les signes cliniques induits, les quantités de génome viral excrétées (qRT-PCR), l'excrétion de particules virales infectieuses (réisolement viral), la séroconversion (ELISA) et la capacité de transmission horizontale à des sujets EOPS contacts qui ont été comparés chez les virus w_t Fr-AMPV-C et r_c Fr-AMPV-C. Ces résultats ont permis de confirmer que le virus régénéré possédait un phénotype comparable (adaptation et pouvoir pathogène pour le canard de barbarie), comparable à celui du virus parental sauvage.

2 – Etude expérimentale d'un éventuel rôle de SH dans le tropisme d'hôte des AMPV-C

L'étude présentée au chapitre précédent avait montré i) qu'un Us-AMPV-C isolé chez la dinde se répliquait et exprimait son pouvoir pathogène de façon préférentielle chez celle-ci, ii) qu'un Fr-AMPV-C isolé chez le canard faisait de même chez le canard de barbarie, iii) que des modifications du gène SH pouvaient être suspectées lors de la propagation du Fr-AMPV-C chez ses hôtes non préférentiels que sont la dinde et le poulet (ré-isolement viral et/ou séroconversions possibles en l'absence de détection du gène SH par qRT-PCR). Par ailleurs, les travaux d'alignements de séquence des génomes des AMPV des quatre sous-groupes (Brown et al. 2014), avaient révélé que, bien que SH soit après G la deuxième protéine la moins conservée dans le génome des AMPV, la protéine SH contenait néanmoins des éléments conservés au sein de chacune des deux lignées Us et Fr d'AMPV-C (Figure 18). Ces observations suggéraient que SH pourrait contribuer aux différences de phénotype observé chez les différentes lignées d'AMPV-C.

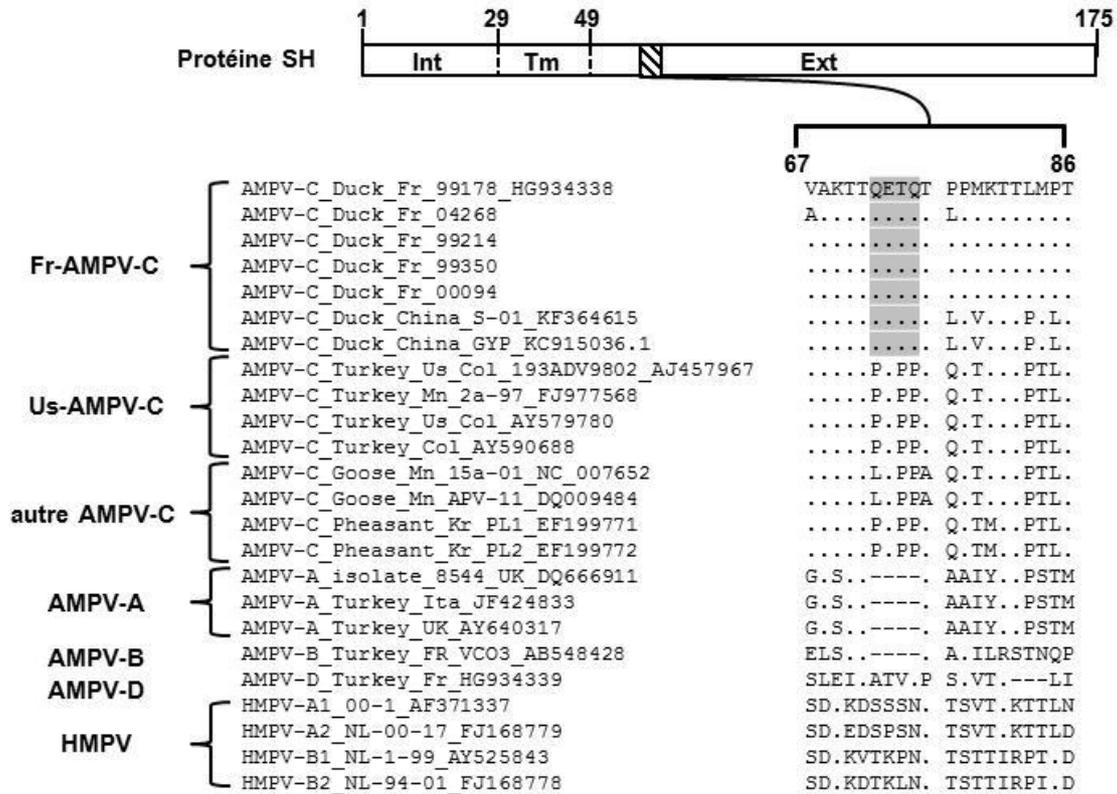


Figure 18 : Alignement des séquences aminopeptidiques des protéines SH des *Metapneumovirus*. La région conservée entre les AMPV-C de canard (Fr-AMPV-C) est indiquée en grisée.

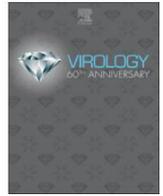
Pour étudier cette question, le système de génétique inverse développé lors de l'étape précédente de nos travaux a été utilisé pour construire un virus recombinant chimérique, ayant le fond génétique du Fr-AMPV-C mais codant la protéine SH d'un virus Us-AMPV-C isolé chez des dindes en 1996 dans l'état du Colorado noté Co-AMPV-C (Toquin et al. 2003). Le phénotype du virus chimérique, noté ${}_{rc}$ Fr-AMPV-C_{SH-Co}, a été comparé à celui du virus recombinant non génétiquement modifié (${}_{rc}$ Fr-AMPV-C) *in vitro* (Séquençage NGS, ECP et cinétiques de répllication virale sur cellules Vero) et *in vivo* chez des canards de barbarie EOPS et chez des dindes EOPS, respectivement hôtes préférentiels des Fr et Us AMPV-C.

Les résultats de cette étude portant sur la détermination du rôle de la protéine SH dans le tropisme d'hôte des AMPV de sous-groupe C sont présentés dans l'article ci-après, publié dans le journal « *Virology* » (Szerman et al. 2019).



Contents lists available at ScienceDirect

Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/virology

The small hydrophobic (SH) gene of North American turkey AMPV-C does not attenuate nor modify host tropism in recombinant European duck AMPV-C



N. Szerman^a, C. Allée^a, E. Lemaitre^a, C. Courtillon^a, M. Amelot^b, D. Courtois^b, C. Naylor^c,
A. Leroux^d, P. Lucas^d, Y. Blanchard^d, N. Eterradossi^a, P.A. Brown^a

^a VIPAC unit, ANSES (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety), Ploufragan/Plouzané laboratory, B.P.53, 22440 Ploufragan, France

^b SELEAC unit, ANSES (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety), Ploufragan/Plouzané laboratory, B.P.53, 22440 Ploufragan, France

^c University of Liverpool, Dept of Infection Biology, Institute of Infection and Global Health, Faculty of Health and Life Sciences, Leahurst Campus CH64 7TE, UK

^d GVB unit, ANSES (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety), Ploufragan/Plouzané laboratory, B.P.53, 22440 Ploufragan, France

ARTICLE INFO

Keywords:

AMPV-C
Muscovy ducks
Reverse genetics
Small hydrophobic, protein

ABSTRACT

Subgroup C Avian Metapneumoviruses (AMPV-C) has two lineages, one mostly in turkeys and one mostly in ducks. To investigate the molecular basis of AMPV-C host tropism, a reverse genetics system for a duck AMPV-C virus was developed. A recombinant copy and a recombinant virus in which the SH protein had been exchanged for that of a turkey AMPV-C were rescued. No change in cytopathogenic effect or replication profile in vitro were observed for either virus compared to the wild type. In SPF Muscovy ducks the wild type and its recombinant copy were equally pathogenic. Exchanging the SH in the recombinant copy produced the same results.

In SPF turkeys, neither recombinant virus was pathogenic, although both showed a low level of replication. Thus, from the current model, it appears that AMPV-C SH proteins derived from the different species are compatible and that turkey SH does not affect duck AMPV-C pathogenicity.

1. Introduction

Avian Metapneumoviruses (AMPV) have been responsible for major economic losses to the poultry industry and following their discovery in the late 1970's in South Africa they are now detected in most parts of the world (Jones and Rautenschlein, 2013). AMPV infection in the field causes respiratory disease in birds with high morbidity (up to 100% of a flock) and variable mortality (0–50%) depending on the severity of bacterial secondary infections. Respiratory disease after AMPV infection of breeding birds is often less pronounced which has been suggested to be a result of better management conditions (Eterradossi et al., 2015) however, in these birds drops in egg production and shell quality often follow the respiratory signs.

AMPVs belong to the order *Mononegavirales* family *Pneumoviridae* genus *Metapneumovirus* (Afonso et al., 2016) and exist as four different subgroups (A to D) based on their genetic and antigenic properties (Bayon-Auboyer et al., 1999; Brown et al., 2014; Eterradossi et al., 1995; Juhasz and Easton, 1994; Seal, 1998). The subgroup C viruses also have two distinct lineages; a US lineage and a Euro / Asian lineage (Toquin et al., 2006b). In general, literature shows turkeys and chickens

to be the conventional hosts of subgroups A and B, turkeys to be the conventional host of subgroup D and US subgroup C lineage, and wild or domestic ducks to be the conventional hosts of US or Euro/Asian subgroup C viruses, respectively. However, until recently this was not confirmed under similar experimental conditions. A recent experimental study was performed where one representative isolate from each subgroup and each AMPV-C lineage was tested in specific pathogen free (SPF) turkeys, chickens and Muscovy ducks (Brown et al., 2018). This study confirmed the previous literature however, sequencing of AMPV-C reisolated from the three bird species also suggested that genome sequence modifications in or around the small hydrophobic (SH) protein open reading frame (ORF) could be linked with host preference (unpublished data). This protein together with the fusion (F) and attachment glycoprotein (G) is located on the surface of the virus, however unlike F and G that have been well characterized (Biacchesi et al., 2004; Brown et al., 2014; de Graaf et al., 2009; Toquin et al., 2003), its function is not well understood. Several studies on viruses belonging to the *Pneumoviridae* family using reverse genetics (RG) have shown however, that deletion of SH results in some level of attenuation (Bukreyev et al., 1997; Ling et al., 2008) and thus it clearly has a role

Corresponding author.

E-mail address: paul.brown@anses.fr (P.A. Brown).
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.10.020>

Received 7 September 2018; Received in revised form 4 October 2018;

Accepted 19 October 2018

Available online 31 October 2018

0042-6822/© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

across viruses of the pneumoviridae family for virus pathogenicity. For subgroup A AMPVs, deletion of this protein has also been shown to alter cytopathic effect (CPE) in vitro (Ling et al., 2008; Naylor et al., 2004), which could be restored to a typical form using SH protein derived from subgroup B AMPV but not from duck subgroup C virus (Ling et al., 2008). Albeit these data were produced in vitro they do demonstrate compatibility of SH proteins from different subgroups of galliform AMPVs and possibly a lack of compatibility of SH proteins of AMPVs from galliforms and palmipeds. This data also supports the hypothesis that SH has some role in species adaptation.

In order to assess whether the AMPV-C SH protein indeed influences the viruses capability to replicate in a “non conventional host” or affect pathogenicity, a first reverse genetics system based on an AMPV-C isolate (Fr-AMPV-C) belonging to the Euro / Asian duck lineage was developed. This system was used to rescue recombinant viruses en-coding either the duck AMPV-C complete backbone with its natural SH ORF or with an SH ORF derived from a turkey AMPV-C virus (AMPV-C Colorado, isolate 193ADV9802). SPF Muscovy ducks and turkeys were inoculated with these viruses and assessed for seroconversion, clinical signs, virus replication, and excretion of live virus over a three-week period.

2. Material and methods

2.1. Construction of Fr-AMPV-C reverse genetics plasmids

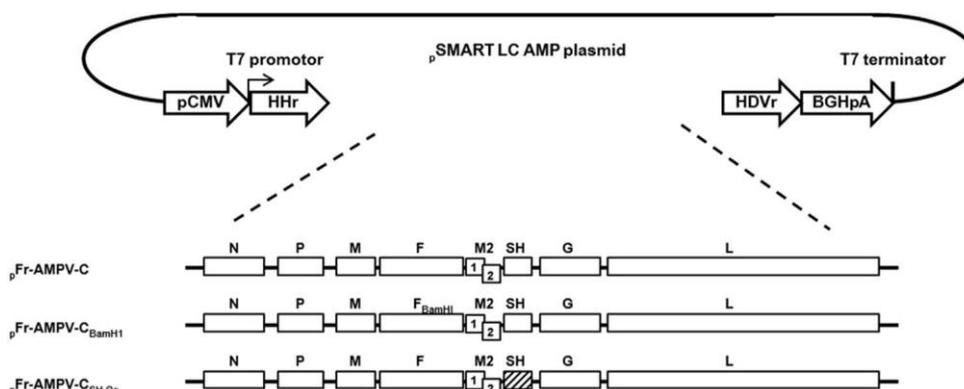
Schematic representations of plasmid constructs described in this section are shown in Fig. 1. Cycling conditions and sequences for the different primer pairs are available upon request. All kits and reagents were used according to manufacturer's instructions unless otherwise indicated.

2.1.1. Full length Fr-AMPV-C plasmid

An exact, full length DNA plasmid copy of the Fr-AMPV-C wild type (ω Fr-AMPV-C) viral genome (accession no. HG934338) was constructed and named ρ Fr-AMPV-C. Construction was achieved in a series of three reverse transcription reactions, eight PCRs and eight ligation steps similar to that described for the construction of the AMPV-A full length clone (Naylor et al., 2004). However, the current study used a blunt end cloning strategy, as opposed to the sticky end cloning strategy employed by Naylor et al. (2004).

Briefly, viral RNA was extracted from Fr-AMPV-C infected Vero cells using Qiamp Viral RNA mini kit (QIAGEN). Three cDNA fragments were generated from extracted RNA in RT reactions using Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Eight blunt ended PCR fragments covering the entire genome were then generated from the cDNA using *Pfu turbo* DNA polymerase (Agilent) and sequentially ligated into pSMART LC Amp plasmid (Lucigen) using T4 DNA ligase (Invitrogen).

The pSMART LC Amp plasmid vector had been previously modified so that inserts were flanked at the 5' end by the following elements:



cytomegalovirus promoter (pCMV)- T7 promoter - hammer head ribozyme (HHr) sequence and at the 3' end by hepatitis delta virus ribozyme (HDVr) - Bovine Growth Hormone polyA sequence (BGHpA) – T7 terminator sequence.

All plasmids were used to transform *Escherichia coli* MAX Efficiency™ Stbl2™ Competent Cells (Invitrogen). At each step in the sequential cloning process, plasmids were extracted from colonies using NucleoSpin® Plasmid kit (Macherey Nagel) followed by restriction di-gest mapping and Sanger sequencing using Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (ThermoFisher). The final plasmid ρ Fr-AMPV-C was extracted using Nucleobond® Xtra Maxi Plus (Macherey Nagel) and was confirmed to have the correct sequence by Sanger sequencing as described above.

2.1.2. ρ Fr-AMPV-C with unique engineered BamHI site

A full length Fr-AMPV-C clone that contained a unique restriction site for the *Bam*HI restriction endonuclease (RE) in the F ORF was generated so that rescued viruses could be differentiated simply from ω Fr-AMPV-C using BamHI digestion (see Section 2.5).

This clone was constructed by site directed mutagenesis (SDM) on ρ Fr-AMPV-C using Phusion Green Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific). The F ORF was modified by synon-ymous mutation to create the site. Cloning procedures, plasmid se-quencing and final plasmid preparation were performed as described for ρ Fr-AMPV-C. The final plasmid with the engineered RE site was named ρ Fr-AMPV-C_{BamHI}

2.1.3. ρ Fr-AMPV-C with SH modification

The full length SH ORF from ρ Fr-AMPV-C was exchanged for that of a North American turkey AMPV-C Colorado isolate reference 193ADV9802 (accession no. AJ457967).

Viral RNA was extracted from Vero cells infected with 193ADV9802 using the Qiamp Viral RNA mini kit (Qiagen). cDNA covering the SH ORF of 193ADV9802 was generated using Maxima H Minus Reverse Transcriptase (Thermo scientific). The full length SH PCR product was generated using Phusion Green Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase. Following purification, this PCR product was used as a “megaprimer” for a SDM reaction on ρ Fr-AMPV-C using Phusion Green Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase. This “megaprimer” technique has been explained previously in detail and shown to be successful for modifying large zones of sequence within an AMPV A RG system (Brown et al., 2011). Cloning procedures, plasmid sequencing and final plasmid preparation were performed as described for ρ Fr-AMV-C.

The ρ Fr-AMV-C plasmid containing the full length SH coding sequence from 193ADV9802 was named ρ Fr-AMPV-C_{SH-Co}

2.2. Plasmids expressing the viral replication proteins

PCR products corresponding to the nucleoprotein (N), the

Fig. 1. schematic representation of produced plasmids, ρ Fr-AMPV-C represents the plasmid containing the exact sequence of ω Fr-AMPV-C virus. ρ Fr-AMPV-C_{BamHI} corresponds to the plasmid with a synonymous mutation in the F ORF introducing a BamHI RE site. ρ Fr-AMPV-C_{SH-Co} corresponds to the ω Fr-AMPV-C consensus sequence with the SH gene exchanged for that of Colorado North American turkey isolate 193ADV9802. pCMV Cytomegalovirus promoter; HHr Hammerhead ribozyme; HDVr Hepatitis delta viral ribozyme; BGHpA Bovine growth hormone poly A; ρ SMART LC Amp (Lucigen).

N. Szerman et al.

phosphoprotein (P) and the full M2 ORFs of Fr-AMPV-C were individually cloned into a pCDNA 3.1 vector (Addgene) using Topo cloning technology. The L ORF was cloned in three sequential cloning steps in the same manner and into pSMART LC Amp as described in Section 2.1. Cloning procedures, plasmid sequencing and final plasmid preparation were performed as described in 2.1. Final plasmids were named pCDNA-N, pCDNA-P, pCDNA-M2 and pSMART-L.

2.3. Recovery of recombinant AMPV-C viruses

Three recombinant (rc) viruses were rescued following the protocol described by Zhang et al. (2016). For rescue, 90% confluent BSRT7 (kind gift from Prof. Dr K. Conzelman, Pettenkofer Institute, München, Germany) cells in 6-well plates (Nunc™ Delta surface, Thermo Scientific) were washed twice with Opti-MEM™ + GlutaMAX™ Reduced Serum Medium (ThermoFisher) and were incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 30 min with 1.5 ml of the same wash medium. The cells were then transfected using lipofectamine 2000 (Invitrogen) and 2.0 µg of pCDNA-N, 2.0 µg of pCDNA-P, 0.5 µg of pCDNA-M2, 1 µg of pSMART-L and 5 µg of either pFr-AMPV-C, pFr-AMPV-C_{BamHI} or pFr-AMPV-C_{SH-Co}. Transfected BSRT7 cells were incubated at 37 °C and 5% CO₂ for four hours, then washed twice with 1 ml of Minimal Essential Medium (MEM, Gibco) and finally cultivated with 2 ml of MEM supplemented with 10% FCS (Eurobio), penicillin, streptomycin and fungizone (200 u/ml, 0.2 mg/ml and 2 µg/ml final concentration respectively) at 37 °C 5% CO₂.

Three days post transfection, 1 ml of supernatants were harvested and stored at -70 °C for later use. Cell sheets were resuspended by pipetting in the remaining 1 ml and then co-cultivated onto pre-established 50% confluent Vero cells in 25 cm² flasks (Corning) in MEM supplemented with HEPES (20 mM), 10% FCS, penicillin, streptomycin and fungizone at 200 u/ml, 0.2 mg/ml and 2 µg/ml final concentration respectively. Successful rescue was confirmed by the development of cytopathic effect (CPE) and immunofluorescent staining using turkey anti-AMPV-C polyclonal antibody (see 2.7), RT-PCR, and BamH1 digestion for rescues using pFr-AMPV-C_{BamHI} (see Section 2.5). Supernatants of positive rescue experiments were inoculated onto confluent Vero cells in 150 cm² flasks. Cell sheets and supernatants were harvested (at the appearance of CPE 4–6 days after inoculation) and homogenized, then centrifuged at 300 g for 5 min at +4 °C and stored at -70 °C as viral stocks. The full length genome sequences of rescued virus stocks were confirmed using next generation sequencing (NGS, see Section 2.4)

Rescued viruses were named rcFr-AMPV-C, rcFr-AMPV-C_{BamHI} and rcFr-AMPV-C_{SH-Co}.

Rescued viruses were named rcFr-AMPV-C, rcFr-AMPV-C_{BamHI} and rcFr-AMPV-C_{SH-Co}.

2.4. NGS analysis of wtFr-AMPV-C, rcFr-AMPV-C and rcFr-AMPV-C_{SH-Co}

RNA was prepared for NGS by centrifugation of the different virus stocks at 17000 g for 10 min at +4 °C followed by RNA extraction using TRIzol LS (Life Technologies). Sequencing was performed using an Ion Proton Sequencer (Life Technologies), details of sequencing protocols and sequence analysis are available upon request.

2.5. Confirmation of viral rescue of rcFr-AMPV-C_{BamHI}

RT-PCR on RNA extracted from supernatants was used to generate a 445 bp amplicon spanning the region in the F gene where the RE site was located. This amplicon was digested with BamHI Fast Digest (Thermo Scientific) for 30 min at 37 °C. Digested products were re-vealed by electrophoresis on 2% agarose gel, positive digestion being expected to result in two products, one of 294 bp and another of 151 bp.

To eliminate possible PCR amplification from transfected full length plasmid DNA, supernatants were treated twice with DNase I, RNase free (Qiagen). The absence of plasmid DNA was confirmed by performing PCRs without prior RT.

2.6. Virus replication kinetics

wtFr-AMPV-C, rcFr-AMPV-C_{BamHI} and rcFr-AMPV-C_{SH-Co} were inoculated onto Vero cells at a m.o.i of 0.05. Briefly, Vero cells at 90% confluence in 96-well plates were inoculated with 50 µl of virus per well, then incubated at 37 °C 1%CO₂. After 1 h of contact, the inoculum was removed, and cells were washed twice with PBS. 250 µl of MEM supplemented with HEPES (20 mM), 2% FCS, penicillin, streptomycin and fungizone at 200 u/ml, 0.2 mg/ml and 2 µg/ml final concentration respectively was added, then the plates were incubated at 37 °C 1%CO₂. At multiple time points post infection (0 h, 12 h, then at day 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 9), supernatants were harvested and stored at -70 °C. Virus titres were determined by microplaque assay using the Reed and Muench method.

2.7. Cytopathogenic effect

Inoculated Vero cells were observed daily for the development of cytopathogenic effect. Cells were observed by white light microscopy and by immunofluorescence after cells had been fixed in 50:50 ethanol / acetone followed by immunostaining using turkey serum raised against Fr-AMPV-C and Fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated anti-turkey antibodies (Rabbit anti turkey IgG H+L, Rockland USA PA).

2.8. Animal experiments

2.8.1. Ethical statement

All animal experiments were performed in agreement with the national regulations on animal welfare from the French Ministry for higher education and research and after approval from the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety's (ANSES) ethical committee and with the permission of the "Haut Commissariat des Biotechnologies" for the use of recombinant viruses.

18-day-old SPF Muscovy ducks and 28-day-old SPF Turkeys (Anses-Ploufragan), housed under BSL2 biosafety conditions, were experimentally infected and then monitored over a three-week period. These ages were chosen as they represent the age when the birds reach a higher sensitivity to respiratory infections. In five separate containment cells, three groups of 15 ducks (D0, D1 and D2) and two groups of 15 SPF turkeys (T1 and T2) were inoculated via the intranasal route with 100 µl of virus at 10^{4.5} TCID₅₀/ml in MEM supplemented with HEPES, penicillin and streptomycin at 20 mM, 200 u/ml, 0.2 mg/ml final concentration respectively. Three days after inoculation five age- and

a) Groups / Inoculum

Species	Group Name	Virus inoculated
Duck	negative controls	MEMH
	D0	wtFr-AMPV-C
	D1	rcFr-AMPV-C
	D2	rcFr-AMPV-C _{SH-Co}
Turkey	negative controls	MEMH
	T1	rcFr-AMPV-C
	T2	rcFr-AMPV-C _{SH-Co}

b) Experimental procedure

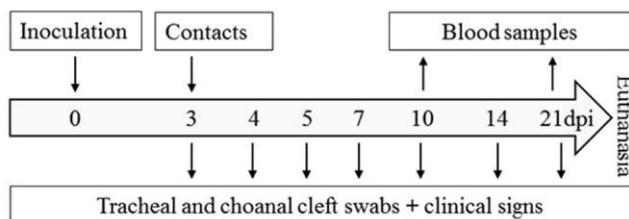


Fig. 2. a) Table showing the inoculum used for each experimental group, b) flow diagram of the experimental procedure from the day of inoculation (0) to the end of the trial (21dpi).

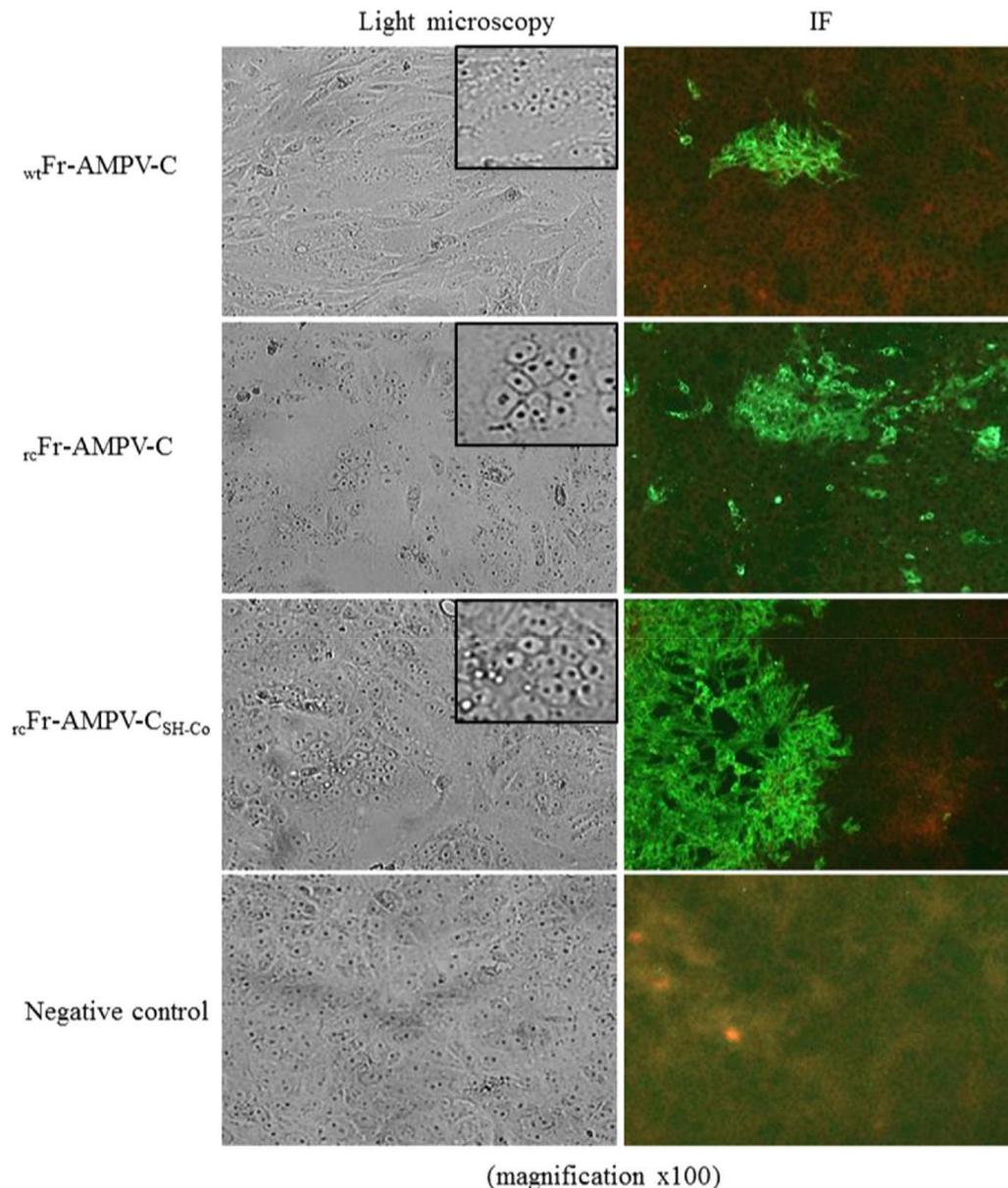


Fig. 3. CPE of $wtFr$ -AMPV-C, $rcFr$ -AMPV-C and $rcFr$ -AMPV-C_{SH-Co} by Light microscopy (left panel) and IF (right panel) in Vero cells. Insets show a zoom of multi-nucleated cells.

species-matched birds were introduced to each group as contacts to monitor horizontal transmission. Details of the specific virus inoculated to a group together with the procedures carried out during the experiment trials are shown in Fig. 2.a. In addition to the procedures shown in Fig. 2.b, two inoculated birds from each group were euthanized at 3, 4, 5, 7 and 10 days post inoculation (dpi), from which trachea, nasal turbinates, lungs, liver, kidneys, testis, bursa of Fabricius, spleen and thymus were collected for future studies concerning tissue distribution that are not discussed in the current paper.

Choanal cleft and tracheal swabs were used to detect AMPV viral RNA loads (see Section 2.9) and to look for excretion of infectious virus by isolation from 5 to 10dpi (see Section 2.10). Blood samples were used to look for the presence of anti-AMPV-C antibodies (see Section 2.11).

A negative control batch composed of five SPF Muscovy ducks and five SPF turkeys were kept under the same conditions as the inoculated subjects. These were inoculated with 100 μ l via the intranasal route with the same MEMH used to prepare viral inoculums (see above) as shown in Fig. 2.a. At 5, 10 and 21dpi, clinical signs were observed

followed by separate swabbing of the choanal cleft and trachea. At 0, 10 and 21dpi blood samples were collected from all subjects. Samples from control birds were analyzed in the same way as those of inoculated birds. Control birds were also euthanized at 21dpi.

2.9. Detecting viral RNA loads by qRT-PCR

RNA was extracted from tracheal and choanal cleft swabs that had been re-suspended in 1.2 ml of MEMH supplemented with penicillin and streptomycin at 200 u/ml and 0.2 mg/ml final concentrations respectively, or from supernatants of cell cultures, using MagAttract Virus Mini M48 Kit (Qiagen). The levels of AMPV specific RNA in these extracts were then assessed using the recently described Pan MPV SYBR green real time RT-PCR (Lemaitre et al., 2018).

2.10. Detecting excretion of infectious Virus

Tracheal and choanal cleft swabs that had been re-suspended as described in Section 2.9 were inoculated directly onto Vero cells for

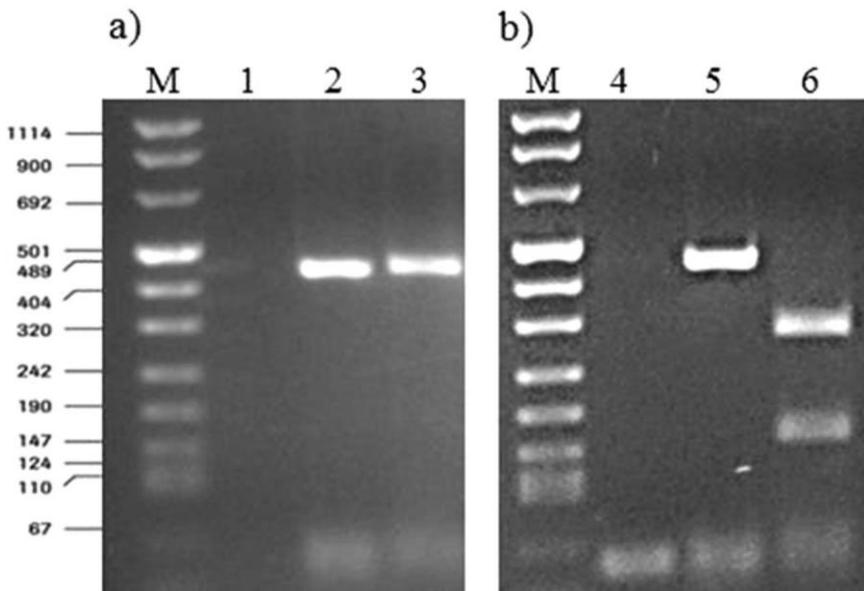


Fig. 4. Electrophoresis gels of PCR products derived from the F gene of wtFr-AMPV-C (a) and rcFr-AMPV-C_{BamHI} (b). M = marker, lanes 1 and 4 represent PCR reactions performed on extracted RNA without prior RT. Lanes 2 and 5 represent undigested RT-PCR products and lanes 3 and 6 represent RT-PCR products digested by BamH1.

virus isolation as previously described (Giraud et al., 1987; Toquin et al., 2006a). Samples were considered negative after three serial passages onto Vero cells

2.11. Detecting anti-AMPV C antibodies by ELISA

Serological testing was performed with an in house ELISA using Fr-AMPV-C antigen as previously described (Toquin et al., 2000)

3. Results

3.1. Recovery of rcAMPVs from cloned cDNAs

rcFr-AMPV-C, rcFr-AMPV-C_{BamHI} and rcFr-AMPV-C_{SH-Co} were successfully rescued in Vero cells as confirmed by partial destruction of the cell sheet and the formation of syncytia following transfection procedures (Fig. 3 left panel) for each recombinant virus. The cell sheets were also positive by IF (Fig. 3 right panel) and their supernatants positive by RT-

3.2. NGS analysis of wtFr-AMPV-C and recombinant viruses rcFr-AMPV-C and rcFr-AMPV-C_{SH-Co}

rcFr-AMPV-C and rcFr-AMPV-C_{SH-Co} were confirmed to have the exact designed genome sequences, corresponding to their parental full length plasmids pFr-AMPV-C and pFr-AMPV-C_{SH-Co}.

3.3. Kinetic analysis (multi-step growth curves)

During the first 24 h post infection, none of the three viruses were detectable by titration assay. 48 h post infection, wtFr-AMPV-C, rcFr-AMPV-C and rcFr-AMPV-C_{SH-Co} were detected at $10^{3.94}$, $10^{3.55}$ and $10^{3.30}$ TCID₅₀/ml respectively. Between 3 and 6dpi all three viruses gave titres equal too or above $10^{3.90}$ with maximum titres of $10^{5.05}$, $10^{4.55}$ and $10^{4.66}$, for wtFr-AMPV-C, rcFr-AMPV-C and rcFr-AMPV-C_{SH-Co} respectively. Titres decreased for all viruses at 9dpi. Titres between the three viruses were within $10^{1.15}$ TCID₅₀/ml from 2 to 9dpi (Fig. 5).

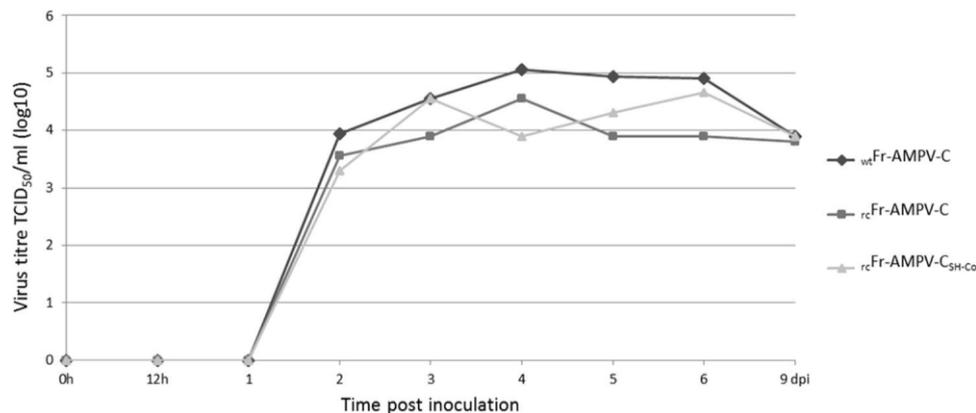


Fig. 5. Multi-step growth curves of wild type and recombinant AMPV viruses inoculated at m.o.i of 0.05 on Vero cells at 0 h. Virus titres were determined by TCID₅₀ assay using Reed and Muench method.

PCR (data not shown). The rescue of rcFr-AMPV-C_{BamHI} was confirmed as BamH1 digestion of the PCR product amplified from its F ORF generated two fragments of the expected size (294 and 151 bp) (Fig. 4. lane 6).

Control reactions without RT were negative (Fig. 4. lanes 1 and 4)

3.4. Animal trials

3.4.1. Clinical signs

From 3 to 7dpi, inoculated birds of groups D0, D1 and D2 (ducks inoculated with wtFr-AMPV-C, rcFr-AMPV-C and rcFr-AMPV-C_{SH-Co})

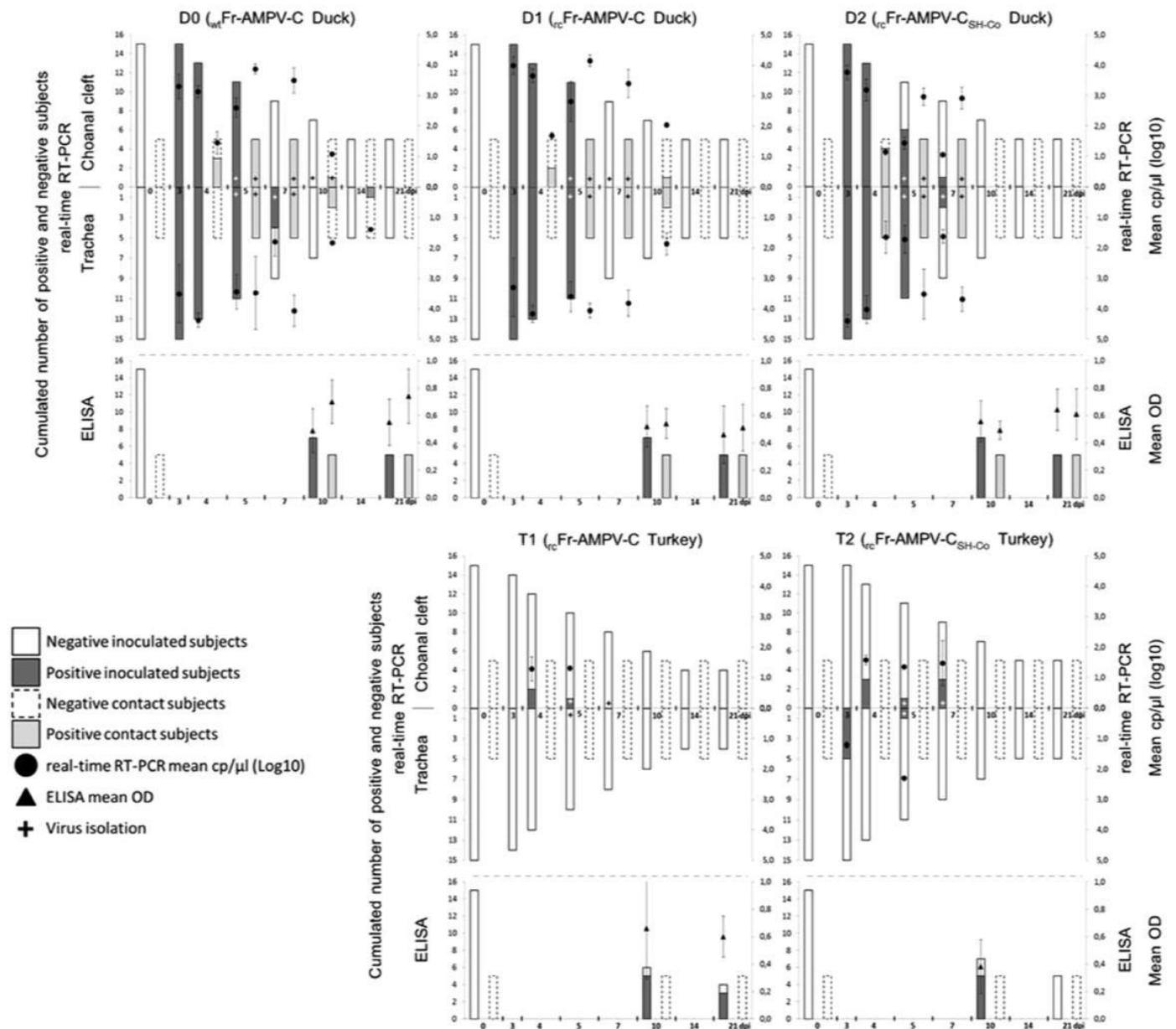


Fig. 6. Representation of the cumulated number of positive and negative subjects by real-time RT-PCR (left Y axis: graphics above dashed lines) and ELISA (left Y axis: graphics below the dashed lines) for duck groups D0, D1 and D2 and turkeys groups T1 and T2 inoculated with their respective viruses. Details of the real-time RT-PCR (mean viral RNA copy number / μ l expressed in log10) and ELISA (mean optical density: OD) are shown in the Y axis's to the right in graphics above and below the dashed lines respectively.

respectively) demonstrated typical clinical signs, principally a heavy congestion in the trachea with occasional sneezing and nasal discharge. Contact birds of the same groups demonstrated the same clinical signs from 5 to 10dpi. Inoculated and contact birds had recovered by 10 and 14dpi respectively and remained free of clinical signs for the remainder of the trial. No clinical signs were observed in groups T1 and T2 throughout the duration of the experiment (turkeys inoculated with r_{c} Fr-AMPV-C and r_{c} Fr-AMPV-C_{SH-Co} respectively).

3.4.2. Viral detection and isolation

The following data are shown graphically in Fig. 6 For groups D0, D1 and D2 (Muscovy ducks inoculated with w_{t} Fr-AMPV-C, r_{c} Fr-AMPV-C and r_{c} Fr-AMPV-C_{SH-Co} respectively) viral RNA was detected from 3dpi in 100% of inoculated birds in both the choanal cleft and trachea with very similar maximum RNA loads in the choanal cleft of $10^{3.29}$, $10^{4.16}$, $10^{3.69}$ cp/ μ l and in the trachea of $10^{4.37}$, $10^{4.40}$, $10^{4.40}$ cp/

μ l respectively. 100% of birds in groups D0 and D1 remained positive in both tissues until 5dpi. After 5dpi no viral RNA was detected in the choanal cleft of groups D0 and D1 or in the trachea of group D1 however, detection continued in the trachea until 7dpi of group D0 yet the percentage of positives had dropped to 44 and the mean viral RNA load to $10^{1.79}$ cp/ μ l. For group D2, viral RNA was detected in both sampling locations until 7dpi. However, in the choanal cleft the percentage of birds and the viral RNA load had dropped to 55 and $10^{1.43}$ cp/ μ l at 5dpi and to 11 and $10^{1.05}$ cp/ μ l at 7dpi. In the trachea a drop in the percentage of positives and viral RNA load was only observed at 7dpi (22 and $10^{1.62}$ cp/ μ l respectively). Horizontal transmission of virus from these in-oculated birds to their respective contacts occurred in all groups with detection of viral RNA as early as 24 h post contact (4dpi Fig. 6). De-tetection could be realized in both sampling locations until 7dpc for groups D0 and D1 however, this stopped at 4dpc for group D2. Viral RNA loads were of similar magnitude between contacts of the different groups and

inoculated birds. Concerning the re-isolation of viruses, both inoculated and contact birds of group D0 were positive from 5 to 10dpi whereas in groups D1 and D2 these birds were positive at 5 and 7dpi.

For groups T1 and T2 (turkeys inoculated with rcFr-AMPV-C and $\text{rcFr-AMPV-C}_{\text{SH-Co}}$ respectively) viral RNA was detected in the choanal cleft of a limited number of inoculated birds at 4 and 5dpi for T1 and at 4, 5 and 7dpi for T2. Viral RNA loads were also low at $10^{1.29}$ and $10^{1.31}$ for T1 and $10^{1.57}$, $10^{1.35}$ and $10^{1.47}$ for T2. No viral RNA was detected in the trachea of T1 birds for the duration of the experiment however, in group T2 a limited number of birds were positive at 3 and 5dpi yet similar to the choanal cleft viral RNA loads were low $10^{1.21}$ and $10^{2.30}$ respectively. Despite the low RNA loads virus was re-isolated from the choanal cleft of both groups at 5 and 7dpi and from the trachea of both groups at 5dpi. No horizontal transmission of virus from these inoculated birds to their respective contacts occurred.

3.4.3. Detection of anti-AMPV C humoral antibodies

Sero conversion was observed in inoculated and contact birds of groups D0, D1 and D2 however only the inoculated birds of groups T1 and T2 seroconverted.

4. Discussion

In this study, the first reverse genetics system based on a duck AMPV-C isolate was developed. This system was then used to assess whether a recombinant version of the Fr-AMPV-C wild type virus was equally pathogenic for ducks and if exchanging its SH protein for that of a turkey AMPV-C could contribute to its adaptation to turkeys.

rcFr-AMPV-C , $\text{rcFr-AMPV-C}_{\text{BamHI}}$ and $\text{rcFr-AMPV-C}_{\text{SH-Co}}$ were successfully rescued using similar methods as previously described for the first AMPV RG system (Naylor et al., 2004) and protocols applied for the rescue of a turkey AMPV-C (Zhang et al., 2016). The RG system described in the current study and those described previously are all based on the transfection of five individual plasmids, four delivering the RNP proteins and one delivering the viral full-length genome. Although these systems are clearly successful it may be of interest in the future to adopt the recently published technique of Liu et al. (2017) for Newcastle disease virus (NDV). In that study the authors constructed one single plasmid to deliver three NDV RNP proteins and a second to deliver the NDV full-length genome. These authors reported an increase in rescue efficiency when adopting the two-plasmid system as opposed to a conventional four-plasmid system and suggested that this was likely due to the reduced number of plasmids required for complete transfection of a single cell. A two plasmid RG system was not considered as a starting point in the current study as controlling the level of expression of each RNP (critical parameter for AMPV rescue) is easier when having a specific plasmid for each protein.

NGS analysis used to confirm the full-length sequences of all viruses in the study highlighted a single nucleotide position (2932) in wild type viruses where a G or T base could be detected in almost equal proportion in the sequencing reads. These nucleotide changes are non-synonymous, coding for either an arginine or isoleucine amino acid at the last codon in the M ORF respectively. At this position, all sequencing reads from recombinant viruses displayed G, corresponding to their plasmid origin designed on the published consensus sequence G at position 2932 (Brown et al., 2014). This difference in homogeneity provided a means of differentiating rcFr-AMPV-C from wild type virus and at the time highlighted an interesting use of NGS data for discriminating clonal virus populations (designed recombinant viruses) from more heterogeneous viral populations (wild type viruses). Application of this technique could be useful for other RG studies eliminating the need for undesirable tags usually introduced to identify re-combinant viruses.

In vitro, differences in viral titres for wtFr-AMPV-C , rcFr-AMPV-C and $\text{rcFr-AMPV-C}_{\text{SH-Co}}$ were within 10^1 TCID₅₀/ml except for one time point between wtFr-AMPV-C and $\text{rcFr-AMPV-C}_{\text{SH-Co}}$ where it was $10^{1.15}$

TCID₅₀/ml. As the precision of the Reed and Muench calculation is within 10^1 TCID₅₀/ml it is reasonable to assume that all three viruses had the same replication kinetics in Vero cells over the selected time period. Furthermore, all three viruses produced the same CPE in Vero cells. IF for $\text{rcFr-AMPV-C}_{\text{SH-Co}}$ appeared to be more extensive in the current tests, however the same extensive staining by IF can often occur with wtFr-AMPV-C virus, and thus this effect cannot be suggested to be associated with differences in phenotype. In addition, the SH ORF derived from a turkey AMPV-C would appear to be functional and compatible in the duck AMPV-C backbone as previous studies have shown that AMPV-A viruses that do not express SH proteins have an altered phenotype in Vero cells producing “giant syncytia” (Ling et al., 2008; Naylor et al., 2004).

In vivo, the recombinant copy of the wild type virus and the re-combinant copy expressing an SH protein derived from turkey AMPV-C were equally pathogenic for Muscovy ducks as the wild type virus. The onset, duration and level of clinical signs, presence of circulating anti-AMPV antibody, RNA loads and duration of its detection, transmission and excretion of infectious virus were almost indistinguishable between the three viruses. Importantly these results showed that the re-combinant Muscovy duck virus, on which the SH modified virus was based, maintained the in vivo phenotype of the parental wild type virus. This was critical for assessing the role of the SH swap. Clearly, in the current study, exchanging the duck AMPV-C SH protein for that of a turkey AMPV-C in a duck AMPV-C backbone did not change the viruses pathogenicity in Muscovy ducks. This strongly supported however, a compatibility of the duck and turkey AMPV-C SH proteins at least in the developed rcFr-AMPV-C backbone. This is hypothesized as the absence of a functional SH protein would have been expected to result in some level of attenuation, as has been observed for AMPVs and other members of the *Pneumoviridae* family (Biacchesi et al., 2005; Bukreyev et al., 1997; Ling et al., 2008).

The recombinant rcFr-AMPV-C did not cause respiratory disease in turkeys under these experimental conditions. However, the detection of viral RNA and isolation of virus from the respiratory tract of a limited number of inoculated birds would suggest that the virus was able to infect and replicate at a low level. Thus, it would seem reasonable to assume that infection of turkeys by duck AMPV-C could occur in the field, in the absence of respiratory signs.

Swapping the SH protein of this virus for the SH of a turkey virus didn't change the viral phenotype in the respiratory tract, however, turkeys inoculated with $\text{rcFr-AMPV-C}_{\text{SH-Co}}$ produced a shorter duration of detectable, circulating antibodies. Clearly the SH protein swaps undertaken in the current study did not enhance replication of rcFr-AMPV-C in the respiratory tract of turkeys. Whether this modification altered re-plication elsewhere in the host remains to be determined in the future.

In conclusion a RG system has been developed for the Euro /Asian duck AMPV-C lineage and used to demonstrate that a recombinant virus based on the consensus sequence of Fr-AMPV-C was equally pathogenic for Muscovy ducks under experimental conditions. Furthermore, for the first time this study shows a compatibility between SH proteins of AMPVs from galliforms and palmipeds. To complement the current study, mirror experiments in which recombinant turkey AMPV-Cs modified to have an SH derived from duck AMPV-C should be performed. This would provide a thorough understanding of the AMPV C SH proteins biological role in AMPV C pathogenesis and host range. However, such extensive studies exceeded the scope of the present study and thus will be undertaken within the frame of future collaborations.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Conseil Général des Côtes d'Armor (CD22) France (Grant 400B) and the Conseil Régional de Bretagne France (Grant 508B) for their financial support. The authors also acknowledge the work of Dr Olivier Guionie.

Conflict of interests

The authors declare that they have no competing financial interests

References

- Afonso, C.L., Amarasinghe, G.K., Banyai, K., Bao, Y., Basler, C.F., Bavari, S., Kuhn, J.H., 2016. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Arch. Virol.* 161, 2351–2360.
- Bayon-Auboyer, M.H., Jestin, V., Toquin, D., Cherbonnel, M., Etteradossi, N., 1999. Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus. *Arch. Virol.* 144, 1091–1109.
- Biacchesi, S., Pham, Q.N., Skiadopoulos, M.H., Murphy, B.R., Collins, P.L., Buchholz, U.J., 2005. Infection of nonhuman primates with recombinant human metapneumovirus lacking the SH, G, or M2-2 protein categorizes each as a nonessential accessory protein and identifies vaccine candidates. *J. Virol.* 79, 12608–12613.
- Biacchesi, S., Skiadopoulos, M.H., Tran, K.C., Murphy, B.R., Collins, P.L., Buchholz, U.J., 2004. Recovery of human metapneumovirus from cDNA: optimization of growth in vitro and expression of additional genes. *Virology* 321, 247–259.
- Brown, P.A., Allée, C., Courtillon, C., Szerman, N., Lemaitre, E., Toquin, D., ... Etteradossi, N., 2018. Host specificity of avian metapneumoviruses. In: *Proceedings of the International Avian Respiratory Disease Conference, Athens, Georgia*, p. 38.
- Brown, P.A., Lemaitre, E., Briand, F.X., Courtillon, C., Guionie, O., Allee, C., Etteradossi, N., 2014. Molecular comparisons of full length metapneumovirus (MPV) genomes, including newly determined French AMPV-C and -D isolates, further supports possible subclassification within the MPV Genus. *PLoS One* 9, e102740.
- Brown, P.A., Lupini, C., Catelli, E., Clubbe, J., Ricchizzi, E., Naylor, C.J., 2011. A single polymerase (L) mutation in avian metapneumovirus increased virulence and partially maintained virus viability at an elevated temperature. *J. Gen. Virol.* 92, 346–354.
- Bukreyev, A., Whitehead, S.S., Murphy, B.R., Collins, P.L., 1997. Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse. *J. Virol.* 71, 8973–8982.
- de Graaf, M., Schrauwen, E.J., Herfst, S., van Amerongen, G., Osterhaus, A.D., Fouchier, R.A., 2009. Fusion protein is the main determinant of metapneumovirus host tropism. *J. Gen. Virol.*
- Etteradossi, N., Toquin, D., Guittet, M., Bennejean, G., 1995. Evaluation of different turkey rhinotracheitis viruses used as antigens for serological testing following live vaccination and challenge. *Vet. Med.* 42, 175–186.
- Etteradossi, N., Toquin, D., Picault, J.P., Jestin, V., 2015. *Métapneumovirose aviaires*. In: Brugère-Picoux, J. (Ed.), *Manuel de pathologie aviaire*, pp. 156–163.
- Giraud, P., Le Gros, F.X., Bouquet, J.F., Toquin, D., Bennejean, G., 1987. Turkey Rhinotracheitis: Isolation of a viral agent and first trials with experimental inactivated or attenuated vaccines. In: *Proceedings of the 36th Western Poultry Disease Conference, Davis, California*, pp. 94–95.
- Jones, R.C., Rautenschlein, S., 2013. Avian Metapneumovirus. In: Swayne, D.E. (Ed.), *Diseases of Poultry*. Wiley-blackwell, pp. 112–138.
- Juhasz, K., Easton, A.J., 1994. Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *J. Gen. Virol.* 75, 2873–2880.
- Lemaitre, E., Allee, C., Vabret, A., Etteradossi, N., Brown, P.A., 2018. Single reaction, real time RT-PCR detection of all known avian and human metapneumoviruses. *J. Virol. Methods* 251, 61–68.
- Ling, R., Sinkovic, S., Toquin, D., Guionie, O., Etteradossi, N., Easton, A.J., 2008. Deletion of the SH gene from avian metapneumovirus has a greater impact on virus production and immunogenicity in turkeys than deletion of the G gene or M2-2 open reading frame. *J. Gen. Virol.* 89, 525–533.
- Liu, H., Albina, E., Gil, P., Minet, C., de Almeida, R.S., 2017. Two-plasmid system to increase the rescue efficiency of paramyxoviruses by reverse genetics: the example of rescuing Newcastle Disease Virus. *Virology* 509, 42–51.
- Naylor, C.J., Brown, P.A., Edworthy, N., Ling, R., Jones, R.C., Savage, C.E., Easton, A.J., 2004. Development of a reverse-genetics system for Avian pneumovirus demonstrates that the small hydrophobic (SH) and attachment (G) genes are not essential for virus viability. *J. Gen. Virol.* 85, 3219–3227.
- Seal, B.S., 1998. Matrix protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first U.S. avian pneumovirus isolate is distinct from European strains. *Virus Res.* 45–52.
- Toquin, D., Bayon-Auboyer, M.H., Senne, D.A., Etteradossi, N., 2000. Lack of antigenic relationship between French and recent North American non-A/non-B turkey rhinotracheitis viruses. *Avian Dis.* 44, 977–982.
- Toquin, D., de Boisseson, C., Beven, V., Senne, D.A., Etteradossi, N., 2003. Subgroup C avian metapneumovirus (MPV) and the recently isolated human MPV exhibit a common organization but have extensive sequence divergence in their putative SH and G genes. *J. Gen. Virol.* 84, 2169–2178.
- Toquin, D., Guionie, O., Allee, C., Morin, Y., Le CoQ, L., Zwingelstein, F., Etteradossi, N., 2006a. Compared susceptibility of SPF ducklings and SPF turkeys to the infection by avian metapneumoviruses belonging to the four subgroups. In: Heffels-Redman, U., Kaleta, E.F. (Eds.), *V. International Symposium on Avian Corona and Pneumoviruses and Complicating Pathogens VVB Lauffersweiler Verlag*. University of Giessen Rauschholzhausen, Germany, pp. 70–76.
- Toquin, D., Guionie, O., Jestin, V., Zwingelstein, F., Allee, C., Etteradossi, N., 2006b. European and American subgroup C isolates of avian metapneumovirus belong to different genetic lineages. *Virus Genes* 32, 97–103.
- Zhang, Y., Sun, J., Wei, Y., Li, J., 2016. A reverse genetics approach for the design of methyltransferase-defective live attenuated avian metapneumovirus vaccines. *Methods Mol. Biol.* 1404, 103–121.

Conclusions

Cet article décrit la mise au point et l'utilisation du premier système de génétique inverse d'un Fr-AMPV-C pathogène chez les canards de barbarie.

Le système, basé sur la séquence de la souche sauvage $_{wt}$ Fr-AMPV-C (wild type), a permis la régénération d'un virus similaire au virus parental ($_{rc}$ Fr-AMPV-C) ou contenant une unique mutation synonyme ($_{rc}$ Fr-AMPV-C_{BamHI}) ainsi que la régénération d'un virus chimérique pour lequel la séquence codante de la protéine SH a été échangée avec celle d'un Us-AMPV-C pathogène chez les dindes. La caractérisation *in vitro* (ECP et cinétique de répllication) et *in vivo* (pathogénicité, détection, séroconversion et transmission) chez des canards et dindes, hôtes respectifs des Fr-AMPV-C et US-AMPV-C a permis d'étudier l'impact de la protéine SH des AMPV-C dans la détermination du spectre d'hôte de ces virus.

Dans un premier temps, le virus Fr-AMPV-C_{BamHI} a été utilisé pour différencier le virus produit en génétique inverse d'un virus sauvage Fr-AMPV-C, grâce à une RT-PCR ciblant le gène F suivie d'une digestion enzymatique révélant la présence du site de restriction BamHI qui était bien absent du virus sauvage. La régénération d'un virus recombinant dont le génome comporte un site de restriction supplémentaire confirme ainsi la fonctionnalité du système de génétique inverse selon le principe déjà évoqué pour la régénération d'un Us-AMPV-C (Govindarajan et al. 2006).

Dans un second temps, le système de génétique inverse a permis de produire le virus $_{rc}$ Fr-AMPV-C qui a été caractérisé en comparaison avec le virus sauvage $_{wt}$ Fr-AMPV-C *in vitro* et *in vivo* chez les canards de barbarie EOPS, pour confirmer que ces deux virus partageaient bien le même pouvoir pathogène chez cette espèce.

Le virus $_{rc}$ Fr-AMPV-C peut être différencié du virus $_{wt}$ Fr-AMPV-C par l'analyse de l'hétérogénéité de la population viral à la position 2932 (gène M) qui révèle 100% de G à cette position pour le virus $_{rc}$ Fr-AMPV-C et 50% de G et T pour le virus $_{wt}$ Fr-AMPV-C. La présence de cette différence de proportion de nucléotide à cette position est un élément suffisant pour retracer l'origine clonale du virus $_{rc}$ Fr-AMPV-C qui provient bien du plasmide dont la séquence à la position 2932 contient un G. *In vitro*, les ECP produits sur cellules Vero par le virus $_{rc}$ Fr-AMPV-C sont strictement identiques à ceux observés avec le virus $_{wt}$ Fr-AMPV-C et correspondent aux observations précédemment effectuées au laboratoire (Toquin et al. 1999, article 1 ; Brown et al. 2019). Les cinétiques de répllication des deux virus sont également indissociables. *In vivo*, le virus $_{rc}$ Fr-AMPV-C a infecté les canards, a reproduit des signes cliniques (râle, éternuement, écoulement nasal), a été détecté dans les écouvillons issus de la fente choanale ou trachéaux, a été réisolé de ces mêmes écouvillons, a induit une séroconversion et s'est

transmis au canards contacts en conservant les mêmes caractéristiques. L'ensemble de ce phénotype viral est lui aussi identique au phénotype présenté par le virus sauvage dans cette étude, ainsi que dans les précédentes études expérimentales réalisées (Toquin et al. 2000, Toquin et al. 2006, Brown et al. 2019). La transmission horizontale aux canards contacts de chacun des lots préalablement inoculés avec les virus $wtFr$ -AMPV-C et $rcFr$ -AMPV-C a révélé une détection moléculaire plus précoce dans la fente choanale, dès 1 jour post contact, tandis que ces virus n'ont été détectés dans la trachée qu'au bout de 2 jours post contact. Cet élément, observé chez des canards contacts infectés par les voies naturelles, suggère que la fente choanale est le premier site de réplication du Fr-AMPV-C chez les canards de barbarie EOPS dans notre contexte expérimental.

Les dindes inoculées par la voie intranasale avec le virus $rcFr$ -AMPV-C n'ont pas développé de signes cliniques et ont présenté une détection virale par qRT-PCR uniquement dans la fente choanale à 4 et 5 jours post infection respectivement pour 2 dindes sur 12 et 1 dinde sur 10. Le virus a aussi été réisolé à partir d'écouvillons choanaux ou trachéaux chez les dindes inoculées qui ont produit une séroconversion décelable dès 10 jours post infection et maintenue jusqu'au terme de l'expérimentation. Les dindes contacts n'ont pas montré de signes d'infection (absence de signe clinique, de détection, d'isolement ou de séroconversion) suggérant fortement une absence de transmission horizontale chez cette espèce. Ce phénotype est comparable à celui qui avait été exprimé par le virus sauvage $wtFr$ -AMPV-C lorsqu'il avait été inoculé à des dindes EOPS lors de nos expérimentations (article 1) ou des expériences précédentes (Toquin et al. 2000, Toquin et al. 2006, Brown et al. 2019). Cependant il est observé ici une absence de transmission horizontale aux dindes contacts (confirmée par l'absence de séroconversion de celles-ci), ce qui ne correspond pas à la transmission horizontale qui avait été observée chez les dindes contacts du Fr-AMPV-C dans l'étude de l'article 1 (Brown et al. 2019). Au-delà des éléments discutés dans l'article 2, de telles différences dans la capacité de transmission horizontale des virus $wtFr$ -AMPV-C et $rcFr$ -AMPV-C pourraient être expliquées si, au sein de la population virale hétérogène de la souche sauvage, une fraction seulement des virus étaient capables de se transmettre chez un hôte non préférentiel (ici la dinde). Dans cette hypothèse, la sous population partageant la séquence consensus du $wtFr$ -AMPV-C (Brown et al. 2014) pourrait donc présenter un phénotype moins adapté au passage chez la dinde.

Pour finir, l'utilisation de ce même système de génétique inverse a permis la production d'un virus chimérique dérivé du $wtFr$ -AMPV-C (adapté aux canards de barbarie) mais codant pour la protéine SH de l'Us-AMPV-C (adapté aux dindes). Il a ainsi été possible d'étudier l'effet de l'échange de la protéine SH sur le phénotype viral *in vitro* et *in vivo*, contrairement aux précédentes études sur cette protéine dans lesquelles SH était soit délétée (Naylor et al. 2004) soit échangée mais étudiée uniquement *in vitro* (Ling et al. 2008).

Nos résultats *in vitro* démontrent le virus chimérique $rcFr$ -AMPV-C_{SH-Co} induit le développement d'ECP sur cellules Vero identique à ceux développés par le virus sauvage $wtFr$ -AMPV-C : l'apport d'un gène

SH provenant d'un virus adapté à une autre espèce n'a pas induit la formation de syncytiums géants résultant de l'activité fusogénique exacerbée qui est observée lorsque SH est délétée chez les AMPV-A (Naylor et al. 2004, Ling et al. 2008) ou remplacée par une protéine SH de Fr-AMPV-C (Ling et al. 2008). Cet élément suggère fortement que les protéines SH des AMPV-C de lignée eurasienne et américaine sont fonctionnellement interchangeables entre elles au sein du fond génétique du Fr-AMPV-C. De manière comparable, la cinétique de réplication virale n'a pas été altérée par l'échange de SH. Ce résultat est semblable à celui obtenu après délétion de SH chez HMPV (Biacchesi et al. 2004), virus le plus proche génétiquement des AMPV-C, et diffère donc de ce qui avait été observé après délétion de SH chez l'AMPV-A (Ling et al. 2008) ou le RSV (Bukreyev et al. 1997).

In vivo, le virus chimérique étudié ici partage le même phénotype que le virus Fr-AMPV-C chez les canards de barbarie EOPS (signes cliniques, détection moléculaire, isolement viral, séroconversion et transmission horizontale) et chez les dindes EOPS (absence de signes cliniques, détection moléculaire, isolement viral séroconversion et absence de transmission horizontale). Ceci démontre que la protéine SH, seule, n'est pas impliquée dans la détermination du tropisme d'hôte des AMPV-C.

En conclusion, l'ensemble de ces éléments indiquent que les virus $_{wt}$ Fr-AMPV-C et $_{rc}$ Fr-AMPV-C ont un phénotype identique *in vitro* et suggère qu'une complémentarité fonctionnelle des protéines SH des différentes lignées d'AMPV-C entre elles. Le phénotype du virus $_{rc}$ Fr-AMPV-C n'est différent de celui du virus $_{wt}$ Fr-AMPV-C que dans la capacité de transmission horizontale chez les dindes EOPS contacts. La séquence consensus utilisée pour la production du virus $_{rc}$ Fr-AMPV-C en génétique inverse correspond bien à la séquence d'un virus pathogène et adapté pour les canards de barbarie EOPS et non pathogène mais capable d'infecter les dindes EOPS qui paraissent être un « cul-de-sac » épidémiologique pour ce virus recombinant. L'échange de la protéine SH d'un virus adapté aux canards par la protéine SH d'un virus adapté aux dindes n'a pas induit de modification du tropisme d'hôte du $_{wt}$ Fr-AMPV-C adapté aux canards suggérant soit que la protéine SH n'intervient pas dans le tropisme d'hôte, soit qu'elle ne suffit pas, seule, à le modifier chez les AMPV-C.

Discussion générale et perspectives

Le travail présenté à l'occasion de cette thèse a été entrepris pour déterminer les bases moléculaires du spectre d'hôte des AMPV. Il s'agissait de compléter les travaux expérimentaux antérieurs du laboratoire qui s'étaient intéressés, au fur et à mesure de leur découverte, au pouvoir pathogène des différents sous-groupes d'AMPV, sans toutefois envisager toutes les combinaisons espèce hôte / virus ni systématiquement documenter les possibilités de portage inapparent et de transmission horizontale à des sujets contacts. Notre travail a donc consisté, pour la première fois, à tester dans des conditions standardisées et au sein d'un seul projet l'infection et la transmission des AMPV-A, B, C de lignée américaine, C de lignée eurasienne et D (article 1). Les éléments d'informations issus de ce projet complètent les données bibliographiques retraçant les espèces chez lesquelles les AMPV ont été détectés par des techniques de biologie moléculaire, de virologie et de sérologie, et contribuent à définir un schéma global du tropisme d'hôte de chaque sous-groupe d'AMPV chez les volailles étudiées (dinde, poulet, canard).

Par ailleurs, de manière à étudier plus précisément les AMPV de sous-groupe C, nous avons développé pour la première fois au sein du laboratoire un système de génétique inverse original, basé sur la séquence d'un AMPV-C de lignée eurasienne (Fr-AMPV-C) adapté aux canards de barbarie (article 2). Le développement d'un tel système était important pour approfondir les connaissances relatives au spectre d'hôte des AMPV. En effet, après l'isolement du premier AMPV-C dans des élevages de dindes aux Etats-Unis (Kleven 1997, Senne et al. 1997) et l'isolement d'un second AMPV-C en France (Toquin et al. 1999) puis en Chine (Sun et al. 2014) dans des élevages de canards de barbarie, des études préliminaires ont montré que ces AMPV-C appartiennent à deux lignées génétiquement distinctes (Brown et al. 2014, Sun et al. 2014) et que ces deux lignées étaient susceptibles de présenter des différences de pouvoir pathogène chez les dindes et les canards EOPS (Shin et al. 2001, Toquin et al. 2006, Brown et al. 2014) ainsi que chez d'autres palmipèdes (Bennett et al. 2005). Après nous être attachés à vérifier expérimentalement ces différences de phénotype au cours de la première partie de notre travail, la confirmation des phénotypes distincts pour ces deux lignées d'AMPV-C dont la séquence génomique était par ailleurs disponible, a fait de ces virus génétiquement proches les uns des autres un excellent modèle pour l'étude des bases moléculaires du tropisme d'hôte.

Depuis 2004, différents laboratoires se sont dotés de systèmes de génétique inverse adaptés aux AMPV. Le premier, développé à l'université de Liverpool (Naylor et al. 2004), a été basé sur une souche d'AMPV-A. Il a permis d'étudier, par délétion, le rôle des gènes SH, G ou M2 *in vivo* chez des dindes (Naylor et al. 2004, Ling et al. 2008). La construction de virus AMPV-A chimères chez lesquels la protéine SH a été remplacée par celles des AMPV-B et C de lignée eurasienne a permis de démontrer *in vitro* une complémentarité fonctionnelle entre les protéines SH des AMPV-A et B, mais pas de possibilités de complémentation par SH de l'AMPV-C de lignée eurasienne (Ling et al. 2008). Par la

suite, le développement d'un système de génétique inverse basé sur l'Us-AMPV-C a permis l'étude du rôle de la protéine G dans la pathogénèse virale chez des dindes (Govindarajan et al. 2010, Yu et al. 2010). Il est projeté par ailleurs d'utiliser la génétique inverse pour le développement de souches vaccinales atténuées dérivées de Us-AMPV-C (Sun et al. 2014). Ces études ne documentaient pas toutefois l'impact des mutations génétiques étudiées chez différentes espèces hôtes (seule la dinde était étudiée). C'est dans l'optique d'étudier cette question que nous avons développé ici le système de génétique inverse basé sur Fr-AMPV-C et que nous l'avons utilisé pour étudier le rôle de certaines séquences spécifiques de Fr-AMPV-C ou Us-AMPV-C, en produisant des virus chimères et en étudiant leur pouvoir infectieux chez leurs espèces hôtes d'origine (respectivement canard et dinde).

1. Place de mes travaux dans la stratégie de recherche du laboratoire vis-à-vis des AMPV

Il n'est pas inutile de repositionner les travaux que j'ai conduit dans la séquence des recherches consacrées aux AMPV par le laboratoire d'accueil.

L'étude des AMPV constitue un sujet de fond du laboratoire d'accueil depuis les travaux initiés pour étudier la première épizootie d'une maladie causée par un AMPV, la rhinotrachéite infectieuse, qui débuta en 1981 en Bretagne dans les élevages de dindes avant d'évoluer en 1986 dans des élevages de poulets en une maladie connue sous le nom de Syndrome Infectieux du Gonflement de la Tête (SIGT, ou Swollen Head Syndrome en anglais) (Andral et al. 1985, Picault et al. 1987).

L'infection des dindes et des poulets par les AMPV induisait le développement de troubles respiratoires chez les jeunes animaux ainsi que des chutes pontes chez les reproducteurs, avec une transmission horizontale à des animaux naïfs ne nécessitant que 48-72h pour de nouveau développer les signes cliniques (Giraud et al. 1986, Picault et al. 1987), ce qui explique le caractère épizootique avec lequel ces maladies se sont propagées au sein des élevages. La flambée épizootique observée suggérait fortement que les élevages étaient naïfs et les agents pathogènes nouvellement introduits. Les pathologies induites, notamment du fait des fréquentes surinfections bactériennes, avaient un impact économique fort sur le développement des filières de production considérées.

Il n'existe pas de données chiffrées permettant d'évaluer l'impact des premiers épisodes survenus en France. Par analogie, l'importance de cet impact peut être estimée d'après les chiffres recueillis aux Etats-Unis suite à l'émergence en 1996-1997 des AMPV-C dans les états du Colorado, du Minnesota et de la Caroline du Nord (respectivement 17^{ème}, 2^{ème} et 1^{er} états producteurs de dinde aux USA en 1997, d'après les données du "United States Department of Agriculture"). Comme observé auparavant en Europe, l'émergence des AMPV-C (qui allaient être identifiés comme constituant la lignée américaine) s'est accompagnée par une importante prévalence en élevages, pouvant atteindre 64,8% des élevages de

dindes dans l'état du Minnesota, et il a été estimé que l'épizootie dans ce seul état avait induit une perte d'un montant de 15 millions de dollars par an sur la période 1998 – 2002 (Goyal et al. 2003).

Face à un évènement sanitaire de cette ampleur, le laboratoire de Ploufragan - alors Laboratoire National de Pathologie Aviaire du ministère de l'agriculture - fut chargé d'étudier l'étiologie virale ou bactérienne de la maladie. Ces travaux aboutirent quasiment simultanément en 1986, en France et au Royaume-Uni, aux premiers isollements du virus responsable sur œufs embryonnés, anneaux de trachées embryonnaires, cultures de fibroblastes ou lignées cellulaires. Cette dernière technique, brevetée au laboratoire, fut à l'origine du développement de tests sérologiques (ELISA, SN), de l'atténuation virale par passage sérié et de la production à large échelle des vaccins atténués correspondants. Ces travaux, combinés au développement de modèles expérimentaux permettant de reproduire la maladie chez la dinde, ont contribué à la mise en place de vaccins (virus vivants atténués destinés aux jeunes animaux et vaccins inactivés adjuvés destinés aux reproducteurs) comme moyen de prophylaxie médicale protégeant efficacement les volailles à l'encontre d'un challenge viral (Giraud et al. 1987, Le Gros 1988).

A partir des années 1990, l'étude des réponses immunitaires générées par les différentes souches virales à l'aide des tests de diagnostic sérologiques dont fait partie l'ELISA indirecte, technique la plus fréquemment utilisée, mais aussi la séro-neutralisation virale (VN), ont permis de mettre en évidence l'existence de variabilité antigénique au sein des AMPV (Etteradossi et al. 1992). Cette variabilité antigénique révéla l'existence des sous-groupes A et B partageant une relative proximité antigénique (Etteradossi et al. 1995), ainsi que d'autres AMPV antigéniquement différents, définis par la suite en sous-groupes C et D (Toquin et al. 1999, Bayon-Auboyer et al. 2000). Le développement d'outils moléculaires de diagnostic a pris en compte les bases moléculaires de cette variabilité antigénique : Une RT-PCR ciblant une région conservée du gène N (Bayon-Auboyer et al. 1999) a ainsi été développée pour le dépistage rapide de tous les sous-groupes d'AMPV (ainsi que sur le même principe et plus récemment un qRT-PCR adaptée au dépistage de tous les MPV [Lemaitre et al. 2018]). Par ailleurs, des RT-PCR classique ou temps réel ciblant des régions variables des gènes G ou SH ont été mises au point pour la différenciation des sous-groupes d'AMPV (Juhász and Easton 1994, Bayon-Auboyer et al. 1999, Bayon-Auboyer et al. 2000) ainsi que la quantification du génome viral par qRT-PCR (Guionie et al. 2007). Pour l'ensemble de ces activités de recherche concernant les AMPV, le laboratoire de Ploufragan a été désigné à partir de 2007 comme laboratoire de référence de l'Organisation Mondiale de la santé animale pour la Rhinotrachéite infectieuse de la dinde, principale maladie provoquée par un AMPV.

Les connaissances et outils relatifs à la diversité antigénique et moléculaire des AMPV ont été mis à profit dans les recherches du laboratoire d'accueil pour caractériser les nouveaux AMPV isolés en 1999 en France dans des élevages de canes reproductrices (Toquin et al. 1999). Ces virus, antigéniquement différents de ceux précédemment isolés en France, ont été rapidement classés dans le même sous-groupe

que l'AMPV apparu aux Etats-Unis en 1996 chez des dindes (Seal 1998), bien qu'il soit apparu par la suite que ces différents virus - bien que proches - appartenaient en fait à des lignées génétiques distinctes (Toquin et al. 2006, Brown et al. 2014). Une autre application importante de ces travaux sur la diversité génétique des AMPV fut développée lors de la découverte chez l'Homme de l'HMPV (van den Hoogen et al. 2001, van den Hoogen et al. 2002, de Graaf et al. 2008, Brown et al. 2014, Sun et al. 2014). Ce virus, isolé puis identifié par une approche de séquençage sans *a priori* à partir de prélèvements de prélèvements effectués à l'occasion d'affections respiratoires chez l'enfant, présentait en effet une séquence génétique apparentée aux AMPV-C. La connaissance du génome des différents sous-groupes d'AMPV et des zones qui restaient conservées y compris chez les AMPV les plus divergents a permis au laboratoire de définir de nouveaux jeux d'amorces très conservées, utilisables y compris pour détecter le virus humain lors des premiers diagnostics de HMPV effectués en France (Freymouth et al. 2003) et plus récemment pour développer une technique de qRT-PCR pan-MPV (Lemaître et al. 2018). La proximité génétique entre les AMPV-C et HMPV explique que les découvreurs du HMPV aient proposé que l'émergence de ce virus se soit produite après qu'un AMPV-C ait franchi la barrière d'espèce des volailles vers l'Homme. Les études de chronophylogénie suggèrent que cet événement se serait produit il y a environ 200 ans (de Graaf et al. 2008).

Mes travaux consistant à développer un système de génétique inverse, motivés par l'intérêt d'investiguer les possibilités de franchissement de barrière d'espèce produits par les AMPV, interviennent donc après un ensemble d'études et de recherches consacrés à ces virus. La mise en œuvre de l'approche "génétique inverse" peut apparaître comme tardive dans cet ensemble, en comparaison de la démarche que l'on serait amené à mettre en œuvre aujourd'hui pour la caractérisation d'un pathogène émergent. En effet, la recherche étiologique dans le cadre des syndromes émergents est aujourd'hui basée sur la mise en œuvre de méthodes de séquençage haut débit et sans *a priori*, qui – lorsqu'elles aboutissent – rendent disponibles la séquence complète des virus émergents (donnée d'entrée indispensable pour la construction des systèmes de génétique inverse) avant même que l'agent viral ait pu être isolé. Par ailleurs, la connaissance de la séquence génétique virale complète permet la sélection des ORF qui pourraient permettre la production d'antigènes recombinants pour le sérodiagnostic, là encore sans que l'agent viral en cause ait nécessairement pu être cultivé. A titre d'exemple le développement d'un système de génétique inverse appliqué pour l'HMPV (Biacchesi et al. 2004) a été réalisé seulement 3 ans après sa découverte (van den Hoogen et al. 2001). Pour des virus émergents tels que le Sosuga virus (Paramyxovirus) (Welch et al. 2018), le virus Schmallerberg (Orthobunyavirus) (Elliott et al. 2013), le virus de l'hépatite E (Orthohepevirus) (Yu et al. 2018), le MERS Coronavirus (Almazán et al. 2013) et le virus ZIKA (Flavivirus) (Avila-Perez et al. 2018) la mise en place de système de génétique inverse a été considérée comme prioritaire suite à la détermination de la séquence génétique de ces divers virus.

2. Caractérisation du phénotype des AMPV en conditions expérimentales

Depuis la découverte des AMPV en 1979 (Buys and Du Prees 1980), ceux-ci ont retrouvés chez de nombreuses espèces dont majoritairement des espèces d'élevages tels que les dindes (Alexander et al. 1986), poulets (Picault et al. 1987) et canards de barbarie (Toquin et al. 1999).

Jusqu'à présent, le spectre d'hôte des AMPV n'a été que partiellement décrit, au sein de multiples études faisant intervenir des conditions expérimentales différentes (espèces inoculées, âge, statut sanitaire EOPS ou non, présence ou non de sujets contacts...). Il a été entrepris ici de compléter les travaux antérieurs par une série de cinq expérimentations harmonisées faisant intervenir des conditions standardisées d'âge, d'inoculation et de détection par des techniques de biologie moléculaire (qRT-PCR), de virologie (isolement viral) et de sérologie (ELISA indirect). L'article 1, retrace l'étude du spectre d'hôte d'une sélection de souches d'AMPV représentatives des virus disponibles au laboratoire, à savoir l'AMPV-A (référence 85051, isolé en 1985, chez la dinde, en France), l'AMPV-B (86004, 1986, dinde, France), l'US-AMPV-C (193adv9802, 1996, dinde, Etats-Unis), le Fr-AMPV-C (99178, 1999, canard de barbarie, France) et l'AMPV-D (85035, 1985, dinde, France).

2.1 Caractérisation des 4 sous-groupes d'AMPV (A, B, C et D)

AMPV-A

Nos résultats démontrent à nouveau que l'AMPV-A possède un pouvoir pathogène net pour la dinde EOPS et qu'il est capable de se transmettre horizontalement chez cette espèce. Ces observations confirment les travaux antérieurs réalisés chez la dinde avec les AMPV-A (Jones et al. 1988, Jones et al. 1992, Naylor et al. 1992, Cook et al. 1996, Toquin et al. 2006). L'infection des poulets EOPS inoculés se développe sans signes cliniques ni transmission horizontale aux poulets EOPS contacts. L'absence de signe clinique chez les poulets EOPS inoculés est cohérente avec les observations précédemment publiées dans la littérature et décrivant l'importance des pathogènes secondaires (absents dans nos expérimentation) dans l'exacerbation de la pathologie induite par un AMPV-A (Majo et al. 1995, Majo et al. 1997). Enfin, les canards apparaissent réfractaires à l'infection par un AMPV-A (absence de signes cliniques, pas de détection moléculaire, ré-isolement impossible, pas de séroconversion et absence de transmission horizontale), confirmant les observations déjà obtenues au laboratoire (Toquin et al. 2006).

Il apparaît alors que l'AMPV-A, dans notre étude ainsi que dans la littérature, a un pouvoir pathogène plus important chez les dindes que chez les poulets. Il a été proposé que cette différence de pouvoir était due à la capacité de l'AMPV-A à se répliquer chez la dinde dans les organes du tractus respiratoire profond (poumons), capacité répliquative qui n'est pas retrouvée chez le poulet (Van de Zande et al. 1999, Aung et al. 2008). Compte-tenu du volume analytique représenté par les expériences rapportées ici,

l'hypothèse d'une réplication dans différents organes n'a pas été explorée. Cependant différents prélèvements ont été récoltés et conservés afin d'étudier l'hypothèse d'une réplication dans d'autres organes, y compris en dehors du tractus respiratoire (poumon, rate, testicules). Ces prélèvements seront exploités ultérieurement, notamment pour la comparaison des niveaux de réplication pulmonaire des AMPV-A chez la dinde et le poulet.

L'absence de transmission horizontale chez le poulet EOPS de la souche utilisée d'AMPV-A utilisée dans notre étude est un résultat à souligner. Ce résultat apparaît en effet contradictoire avec des données épidémiologiques mexicaines démontrant dans deux régions fortement productrices de poulet une large circulation des AMPV-A, avec d'une part une séroprévalence des AMPV-A égale à 100% à partir de 12 semaines chez 48 élevages de futurs reproducteurs des états de Puebla et Jalisco, et d'autre part des confirmations par RT-PCR et séquençage (Rivera-Benitez et al. 2014). Cette large circulation d'AMPV-A au Mexique chez l'espèce poule n'a pas été accompagnée de mise en évidence des AMPV-A chez la dinde dans ce pays alors que l'état de Puebla représente à lui seul 11% de production nationale de dindes en 2013. Le fait que l'AMPV-A soit très présent dans les élevages de poulet au Mexique suggère potentiellement des différences de phénotype entre les AMPV-A isolés au Mexique et celui isolé en France en 1985 qui a été utilisé dans notre étude. Ces différences de phénotype, si elles sont confirmées, sont observées en dépit de 98-99% d'identité de séquence nucléotidique du gène G entre ces deux AMPV-A, ce qui suggère que les bases moléculaires des différences observées seraient à rechercher ailleurs que dans G (Rivera-Benitez et al. 2014). L'ensemble de ces observations encourage à réaliser une étude phénotypique et génotypique plus approfondie de différentes souches d'AMPV-A, incluant les isolats mexicains les plus récents.

AMPV-B

Au cours de nos travaux, l'AMPV-B s'est avéré capable d'infecter les dindes ainsi que les poulets, avec une capacité de transmission horizontale au sein de des deux espèces. Chez les mêmes espèces, ce virus a induit le développement de signes cliniques bien que ceux-ci aient été très limités chez le poulet EOPS dans notre étude. Ces résultats confirment les données de la littérature concernant le pouvoir pathogène des AMPV-B chez les dindes (Giraud et al. 1987, Naylor et al. 1997) et les poulets (Picault et al. 1987, Aung et al. 2008). Comme précédemment évoqué avec l'AMPV-A, les canards apparaissent réfractaires à l'infection par un AMPV-B confirmant les observations déjà obtenues par le laboratoire (Toquin et al. 2006).

L'observation d'une transmission horizontale efficace des AMPV-B à la fois chez la dinde chez la dinde et le poulet (à la différence de ce qui avait été observé avec AMPV-A), suggère que l'AMPV-B est mieux adapté que l'AMPV-A à une transmission chez galliformes. Cet élément pourrait être une des causes expliquant pourquoi, après une détection initiale des différents sous-groupes A, B ou D dans le milieu des années 1980 en France, au Royaume-Uni ou plus récemment au Brésil (Naylor et al. 1997,

Chacon et al. 2007, Guionie et al. 2007), ce sont finalement les AMPV-B qui ont la prévalence la plus importante dans les élevages de galliformes. Il avait été proposé que ce phénomène pourrait être due à la vaccination des dindes avec une souche d'AMPV-A atténuée (Cook et al. 1989), cette vaccination ne conférant qu'une protection partielle à l'encontre de l'AMPV-B et favorisant donc son implantation chez les galliformes (Van de Zande et al. 2000). Cette hypothèse semblait cependant peu probable dans la mesure où, à l'inverse, la vaccination en France à large échelle avec des vaccins dérivés de AMPV-B n'avait pas favorisé la diffusion des AMPV-A. Une meilleure capacité de diffusion des AMPV-B au poulet aurait pu contribuer à la large diffusion de ces virus chez les galliformes, quels que soient les vaccins utilisés chez la dinde (la vaccination du poulet n'est intervenue que plus tard dans les élevages).

AMPV-D

L'AMPV-D étudié partage un phénotype (pouvoir pathogène, détection moléculaire, ré-isolément viral et séroconversion) et une capacité de transmission identique aux AMPV-A et B chez les dindes EOPS. Ces résultats chez les dindes EOPS sont comparables avec ceux obtenus auparavant au laboratoire, qui détient les deux seuls isolats représentatifs des AMPV-D (Toquin et al. 2006). A la différence de ce qui a été observé chez la dinde, l'AMPV-D étudié n'a pas pu être détecté ni réisolé à partir d'écouvillons trachéaux des poulets inoculés, malgré une séroconversion spécifique détectable en ELISA chez ces mêmes poulets. L'impossibilité de mettre en évidence la présence de virus dans la trachée des poulets expérimentalement inoculés suggère fortement que l'AMPV-D, comme l'AMPV-A, possède un site de réplication différent chez cette espèce et chez la dinde. Les prélèvements d'organes (poumon, rate, testicules) déjà mentionnés pourraient, comme pour AMPV-A, être par la suite étudiés de façon à apporter des éléments de réponses concernant le tropisme d'organe de l'AMPV-D chez le poulet. L'inoculation expérimentale de l'AMPV-D à des canards EOPS fournit des résultats comparables à ceux obtenus avec les AMPV-A et B confirmant une expérience préalable du laboratoire suggérant le caractère réfractaire des canards EOPS à l'infection (Toquin et al. 2006).

L'AMPV-D n'a été détecté et isolé qu'à l'occasion de deux foyers de rhinotrachéite infectieuse survenus chez des dindes en France en 1985. L'absence de nouveaux événements de détection de l'AMPV-D chez les volailles d'élevage (dinde, poulet et canard) suggère soit que cet AMPV n'existe plus à l'état naturel (il pourrait comme AMPV-A avoir été supplanté par AMPV-D du fait d'un fitness moindre chez les galliformes) ou bien qu'il existe un potentiel réservoir dans la faune sauvage de cet AMPV, inconnu à ce jour, et que les deux cas identifiés d'infection par AMPV-D avaient été contaminés à partir de ce réservoir. Lors de nouvelles études épidémiologiques dans la faune sauvage, il serait donc intéressant de compléter les tests de groupes qui seraient mis en œuvre (car seuls adaptés au dépistage de tout MPV) par des tests permettant de spécifiquement identifier la présence d'AMPV-D, ceci pour tenter de comprendre la provenance de cet AMPV.

Us-AMPV-C

Le virus Us-AMPV-C présente expérimentalement chez les dindes un fort pouvoir pathogène, comme précédemment décrit au laboratoire (Toquin et al. 2006) et par des équipes étrangères (Cook et al. 1999, Govindarajan et al. 2010), ainsi qu'une capacité à se transmettre horizontalement chez les dindes EOPS qui apparaît identique au pouvoir de diffusion des AMPV-A, B et D chez cette espèce.

L'inoculation expérimentale de poulet EOPS dans notre étude produit une infection asymptomatique sans que le virus puisse être détecté dans les écouvillons trachéaux par une qRT-PCR ciblant le gène SH (Guionie et al. 2007) alors que le virus a été réisolé de ces mêmes écouvillons et qu'une séroconversion ait été observée. L'infection asymptomatique et la séroconversion des poulets EOPS inoculé avec l'Us-AMPV-C confirment la littérature existante (Cook et al. 1999). En revanche, le fait que le réisolement viral soit possible alors que la qRT-PCR est négative suggère que des modifications du gène cible de la qRT-PCR ont pu avoir lieu chez les virus réisolés chez les poulets. L'analyse NGS de la séquence consensus des virus réisolés est en cours dans le but de rechercher des mutations susceptibles d'affecter soit la zone cible de la qRT-PCR, soit le niveau de transcription de l'ARN codant la protéine SH.

Notre étude avec Us-AMPV-C suggère par ailleurs que les canards sont réfractaires à ce virus. Ceci ne correspond cependant pas aux données précédemment obtenues au laboratoire (Toquin et al. 2006), qui décrivaient une infection asymptomatique avec possibilité de réisoler le virus dans la trachée et une séroconversion des canards EOPS. L'inoculum d'Us-AMPV-C utilisé pour l'inoculation des canards dans les expérimentations que nous avons conduites provenait de la même préparation que celle utilisée pour l'inoculation des dindes et des poulets. Cet inoculum ayant démontré un pouvoir infectieux chez les dindes et les poulets, et les virus réisolés chez ces espèces ayant bien été identifiés par séquençage comme correspondant à Us-AMPV-C, l'absence d'infection des canards ne devrait pas résulter d'une perte d'infectiosité de la suspension virale utilisée, ni d'une mauvaise identification de celle-ci. Aucun des autres paramètres de l'inoculation (nature de la souche inoculée, titre de l'inoculum, volume et voie d'inoculation, âge des animaux inoculés, séronégativité vérifiée vis à vis d'AMPV-C au moment de l'inoculation) ne permet d'expliquer les différences observées entre les deux séries d'expériences réalisées à près de dix ans d'intervalle. L'absence de données de séquençage *a posteriori* des virus réisolés aux expérimentations réalisées en 2006 ne permet pas de vérifier si ces virus correspondaient, le cas échéant, à une sous-population virale qui aurait été sélectionnée chez les canards inoculés. Il pourrait être intéressant, maintenant que le NGS est disponible au laboratoire, de vérifier cette hypothèse en étudiant à nouveau et en parallèle, chez la dinde et le canard EOPS, les deux inoculums viraux utilisés en 2006 et 2015.

Fr-AMPV-C

Dans notre série d'expérimentations, le virus Fr-AMPV-C a été le seul AMPV à présenter un pouvoir pathogène ainsi qu'une capacité de transmission horizontale chez les canards EOPS (contrairement à l'ensemble des autres AMPV décrits pour lesquels les canards s'avéraient réfractaires). Ce pouvoir infectieux du Fr-AMPV-C chez le canard est cohérent avec les données issues de deux précédentes études conduites avec Fr-AMPV-C (Toquin et al. 2000, Toquin et al. 2006) et un autre AMPV-C de lignée eurasiennne isolé en Chine chez les canards (Sun et al. 2014).

Chez la dinde EOPS, l'inoculation du Fr-AMPV-C a produit une infection asymptomatique, avec un réisolement viral en dépit d'une absence de détection moléculaire basée sur le gène SH et une séroconversion à 28 jours post infection chez la plupart des sujets inoculés ou contacts, ces derniers démontrant la possibilité de transmission horizontale de Fr-AMPV-C chez la dinde. Cette expérience confirme les données du laboratoire (Toquin et al. 2000, Toquin et al. 2006) concernant le caractère asymptomatique de l'infection des dindes par Fr-AMPV-C.

Les poulets EOPS inoculés par le virus Fr-AMPV-C ont présenté globalement les mêmes caractéristiques que les dindes (infection asymptomatique, non détection par qRT-PCR mais réisolement viral et séroconversion), la seule différence étant que les virus détectés n'ont pas diffusé aux sujets contacts. Chez la dinde comme chez le poulet, l'absence de détection moléculaire de Fr-AMPV-C par une qRT-PCR basée sur le gène SH suggère, comme précédemment évoqué pour l'Us-AMPV-C chez les poulets, une (ou des) mutation(s) du gène SH ou une variation de l'expression de ce gène. Pour répondre à ces hypothèses, l'analyse plus poussée des séquences obtenues par NGS est en cours.

La comparaison phénotypique entre les Fr-AMPV-C et Us-AMPV-C ainsi que les données phylogénétiques de la littérature (de Graaf et al. 2008, Brown et al. 2014, Sun et al. 2014) suggèrent qu'un AMPV-C ancestral, génétiquement plus proche de la lignée eurasiennne, pourrait, par un événement de franchissement de la barrière d'espèces, avoir été impliqué dans l'émergence épizootique de l'Us-AMPV-C chez les dindes aux Etats-Unis en 1996. Le virus nouvellement infectieux pour la dinde se serait adapté à ce nouvel hôte (au point d'après nos résultats de perdre la capacité à infecter le canard) et aurait acquis un pouvoir pathogène pour cet hôte galliforme. Que cette séquence d'événements soit avérée ou non, les différences phénotypiques observées ici entre Fr-AMPV-C et Us-AMPV-C font de ces virus un modèle intéressant pour comprendre quels sont les éléments génétique supports de ces différences et pour mieux comprendre l'évolution de ces virus chez les volailles d'élevage.

2.2 Limites de l'étude expérimentale

Statut EOPS

Comme cela a été évoqué dans le cas de l'absence de signes cliniques chez les poulets EOPS infectés par l'AMPV-A, le statut EOPS de l'ensemble des animaux présents dans notre modèle expérimental peut avoir interféré avec le développement de signes cliniques, en empêchant les complications bactériennes susceptibles de survenir suite aux infections par les AMPV. Il est déjà connu que, pour les dindes et les poulets, le statut EOPS réduit fortement voire abolit le développement de signes cliniques (Naylor et al. 1992, Majo et al. 1995, Majo et al. 1997). Cet élément pourrait aussi bien s'appliquer aux canards bien que dans l'état actuel de la bibliographie, cela n'ait encore jamais été étudié. Dans le protocole expérimental qui a été mis en place pour établir la spécificité d'hôte des AMPV (article 1) il a été délibérément choisi de travailler avec des animaux EOPS pour établir le phénotype des AMPV seuls. Ces résultats peuvent donc ne pas correspondre à ce qui est décrit dans le contexte d'études de cas terrain pour lesquels les animaux présentent possiblement une variété de pathogènes qui ont un rôle secondaire dans l'exacerbation de la maladie provoqué par les AMPV et peuvent induire des complications cliniques aboutissant à une possible mortalité. Il serait donc intéressant d'étudier expérimentalement les interactions possibles entre les pathogènes régulièrement retrouvés chez les canards d'élevages et l'AMPV-C.

Souche virale

L'utilisation d'un virus en tant qu'unique représentant d'un sous-groupe d'AMPV peut introduire un effet souche dépendant vis-à-vis de l'étude du phénotype de ces virus *in vivo* et *in vitro*. Cette hypothèse a notamment déjà été évoquée lors d'études faisant intervenir différents isolats d'AMPV-A d'origine belge ou anglaise (Jones et al. 1988, Van de Zande et al. 1999). Dans le cas de notre étude (article 1), nos résultats décrivent uniquement le phénotype d'isolats français d'AMPV-A, B et D, il est possible que des différences de phénotype apparaissent avec d'autres isolats. Un effet souche-dépendant sur le phénotype pourrait notamment expliquer l'épidémiologie de l'AMPV-A dans les élevages de poulets au Mexique, en effet dans ce pays le virus ne se retrouve que chez cette espèce et semble capable de se transmettre horizontalement entre les poulets (Riviera Benitez et al. 2014). Ceci apparaît être en contradiction avec nos observations sur l'absence de transmission expérimentale de l'isolat d'AMPV-A français aux poulets EOPS contacts. De telles différences dans la capacité de diffusion des souches mexicaine ou française d'AMPV-A justifieraient une étude approfondie pour vérifier la réalité de ces différences de phénotypes dans des conditions expérimentales standardisées et si nécessaire pour en explorer le support génétique.

Tropisme d'organe

Concernant les organes qui ont été étudiés dans les articles 1 et 2, ceux-ci concernent directement la sphère respiratoire supérieure (trachée, fente choanale) car cet ensemble d'organes est classiquement décrit comme site de répllication des AMPV et facilement accessible au prélèvement (Cook et al. 1999, Cook et al. 2000, Sun et al. 2014, Van de Zande et al. 1999, Aung et al. 2008). Par ailleurs nos études n'ont pas eu comme objectif de reproduire une chute de ponte chez des dindes, poulets ou canards sexuellement matures (Jones et al., 1988, Cook et al. 1999, Toquin et al. 1999, Cook 2000), car le format de telles expérimentations animales dépassait les capacités mobilisables dans le cadre de cette thèse. Il a cependant été évoqué dans la littérature la possibilité que les AMPV se répliquent ou puissent être détectés dans d'autres organes, moins ou pas accessibles sans nécessiter une euthanasie et de ce fait peu adaptés à la réalisation d'une étude cinétique telle que celle conduite ici. Parmi ces organes figurent ceux composant le tractus respiratoire supérieur (sinus) et profond (bronches, poumons, sac aériens), ainsi que des organes plus profonds (viscères, oviducte, testicules, organes lymphoïdes, organes filtres...). De façon à pouvoir présenter un tableau complet du tropisme d'espèce mais aussi du tropisme d'organe des AMPV chez les différentes espèces hôtes, nous avons prélevé lors des expérimentations animales 3 organes dans le cadre des travaux de l'article 1 (poumon, rate, testicule) et 9 organes représentant le tractus respiratoire ainsi que les organes profonds dans le cadre des travaux de l'article 2 (sinus, trachée, poumon, foie, rate, reins, thymus, bourse de Fabricius, testicule). L'étude de ces organes en histologie et en qRT-PCR n'a pu être conduite dans les délais de cette thèse et sera effectuée par la suite par le laboratoire.

Autres espèces hôtes

Les travaux présentés dans cette thèse ne concernent que l'étude des AMPV chez leurs principales espèces hôtes d'élevages avec un statut EOPS (dinde, poulet et canard). Les moyens expérimentaux disponibles pour ce travail ne permettaient pas d'étudier l'infectiosité des différentes souches d'AMPV étudiées ici chez d'autres espèces domestiques telles que le faisan (Lee et al. 2007), la pintade (Gough et al. 1988, Litjens et al. 1989, Cook et al. 2002) et l'autruche (Cadman et al. 1994), qui ont toutes été démontrées comme susceptibles d'être infectées par les AMPV en élevage. De même notre étude ne cherchait pas à étudier, au sein de l'avifaune sauvage, quelles espèces pourraient être infectées par les différents AMPV. Au-delà des espèces que nous avons étudiées ici, il reste important d'élucider la prévalence et les espèces réservoirs des AMPV, de façon à comprendre comment ces virus ont été introduits en Afrique du sud en 1978 (Buys et al. 1980) puis en Europe (Andral et al. 1985), en Asie en 1995 (Tanaka et al. 1995) et en Amérique du nord en 1996 (Senne 1996). Des études aux USA ont permis de suggérer un rôle majeur des oiseaux migrateurs dans la propagation de l'Us-AMPV-C en Amérique du Nord (Shin et al. 2000, Turpin et al. 2008, Jardine et al. 2018) sans que cette hypothèse n'ait à ce jour été vérifiée pour le continent Eurasienn autrement que par la détection d'anticorps chez

certaines espèces d'oiseaux marins potentiellement migratrices (et qui pourraient donc avoir véhiculé un virus le long de l'axe migratoire Atlantique) (Heffels-Redman et al. 1998).

3. Développement du système de génétique inverse

L'article 1 permet de tracer un schéma global du spectre d'hôte des différents AMPV. Un des éléments importants est que chacun des virus isolés chez des dindes en France (AMPV-A, B et D) ou aux Etats-Unis (Us-AMPV-C) a été capable d'infecter les dindes appartenant à l'ordre des *Galliformes*, en exprimant un pouvoir pathogène. Ces virus, tous originaires de dindes, se sont cependant tous avérés incapables d'infecter des canards (ordre des *Anseriformes*). A l'opposé, un virus isolé chez le canard (Fr-AMPV-C) a été quant à lui capable d'infecter les canards ainsi que les dindes, de façon asymptomatique. La capacité des AMPV-C isolés chez des palmipèdes à infecter les galliformes sans provoquer de symptômes a déjà été décrite aux Etats-Unis lors de l'isolement d'un AMPV-C de lignée américaine chez une Bernache du Canada (Bennett et al. 2002), puis de son inoculation expérimentale à des dindes (Bennett et al. 2005). Nos résultats viennent étayer l'hypothèse selon laquelle les AMPV-C isolés chez la dinde (Us-AMPV-C) ou le canard (Fr-AMPV-C) ont bien un phénotype différent. Or ces AMPV-C qui représentent les deux lignées eurasienne et américaine partagent au niveau de la séquence de chaque gène de 82 à 99% d'identité aminopeptidique (Brown et al. 2014). Les zones génomiques qui différencient les Fr- et Us-AMPV-C sont nécessairement le support des différences de phénotypes observées entre ces virus et l'étude des zones génomiques correspondantes pourrait apporter des connaissances fondamentales sur les bases moléculaires du tropisme d'hôte chez AMPV-C. Pour répondre expérimentalement à cette question, il a été choisi de développer un système de génétique inverse propre au Fr-AMPV-C (lignée génétique qui n'avait jusqu'alors pas fait l'objet d'un tel développement) et d'utiliser ce système pour incorporer des éléments génétiques dérivés de l'Us-AMPV-C dans le fond génétique du Fr-AMPV-C.

3.1 Intérêt des systèmes de génétique inverse

La manipulation génétique des virus à ARN négatif (*Mononegavirales*) a été une étape essentielle pour permettre une meilleure compréhension du rôle des protéines de ces virus. Tout l'intérêt d'un tel système est de pouvoir produire des virus dont la séquence est contrôlée de façon à élucider l'impact des mutations-délétions ou de l'échange de protéine sur le phénotype viral observé en culture cellulaire ou *in vivo* chez son hôte. De tels systèmes de génétique inverse appliqués à différents AMPV avaient déjà permis d'affiner les connaissances sur les rôles et fonctions des protéines virales, par exemple en i) modifiant les séquences nucléotidique ou aminopeptidique (Naylor et al. 2004), ii) insérant un marqueur génétique (Naylor et al. 2004, Ling et al. 2008, Govindarajan et al. 2010), iii) délétant différentes parties

du génome (Naylor et al. 2004, Ling et al. 2008, Govindarajan et al. 2010), iv) échangeant une partie du génome avec celle d'un autre virus (construction de virus chimères) (Ling et al. 2008) et v) échangeant les plasmides support codant pour les protéines du complexe de réplication pour tester la complémentation croisée entre différents AMPV (Laconi et al. 2016). L'outil de génétique inverse apparaît donc comme un outil indispensable à l'étude fine des bases moléculaires du pouvoir pathogène et de la spécificité d'hôte des AMPV.

Le système de génétique inverse dont le développement a été finalisé durant ces travaux de thèse est le premier à ce jour qui soit basé sur la séquence d'un AMPV-C de lignée eurasienne, pathogène et isolé chez les canards. Son importance réside essentiellement dans la capacité unique du Fr-AMPV-C à infecter expérimentalement les galliformes et les ansériformes. De plus, cet AMPV-C a aussi été décrit comme le virus partageant le plus de similitude avec l'AMPV-C ancestral supposé avoir effectué un franchissement de la barrière d'espèce, passant ainsi des volailles vers l'espèce humaine (De Graaf et al. 2009, Sun et al. 2014, Brown et al. 2014). L'ensemble des domaines que peut donc contribuer à documenter le système développé ici va du tropisme d'hôte et d'organe (objet de la présente étude), à l'évolution génétique des MPV (lorsque notre système sera utilisé en comparaison avec les systèmes de génétique inverse développés pour HMPV [Biacchesi et al. 2004]). L'étude entreprise ici a l'avantage de pouvoir s'appuyer sur des modèles animaux aviaires, dont la mise en œuvre expérimentale est moins contraignante sur le plan de la bioéthique que celle des modèles "primates" utilisés pour l'HMPV, mais il n'est pas exclu que les découvertes sur la biologie des interactions virus-hôtes effectuées chez les oiseaux grâce aux AMPV-C puissent contribuer à la compréhension des interactions virus-hôtes chez les HMPV.

3.2 Etats du système de génétique inverse et améliorations effectuées

Le système de génétique qui a été développé dans cette thèse est construit sur le modèle du premier système de génétique inverse mis au point pour l'AMPV-A (Naylor et al. 2004). Pour cela, l'antigénome viral complet (les travaux de Herfst et al. ayant montré avec HMPV une efficacité meilleure des systèmes basés sur l'antigénome plutôt que sur le génome viral lui-même, [Herfst et al. 2004]) ainsi que les ORF des gènes N, P, M2 et L ont été tous individuellement clonés sous forme d'ADN dans des plasmides d'expression. Le clonage de la séquence complète du Fr-AMPV-C a été effectué par digestions et ligations successives de sept fragments dans le même plasmide suivant la technique utilisée par Naylor et al. 2004. Une technique similaire a été mise en place pour le clonage de l'ORF de L dans son plasmide d'expression, compte tenu de la taille importante du gène à cloner. Les plasmides codant pour les autres protéines du complexe de réplication (N, P et M2) ont été construits par une seule étape de ligation des inserts dans leurs vecteurs individuels. L'ensemble des inserts viraux ont été obtenus par RT-PCR à partir du stock virus ayant permis d'établir la séquence génomique complète de Fr-AMPV-C (Brown et

al. 2014). La séquence de tous les plasmides construits a été vérifiée et confirmée comme étant conforme au consensus par séquençage SANGER.

Bien que calqué sur le premier système développé pour AMPV-A, diverses améliorations ont été apportées par rapport aux systèmes de génétique inverse qui préexistaient pour les AMPV-A, B et Us-AMPV-C. Ainsi, lors du développement du premier système de génétique inverse de l'AMPV-A (Naylor et al. 2004), le plasmide censé contenir la copie intégrale du génome de l'AMPV-A s'était trouvé délété au cours des étapes de clonage de la région codant les protéines SH et G. Pour prévenir ce type de désagréments, toutes de nos étapes de clonage visant à la production d'un plasmide contenant la séquence ADN du Fr-AMPV-C ont été réalisées dans des *E.Coli* Stbl2. Ces bactéries compétentes ont été optimisées pour conserver et amplifier tout plasmide, grâce à une mutation d'inactivation du gène codant endA1, l'endonucléase bactérienne responsable de la dégradation des plasmides. De plus, le plasmide retenu pour le clonage des inserts longs et potentiellement instables (antigénome complet et ORF de L) a été un vecteur pSMART, à faible répllication (low copy) car contenant un « repressor of primer » permettant d'obtenir une seule copie du plasmide recherché par bactérie.

La stratégie de clonage utilisée induit un certain nombre d'inconvénients et d'avantages. L'utilisation de ce système fait ainsi intervenir cinq plasmides, tous essentiels (à l'exception de celui codant pour M2). Ceci implique que lors de la transfection des cellules, seules celles ayant reçu l'ensemble des plasmides va permettre la régénération de virus, la probabilité de recevoir la totalité des plasmides décroît avec le nombre de ceux-ci (par comparaison avec un système bi-plasmide dans lequel toutes les protéines supports sont codées par un seul plasmide polycistronique, voir le système développé pour NDV, [Liu et al. 2017]). Il pourrait être envisagé, pour compenser la rareté des événements de co-transfections, d'augmenter les quantités de plasmides transfectées, mais la transfection engendre une mortalité cellulaire accrue lorsque les quantités de plasmides transfectées augmentent. A l'inverse, l'avantage du système à cinq plasmides mis en œuvre ici - au-delà du fait qu'il a déjà été testé et approuvé pour la régénération d'AMPV - est qu'il permet i) de faire varier les quantités des plasmides transfectées et donc les proportions relatives des différentes protéines du complexe de répllication, et ii) lors d'échange d'un ou de plusieurs plasmides avec ceux d'un autre virus de tester les complémentations fonctionnelles croisées. Par exemple, le plasmide codant l'antigénome complet de l'AMPV-A peut être utilisé pour régénérer des particules virales infectieuses avec les plasmides codant les protéines du complexe de répllication N, P, M2 et L de l'AMPV-B (Laconi et al. 2016), démontrant ainsi les possibilités de complémentation fonctionnelle entre les complexes de répllication de ces deux virus. De façon comparable, Govindarajan et al. (2006) ont démontré la possibilité de régénérer des particules infectieuses de l'Us-AMPV-C en utilisant des plasmides supports dérivés du complexe de répllication de HMPV.

Le système développé dans l'article 2 selon le modèle et protocole préexistant (Naylor et al. 2004, Zhang et al. 2016) pourrait sans doute être amélioré pour augmenter l'efficacité de régénération virale *in vitro*. Pour cela, un récent article (Liu et al. 2017) décrit l'utilisation d'une combinaison de seulement deux plasmides comme plus efficace que la combinaison de plasmides individuels pour la régénération d'un Newcastle Disease Virus lentogène souche LaSota (NDV LaSota). Ces deux plasmides codent pour le premier l'ensemble des protéines support N, P, L et pour le second une copie génomique complète du NDV LaSota. Le NDV LaSota est un paramyxovirus aviaire appartenant à l'ordre *Mononegavirales* qui est faiblement pathogène et pour lequel l'efficacité de régénération *in vitro* est faible en suivant les protocoles classiquement décrits nécessitant un plasmide individuel par élément transfecté. Liu et al. 2017 suggèrent que l'efficacité améliorée du système bi-plasmide, sans doute liée à la fréquence des événements de co-transfection, est avantageuse pour régénérer des virus dont la séquence génomique a été modifiée et la capacité répliquative réduite. Un tel système bi-plasmide n'a pas été construit durant cette thèse mais pourrait offrir une possibilité pour régénérer des AMPV recombinants pour lesquels le protocole décrit dans l'article 2 n'a pas permis de produire de virus recombinants (cf échange du motif de 4 acides aminés dans l'ectodomaine de SH, Figure 18).

Bien qu'il reste des possibilités d'améliorations, notre système apporte un certain nombre d'innovations moléculaires par rapport aux différents systèmes de génétique inverse préexistant pour les AMPV-A (Naylor et al. 2004), AMPV-B (Laconi et al. 2016) et AMPV-C (Govindarajan et al. 2006, Govindarajan et al. 2010, Sun et al. 2014). Ces innovations consistent en l'utilisation combinée des éléments suivants : Promoteur du Cytomégalovirus humain (pCMV), Promoteur du phage T7 (pT7), HammerHead Ribozyme (HHR), Hepatitis delta virus Ribozyme (HDVr), Termineur T7 (T7t). L'utilisation des deux promoteurs rendait envisageable d'optimiser l'expression de l'insert cloné dans le plasmide, en l'occurrence pSMART, et ceci dans différentes cellules transfectées exprimant ou non la polymérase du phage T7 de façon constitutive. La présence des HHR et HDVr permettait, grâce à leurs activités auto-catalytiques respectives en 5' et 3' de l'ARN, de s'assurer que l'ARN transcrit correspondrait au nucléotide près à la séquence consensus clonée dans le plasmide.

La régénération virale a été réalisée en deux étapes successives déjà décrites (Zhang et al. 2016). Dans un premier temps, l'ensemble des plasmides ont été transfectés par lipofection dans des cellules BRST7 cultivées en plaque 6 puits, en utilisant des quantités de plasmides codant les protéines N (2 µg), P (2 µg), M2 (0,5 µg), L (1 µg) et le virus recombinant (5 µg) qui correspondaient aux standards déjà éprouvés dans de précédentes études pour les AMPV-A, B, Us-AMPV-C (Naylor et al. 2004, Ling et al. 2008, Govindarajan et al. 2010, Sun et al. 2014), ainsi que pour l'HMPV (Biacchesi et al. 2004). Les cellules BRST7 sont permissives pour la transcription des AMPV et ont permis d'enclencher la régénération des virus *in vitro*, mais ces cellules ne constituaient pas le meilleur modèle cellulaire pour l'amplification des AMPV car leur durée de survie n'était pas suffisante en tapis cellulaire pour autoriser le plein développement de l'ECP viral. Pour pallier cette difficulté, les cellules transfectées ont été

remises en suspension et co-cultivées avec des cellules Vero qui sont un excellent support d'amplification pour les AMPV (Brevet déposé par l'ANSES Ploufragan en 1986). Suite à cette co-culture, il a été possible d'observer l'apparition d'un ECP correspondant à celui induit par les AMPV-C (Article 2, figure 3), révélant *in fine* la présence de virus.

L'ensemble de ces innovations ont rendu possible la régénération des virus recombinants dont les séquences ont été confirmées exactes par séquençage SANGER ainsi que par NGS. De façon intéressante, l'utilisation du NGS nous a permis de différencier les virus sauvage et recombinant Fr-AMPV-C, qui partagent pourtant la même séquence génomique consensus, grâce à l'étude du polymorphisme des séquences virales composant les stocks de ces différents virus. A titre d'exemple la position 2932 dans le gène M contenait en proportion égale un G ou T pour le virus sauvage Fr-AMPV-C, alors que 100% des séquences obtenues pour le virus recombinant r_c Fr-AMPV-C présentaient à cette position un G, comme présent sur le plasmide dérivé de la séquence consensus du virus sauvage (préalablement déterminée par séquençage SANGER, [Brown et al. 2014]).

3.3 Eléments ayant motivé l'étude par génétique inverse du gène SH des AMPV-C

Dans cette thèse, la première utilisation du système de génétique inverse visant à déterminer les éléments moléculaires potentiellement impliqués dans la détermination du spectre d'hôte des AMPV a consisté en l'introduction de la séquence codant pour le gène SH de l'Us-AMPV-C dans le fond génétique du Fr-AMPV-C. Le choix de nous intéresser en priorité au gène SH a été motivé par les considérations suivantes :

- Variabilité dans les bases de données : SH est la seconde protéine la moins conservée sur le plan aminopeptidique chez les AMPV, juste après la protéine G. Comme celle-ci, elle est présente à la surface de la particule virale et susceptible d'être reconnue par le système immunitaire de l'hôte ou d'interagir avec les cellules cibles dès les premières phases de l'infection. La comparaison des séquences de SH chez Fr-AMPV-C et Us-AMPV-C avec celles des autres AMPV révèle que les protéines SH des AMPV-C partagent 91% d'identité aminopeptidique et que la variabilité est majoritairement contenue dans la partie codant l'ectodomaine prédit de SH. Les séquences aminopeptidiques des protéines SH des Fr-AMPV-C (pathogènes chez les palmipèdes) contiennent toutes un motif moléculaire conservé (QETP) alors qu'à cette même position se trouve chez les Us-AMPV-C (pathogènes chez les dindes) un motif moléculaire lui aussi conservé PEPP (Figure 18). Ces motifs conservés chez les AMPV-C ne sont pas retrouvés chez les autres AMPV-A, B et D.
- Complémentarité fonctionnelle : D'autre part, il apparaît que dans le fond génétique de l'AMPV-A, la protéine SH du Fr-AMPV-C ne restaure pas le phénotype *in vitro* d'un virus

recombinant AMPV-A Δ SH, alors que la protéine de l'AMPV-B restaure le phénotype sauvage (Ling et al. 2008). Ces différences dans la complémentation de AMPV-A Δ SH par les protéines SH de l'AMPV-B ou de l'AMPV-C suggèrent soit que la protéine SH a un rôle biologique différent chez AMPV-C, par comparaison avec AMPV-A, B (et sans doute D), soit que pour exprimer son rôle biologique SH doit interagir avec une autre protéine virale partenaire compatible (qu'il conviendrait donc d'apporter avec SH de l'AMPV-C pour restaurer le phénotype).

- Observations chez les hôtes aviaires non habituels : De plus, notre étude expérimentale montre que lors du passage des Fr- et Us-AMPV-C chez une espèce hôte autre que leurs hôtes d'origine respectifs, canard et dinde, le virus inoculé pouvait être réisolé (Article 1), mais en l'absence de détection par une qRT-PCR ciblant le gène SH. Cette observation suggérait que des modifications génétiques intervenaient lors du passage chez un hôte "non-conventionnel" pour altérer soit la séquence du gène SH soit son niveau de transcription. Nos résultats ayant indiqué que ces altérations ne faisaient pas suite à une délétion du gène (puisque celui-ci est toujours présent sur le génome lors du séquençage NGS des virus réisolés) nous avons procédé à un échange des gènes SH pour établir si SH est associé au tropisme d'hôte ou au pouvoir pathogène des AMPV-C chez les dindes et canards de barbarie EOPS.

Nous avons choisi d'étudier le rôle de la protéine SH chez différentes souches d'AMPV-C en utilisant le système de génétique inverse nouvellement développé pour remplacer, dans le fond génétique du virus Fr-AMPV-C, le gène SH par son homologue dérivé d'une souche de US-AMPV-C isolée dans l'état du Colorado (noté Co-AMPV-C) en 1996 (Senne 1996). L'obtention du plasmide pFr-AMPV-C_{SH-Co} nécessaire à la régénération du virus chimère a nécessité la mise en œuvre de différents protocoles. La première technique utilisée consistait en l'insertion par mutagenèse dirigée de deux sites de restriction de part et d'autre de l'ORF de SH sur le plasmide pFr-AMPV-C, de façon à ensuite insérer par digestion puis ligation l'ORF de SH amplifiée à partir du virus Co-AMPV-C. Cependant les régions en amont et aval de l'ORF de SH ne semblent pas adaptées à cette méthode de mutagenèse puisqu'aucun plasmide porteur des sites de restriction souhaités n'a pu être construit. Une seconde technique a dû être mise en œuvre, qui faisait appel à un « Mégaprimé » correspondant à une amorce ADN double brin de 500 paires de bases. Ce « Mégaprimé » correspondait à la séquence exacte du gène codant SH du virus Co-AMPV-C, allant de l'ATG (codon d'initiation) au TAA (codon stop) du gène SH. Ce Mégaprimé de 500 paires de bases était alors utilisé comme amorce de mutagenèse dirigée avec le plasmide codant le génome complet du Fr-AMPV-C, permettant ainsi la production du plasmide chimérique pFr-AMPV-C_{SH-Co} utilisé dans l'article 2. Cette technique a aussi été utilisée pour produire des plasmides Fr-AMPV-C chimériques dans lesquels seule la région codant pour l'ectodomaine de SH ou seul le motif de quatre

acides aminés PEPP spécifique de l'ectodomaine de SH chez les AMPV-C de lignée américaine avaient été échangés avec les éléments correspondants du Fr-AMPV-C (Figure 18). Ces deux derniers plasmides n'ont cependant pas permis la régénération de virus porteurs des seules mutations attendues (mutations additionnelles dans le cas de l'échange d'ectodomaine, ou absence de régénération virale pour le motif PEPP). L'absence de régénération virale pour le virus contenant le motif aminopeptidique PEPP dérivés du Co-AMPV-C (Figure 18) pourrait suggérer que l'incorporation du motif PEPP modifie la structure de la protéine SH et perturbe le déroulement du cycle viral, si celui-ci est bien enclenché lors de la régénération. En effet, la protéine SH du Co-AMPV-C contient 12 prolines alors que SH du Fr-AMPV-C n'en contient que 9. La plus importante quantité de proline de l'Us-AMPV-C suggère potentiellement que cette protéine SH possède une structure secondaire plus complexe et une hydrophobicité plus importante que la protéine SH du Fr-AMPV-C. Quoiqu'il en soit, les difficultés de régénération des virus porteurs de SH chimériques expliquent que l'étude expérimentale ait ensuite été centrée sur la comparaison des virus chez lesquels SH avait - ou pas - été échangée dans son intégralité.

Suite à la régénération des virus ${}_{rc}$ Fr-AMPV-C et ${}_{rc}$ Fr-AMPV-C_{SH-Co}, le séquençage par la technique de SANGER et le séquençage haut débit (Next Generation Sequencing, NGS) ont été utilisés pour confirmer que les séquences des virus recombinants correspondaient bien à celles des antigénomes transfectés. Concernant le virus recombinant dont la protéine SH a été échangée, l'analyse en Sanger en première intention révélait fréquemment des difficultés pour obtenir la séquence du gène G en entier : sur ces chromatogrammes, il apparaissait en effet fréquemment des insertions de A dans des zones poly A, très présentes sur le gène G, qui perturbaient la lecture du chromatogramme. L'analyse NGS, réalisée en seconde intention, a fourni des résultats plus poussés en indiquant notamment qu'environ 50% des séquences obtenues à partir des stock-virus dont le gène G était difficilement séquençable en SANGER présentaient l'insertion d'un, voire de deux, A dans les zones considérées. Les 50% des séquences restantes correspondaient quant à eux à la bonne séquence. Les transfections ont été répétées jusqu'à obtention d'un stock homogène de chacun des virus étudiés et les stock-virus composés de populations virales hétérogènes ont été écartés des étapes ultérieures de l'étude. Il pourrait être intéressant d'explorer les paramètres qui conduisent à la régénération de stocks viraux homogènes ou au contraire hétérogènes : dans notre protocole de génétique inverse, une quantité de 5µg de plasmide codant pour la copie exacte de l'antigénome virale a été utilisée. Cette forte quantité de matériel génétique pourrait être à l'origine de multiples événements de régénération au sein de la même expérience. Or la production de populations mixtes de virus possédant des mutations ponctuelles (Single Nucleotide Polymorphism) pourrait être le résultat d'événements de régénération multiple de virus. Pour vérifier si tel est le cas, il pourrait être intéressant de tester différentes conditions de concentrations du plasmide pFr-AMPV-C, jusqu'à ce que celui-ci devienne limitant dans le protocole de génétique inverse développé, en vérifiant à chaque fois par NGS si la diminution de la quantité d'antigénome matrice s'accompagne ou non d'une meilleure homogénéité génétique du virus régénéré. Dans ce contexte, l'utilisation du NGS s'est donc révélée être

un outil précieux pour confirmer la lecture de séquence faite en SANGER et apporter des informations essentielles concernant l'homogénéité génétique des populations virales existant dans un même stock viral supposé homogène puisque régénéré par génétique inverse.

3.4 Comparaison *in vivo* du phénotype des virus régénérés par génétique inverse

Les expérimentations *in vivo* entreprises avec le stock-virus régénéré comme décrit aux paragraphes précédents devaient nous permettre de mettre en évidence une éventuelle contribution de SH aux différences de phénotype observées chez les AMPV-C.

La fonction de la protéine SH n'est pas encore à ce jour clairement établie pour les AMPV. Les précédentes études visant à élucider le rôle de SH chez les *Pneumoviridae* ont toutes indiqué que cette protéine est non essentielle *in vitro* (Karron et al. 1997, Ling et al. 2008, Biacchesi et al. 2004, De Graaf et al. 2013). Cependant pour les AMPV-A, sa perte entraîne une diminution de la réplication virale *in vivo* au niveau trachéal chez la dinde et *in vitro* sur cellules BSC-1, ainsi qu'une augmentation de l'activité fusogénique révélée sur les mêmes cellules par une augmentation de la taille des syncytiums (Ling et al. 2008). Cette observation est cohérente avec la démonstration chez HMPV d'une activité inhibitrice de la fusion exercée par SH (Masante et al. 2014). Chez les autres *Pneumoviridae* (HMPV, RSV), il a par ailleurs été démontré que l'absence de SH *in vitro* entraîne une augmentation de la mort cellulaire par apoptose induite par la voie du TNF α (Fuentes et al. 2007, Ren et al. 2012). Il serait alors possible que la perte de SH pour l'AMPV-A Δ SH produit par Ling et al. (2008) ait permis au système immunitaire des dindes infectées par le virus recombinant délété de contrer plus efficacement la réplication virale, aboutissant ainsi à une plus faible réponse systémique détectable en ELISA chez les dindes et à une absence de détection virale au niveau de la trachée par les techniques de détection moléculaire (Ling et al. 2008).

Si un modèle tel que celui décrit au paragraphe précédent était applicable aux AMPV-C, l'absence d'interchangeabilité du gène SH entre Fr-AMPV-C et Co-AMPV-C devrait se traduire par un pouvoir infectieux moindre du virus r_c Fr-AMPV-C_{SH-Co} chez les canards de barbarie. Or nos travaux de l'article 2 démontrent que l'échange des séquences codantes pour la protéine SH entre le Fr et l'Us-AMPV-C dans le fond génétique du Fr-AMPV-C n'impacte pas le phénotype viral *in vitro* : le virus génétiquement modifié ne produit pas de syncytium géant (voir article 2 Figure 3) et présente une cinétique de réplication similaire au virus sauvage (voir article 2 Figure 5). Après inoculation *in vivo* chez la dinde et le canard de barbarie EOPS, les virus r_c Fr-AMPV-C et r_c Fr-AMPV-C_{SH-Co} partagent un pouvoir pathogène identique, une détection moléculaire et sérologique comparable ainsi qu'une capacité de transmission horizontale similaire chez les canards de barbarie EOPS. L'inoculation des dindes EOPS par les deux virus r_c Fr-AMPV-C et r_c Fr-AMPV-C_{SH-Co} reproduit l'infection asymptomatique des dindes comme décrit dans l'article 1, avec la conservation de la détection moléculaire et sérologique des virus chez les sujets inoculés, sans qu'il y ait eu de transmission horizontale aux dindes contacts. En prenant

en compte ces résultats, il est donc raisonnable de penser que les protéines SH des deux souches d'AMPV-C étudiées sont compatibles entre elles dans le fond génétique du Fr-AMPV-C. Cependant et en toute rigueur, un virus contrôle r_{c} Fr-AMPV-C Δ SH chez lequel la protéine SH aurait été délétée (ou la transcription du gène SH abolie) serait néanmoins nécessaire, pour objectiver le phénotype d'un AMPV-C dépourvu de protéine SH fonctionnelle. En effet un tel virus, absent dans notre étude et en cours de construction au laboratoire, n'a pas non plus été produit à ce jour par d'autres équipes (à la différence de AMPV-A Δ SH) et il est donc difficile de se prononcer sur ce que serait le phénotype d'un tel AMPV-C génétiquement modifié. Une comparaison *in vivo* du phénotype des trois virus Fr-AMPV-C, r_{c} Fr-AMPV-C_{SH-Co} et Fr-AMPV-C Δ SH serait l'occasion d'étudier avec tous les contrôles nécessaires l'impact du gène SH de AMPV-C sur le contrôle des réponse TNF α de l'hôte et l'apoptose cellulaire.

Le travail de génétique inverse le plus proche de celui exposé ici est réalisé par De Graaf et al, 2009. Dans cette étude, parmi les divers virus recombinant produits, un virus HMPV chimérique exprimant la protéine SH de l'Us-AMPV-C a été produit par génétique inverse et étudié *in vitro* pour déterminer si la protéine SH pouvait contenir les éléments génétiques associés au tropisme d'hôte mammifère (sur cellule Vero, fibroblaste de singe vert) ou aviaire (sur cellule QT6, fibroblaste de caille). Le virus HMPV-SH_{Us-AMPV-C} partageait un phénotype *in vitro* (titre viral, cinétique de répllication et ECP) strictement similaire à celui du virus HMPV parental suggérant donc une éventuelle compatibilité fonctionnelle entre les protéines SH de l'HMPV et celle de l'Us-AMPV-C mais aussi une éventuelle absence de fonction biologique de ces deux protéines comme cela a été évoqué par la suite pour l'HMPV (De Graaf et al. 2013). Les résultats de l'étude *in vitro* du virus HMPV-SH_{Us-AMPV-C} sont comparables avec ceux que nous avons obtenus dans l'article 2 avec le virus Fr-AMPV-C_{SH-Co} suggérant une compatibilité fonctionnelle des protéines SH et non une absence de fonction étant donné que la délétion de SH seule pour un AMPV-A atténue le phénotype viral *in vitro* et *in vivo* (Ling et al. 2008).

4. Perspectives de travaux complémentaires

4.1 Concernant l'étude du tropisme d'organe ébauchée ici

Il serait intéressant d'achever l'exploitation des échantillons collectés au cours des expérimentations que nous avons conduites pour vérifier si l'échange de la protéine SH aurait pu induire une modification du tropisme d'organe au sein des dindes et canards barbarie EOPS. En effet nos travaux ne se sont intéressés qu'à la détection et à l'isolement d'AMPV dans le tractus respiratoire haut (fente choanale et trachée). Il a été établi lors de multiples études que ces organes permettent bien la détection des AMPV (Cook et al. 2000, Toquin et al. 2006). Cependant, de façon à décrire plus finement la distribution tissulaire des AMPV-C mis en jeu dans cette étude, d'autres organes avaient été prélevés à l'occasion des abattages réalisés à 3, 4, 5, 7, 10 et 21 jours post infection (sinus, trachée, poumon, thymus, rate, rein, foie, testicules, bourse de Fabricius). L'utilisation de ces organes dans une prochaine étude, par RT-PCR ou en faisant intervenir des techniques immunohistochimiques pour mettre en évidence les antigènes viraux

dans les cellules cibles, permettra de mieux décrire le tropisme d'organe des AMPV-C ainsi qu'un éventuel impact de l'échange de SH sur ce dernier (que nous n'avons pas réussi au niveau de la sphère respiratoire haute). Ces futurs travaux permettraient de répondre aux hypothèses de réplication extra-trachéale formulées dans de précédentes études concernant le tropisme d'organe des AMPV *in vivo* (Ling et al. 2008, Toquin et al. 2006) ainsi que pour le RSV délété de SH (Bukreyev et al. 1999).

4.2 Concernant les possibilités de complémentation entre les protéines SH de différents sous-groupes d'AMPV ou de différents MPV

Nous avons évoqué plus haut les travaux de génétique inverse qu'il serait nécessaire d'achever pour générer un virus Fr-AMPV-C Δ SH dont l'étude du phénotype *in vitro* et *in vivo* serait précieuse pour mieux interpréter les résultats présentés ici. Au-delà de ces travaux immédiats, une possible étude complémentaire consisterait en la réalisation d'une expérience miroir à celle menée dans l'article 2, dans laquelle la protéine SH du Fr-AMPV-C serait introduite au sein du virus Co-AMPV-C (en utilisant par exemple le système de génétique inverse développé par Govindarajan et al. 2006). Une telle étude achèverait d'établir si, comme suggéré ici, il y a bien complémentation fonctionnelle des SH entre différentes lignées d'AMPV-C.

Pour approfondir la compréhension de la non compatibilité entre SH_A ou SH_B, d'une part, et SH_C d'autre part (Ling et al. 2008), il pourrait être intéressant de produire un virus chimère Fr-AMPV-CSH_A ou Fr-AMPV-CSH_B et de comparer son phénotype à celui du virus Fr-AMPV-C. En cas de différence de phénotype (probable compte-tenu des résultats de non complémentation obtenus dans le contexte du virus AMPV-A, cf. Ling et al., 2008), la gamme des virus étudiés pourrait être complétée par des virus chimères chez lesquels les domaines intracellulaire, transmembranaire ou extracellulaire de SH auraient été indépendamment ou cumulativement échangés. Les résultats ainsi obtenus pourraient, comparés à ceux des virus Fr-AMPV-C Δ SH et Fr-AMPV-C, permettre de préciser les éléments moléculaires de la protéine SH impliqués dans la compatibilité de celle-ci. Une approche comparable, mise en œuvre avec le virus HMPV-SH_{US-AMPV-C} (généré par De Graaf et al., 2009) et basée sur la construction de virus dotés de SH chimères entre SH_{HMPV} et SH_{US-AMPV-C} permettrait de même de préciser les éléments essentiels à la complémentation entre ces virus.

4.3 Concernant l'étude d'autres protéines virales : F, G et M2.2

Par la suite, il s'agira d'élucider l'implication d'autres éléments génétiques des AMPV-C, telles les protéines de surface F et G. En effet, les travaux de De Graaf consacrés à l'étude de HMPV chimères chez lesquels les glycoprotéines membranaires ont été échangées pour celles de Co-AMPV-C montrent que la protéine F_{Co-AMPV-C} est essentielle pour réorienter l'infectiosité de HMPV des cellules de mammifères chez lesquelles il est normalement propagé vers des cellules aviaires moins permissives

(De Graaf et al. 2009). Sur un modèle comparable, on pourrait imaginer que des différences entre les protéines F des deux lignées Fr- et US-AMPV-C contribuent aux différences de spectre d'hôte confirmées ici. Les protéines F ou G pouvant agir seules ou conjointement avec la protéine SH, il sera crucial de développer des virus recombinants Fr-AMPV-C exprimant - là encore seules ou conjointement - les trois glycoprotéines de surface du Co-AMPV-C. Si une modification du tropisme d'hôte est constatée, il s'agira alors de changer soit la protéine F ou G seules, soit conjointement avec la protéine SH du Co-AMPV-C pour isoler quelle condition est suffisante pour maintenir la modification du tropisme d'hôte.

D'autre part, la protéine M2.2 dont le rôle est décrit comme important pour l'évasion vis-à-vis du système immunitaire pourrait être impliqué dans les différents spectres d'hôte des AMPV-C par l'échappement à divers facteurs de restriction cellulaire. Cette hypothèse est notamment renforcée par des données d'alignements de séquences qui suggèrent que des éléments génétiques pourraient être caractéristiques à chaque lignée d'AMPV-C. Pour tester l'implication de M2.2 il serait donc intéressant d'effectuer l'échange des protéines M2.2 du Co-AMPV-C dans le système de génétique inverse du Fr-AMPV-C et d'évaluer l'impact de cet échange.

Conclusion générale

Nos travaux ont contribué à l'étude des Métapneumovirus aviaires (AMPV). Dans un premier temps, nous avons étudié différentes composantes du phénotype (pouvoir pathogène, capacité répliquative, transmissibilité) dans une approche expérimentale systématique et standardisée *in vivo* chez trois des principales espèces de volaille d'élevage à savoir les dindes, poulets et canards de barbarie. Ces travaux ont permis de confirmer que les AMPV de sous-groupe A, B, Us-C et D, tous isolés et reconnus pathogènes chez les dindes, sont bien adaptés à cet hôte galliforme et sont aussi capables d'infecter expérimentalement les poulets, eux aussi galliformes, sans qu'ils présentent de signes cliniques importants. Ces poulets n'ont par ailleurs pas permis, suite à leur infection expérimentale, de transmission des AMPV-A, Us-C et D à des poulets naïfs. D'autre part il se confirme que le Fr-AMPV-C est le seul des AMPV à être capable d'infecter les canards chez lesquels il est pathogène. Le virus Fr-AMPV-C est le seul à pouvoir aussi infecter expérimentalement, en plus des canards, les dindes et les poulets. L'infection de ces deux dernières espèces par le Fr-AMPV-C semblerait cependant nécessiter une adaptation ou une sélection virale consistant en une altération de l'expression ou une altération de la séquence du gène codant pour la petite protéine hydrophobe SH. Un phénotype similaire a aussi été identifié pour l'Us-AMPV-C inoculé expérimentalement chez des poulets, pour lesquels il a notamment pu être déterminé que l'absence de détection moléculaire de SH en qRT-PCR ne résultait ni d'une délétion ni d'une mutation de ce gène mais de modifications gènes adjacents M2 et G dont l'étude doit se poursuivre.

Dans un second temps, l'étude des bases moléculaires support du spectre d'hôte des AMPV nous a conduit à élaborer le premier système de génétique inverse appliqué à un AMPV-C adapté et pathogène pour les canards de barbarie (Fr-AMPV-C). Cet outil a été utilisé pour la production de virus recombinants, soit identique à la séquence virale d'origine, soit chimérique car porteur de la protéine SH d'un autre AMPV-C (Us-AMPV-C, pathogène pour les dindes). Les deux virus ne présentaient pas de modification *in vitro* de la cinétique de répllication, ni de l'effet cytopathogène. *In vivo*, l'échange de la protéine SH n'a pas induit de modification ou d'altération de la répllication ou de la pathogénicité chez les canards de barbarie et les dindes EOPS. Ces résultats suggèrent que les protéines SH des différentes lignées d'AMPV-C sont probablement fonctionnellement interchangeables au sein du fond génétique du Fr-AMPV-C et que SH n'est pas le support moléculaire du spectre d'hôte de ces virus.

A l'issue de ce travail, le phénotype du spectre d'hôte des AMPV est mieux caractérisé. Le système de génétique inverse du Fr-AMPV-C, maintenant disponible au laboratoire, sera à l'avenir mobilisable pour effectuer des études permettant de compléter les connaissances rattachées au spectre d'hôte des AMPV-C par la production d'autres virus Fr-AMPV-C chimériques exprimant d'autres associations de protéines de Us-AMPV-C.

Références bibliographiques

- Abdel-Azeem, A. A., G. Franzo, A. Dalle Zotte, M. Drigo, E. Catelli, C. Lupini, . . . M. Cecchinato** (2014). "First evidence of avian metapneumovirus subtype A infection in turkeys in Egypt." *Trop Anim Health Prod* 46(6): 1093-1097.
- Abraham, M., N. M. Arroyo-Diaz, Z. Li, J. Zengel, K. Sakamoto and B. He** (2018). "Role of Small Hydrophobic Protein of J Paramyxovirus in Virulence." *J Virol* 92(20).
- Ahmadian, G., P. Chambers and A. J. Easton** (1999). "Detection and characterization of proteins encoded by the second ORF of the M2 gene of pneumoviruses." *J Gen Virol* 80 (Pt 8): 2011-2016.
- Alexander, D. J., R. E. Gough, P. J. Wyeth, S. A. Lister and N. J. Chettle** (1986). "Viruses associated with turkey rhinotracheitis in Great Britain." *Vet Rec.* 1986 Feb 22 118(8):217-8.
- Alkhalaf, A. N., L. A. Ward, R. N. Dearth and Y. M. Saif** (2002). "Pathogenicity, transmissibility, and tissue distribution of avian pneumovirus in turkey poults." *Avian Dis* 46(3): 650-659.
- Almazán, F., M. L. DeDiego, I. Sola, S. Zuñiga, J. L. Nieto-Torres, S. Marquez-Jurado, . . . L. Enjuanes** (2013). "Engineering a replication-competent, propagation-defective Middle East respiratory syndrome coronavirus as a vaccine candidate." *mBio* 4(5): e00650.
- Alvarez, R., L. P. Jones, B. S. Seal, D. R. Kapczynski and R. A. Tripp** (2004). "Serological cross-reactivity of members of the Metapneumovirus genus." *Virus Res* 105(1): 67-73.
- Alvarez, R. and B. S. Seal** (2005). "Identification of a truncated nucleoprotein in avian metapneumovirus-infected cells encoded by a second AUG, in-frame to the full-length gene." *Virol J* 2: 31.
- Andral, B. and C. Louzis** (1982). "La rhinotrachéite de la dinde en Bretagne." *Bulletin d'information des laboratoires de Services Vétérinaires* 7: 33-43.
- Andral, B., C. Louzis, E. Edlinger, J. A. Newman, D. Toquin and G. Bennejean** (1985). "Respiratory disease (rhinotracheitis) in turkeys in Brittany, France, 1981-1982. II. Laboratory findings." *Avian dis* 29(1) 35-42.
- Andral, B., M. Metz, D. Toquin, J. LeCoz and J. Newman** (1985). "Respiratory disease (rhinotracheitis) of turkeys in Brittany, France. III. Interaction of multiple infecting agents." *Avian Dis* 29(1): 233-243.
- Asenjo, A., J. Mendieta, P. Gomez-Puertas and N. Villanueva** (2008). "Residues in human respiratory syncytial virus P protein that are essential for its activity on RNA viral synthesis." *Virus Res* 132(1-2): 160-173.
- Aung, Y. H., M. Liman, U. Neumann and S. Rautenschlein** (2008). "Reproducibility of swollen sinuses in broilers by experimental infection with avian metapneumovirus subtypes A and B of turkey origin and their comparative pathogenesis." *Avian Pathol* 37(1): 65-74.
- Avila-Perez, G., A. Nogales and V. Martin** (2018). "Reverse Genetic Approaches for the Generation of Recombinant Zika Virus." 10(11).
- Banerjee, A. K.** (1987). "Transcription and replication of rhabdoviruses." *Microbiol Rev* 51(1): 66-87.
- Banos-Lara Mdel, R., L. Harvey, A. Mendoza, D. Simms, V. N. Chouljenko, N. Wakamatsu, . . . A. Guerrero-Plata** (2015). "Impact and regulation of lambda interferon response in human metapneumovirus infection." *J Virol* 89(1): 730-742.
- Bao, X., D. Kolli, T. Liu, Y. Shan, R. P. Garofalo and A. Casola** (2008). "Human metapneumovirus small hydrophobic protein inhibits NF-kappaB transcriptional activity." *J Virol* 82(16): 8224-8229.
- Bao, X., T. Liu, Y. Shan, K. Li, R. P. Garofalo and A. Casola** (2008). "Human metapneumovirus glycoprotein G inhibits innate immune responses." *PLoS Pathog* 4(5): e1000077.
- Barik, S.** (1993). "The structure of the 5' terminal cap of the respiratory syncytial virus mRNA." *J Gen Virol* 74 (Pt 3): 485-490.
- Barr, J. and A. J. Easton** (1995). "Characterisation of the interaction between the nucleoprotein and phosphoprotein of pneumonia virus of mice." *Virus Res* 39(2-3): 221-235.
- Baxter-Jones, C., G. P. Wilding and M. Grant** (1986). "Immunofluorescence as a potential diagnostic method for turkey rhinotracheitis." *Vet Rec* 119: 600-601.

- Bayon-Auboyer, M. H., C. Arnauld, D. Toquin and N. Etterradossi** (2000). "Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup." *J Gen Virol* 81(Pt 11): 2723-2733.
- Bayon-Auboyer, M. H., V. Jestin, D. Toquin, M. Cherbonnel and N. Etterradossi** (1999). "Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus." *Arch Virol* 144(6): 1091-1109.
- Bennett, R. S., R. LaRue, D. Shaw, Q. Yu, K. V. Nagaraja, D. A. Halvorson and M. K. Njenga** (2005). "A wild goose metapneumovirus containing a large attachment glycoprotein is avirulent but immunoprotective in domestic turkeys." *J Virol* 79(23): 14834-14842.
- Bennett, R. S., B. McComb, H. J. Shin, M. K. Njenga, K. V. Nagaraja and D. A. Halvorson** (2002). "Detection of avian pneumovirus in wild Canada (*Branta canadensis*) and blue-winged teal (*Anas discors*) geese." *Avian Dis* 46(4): 1025-1029.
- Bennett, R. S., J. Nezworski, B. T. Velayudhan, K. V. Nagaraja, D. H. Zeman, N. Dyer, . . . D. A. Halvorson** (2004). "Evidence of avian pneumovirus spread beyond Minnesota among wild and domestic birds in central North America." *Avian Dis* 48(4): 902-908.
- Biacchesi, S., Q. N. Pham, M. H. Skiadopoulos, B. R. Murphy, P. L. Collins and U. J. Buchholz** (2005). "Infection of nonhuman primates with recombinant human metapneumovirus lacking the SH, G, or M2-2 protein categorizes each as a nonessential accessory protein and identifies vaccine candidates." *J Virol* 79(19): 12608-12613.
- Biacchesi, S., M. H. Skiadopoulos, L. Yang, E. W. Lamirande, K. C. Tran, B. R. Murphy, . . . U. J. Buchholz** (2004). "Recombinant human Metapneumovirus lacking the small hydrophobic SH and/or attachment G glycoprotein: deletion of G yields a promising vaccine candidate." *J Virol* 78(23): 12877-12887.
- Blocquel, D., J. M. Bourhis, J. F. Éléouët, D. Gerlier, J. Habchi, M. Jamin, . . . F. Yabukarski** (2012). "Transcription et réplication des Mononegavirales : une machine moléculaire originale." *Virologie* 16: 225-257.
- Briese, T., J. C. de la Torre, A. Lewis, H. Ludwig and W. I. Lipkin** (1992). "Borna disease virus, a negative-strand RNA virus, transcribes in the nucleus of infected cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(23): 11486-11489.
- Britton, P., P. Green, S. Kottier, K. L. Mawditt, Z. Penzes, D. Cavanagh and M. A. Skinner** (1996). "Expression of bacteriophage T7 RNA polymerase in avian and mammalian cells by a recombinant fowlpox virus." *J Gen Virol* 77 (Pt 5): 963-967.
- Brown, P. A., C. Allee, C. Courtillon, N. Szerman, E. Lemaitre, D. Toquin, . . . N. Etterradossi** (2019). "Host specificity of avian metapneumoviruses." *Avian Pathol*: 1-8.
- Brown, P. A., M. Bonci, E. Ricchizzi, R. C. Jones and C. J. Naylor** (2009). "Identification of two regions within the subtype A avian metapneumovirus fusion protein (amino acids 211-310 and 336-479) recognized by neutralizing antibodies." *Virus Res* 146(1-2): 13-18.
- Brown, P. A. and N. Etterradossi** (2018). "Avian Metapneumovirus." *Avian Virology*.
- Brown, P. A., E. Lemaitre, F. X. Briand, C. Courtillon, O. Guionie, C. Allee, . . . N. Etterradossi** (2014). "Molecular Comparisons of Full Length Metapneumovirus (MPV) Genomes, Including Newly Determined French AMPV-C and -D Isolates, Further Supports Possible Subclassification within the MPV Genus." *PLoS One* 9(7): e102740.
- Brown, P. A., C. Lupini, E. Catelli, J. Clubbe, E. Ricchizzi and C. J. Naylor** (2011). "A single polymerase (L) mutation in avian metapneumovirus increased virulence and partially maintained virus viability at an elevated temperature." *J Gen Virol* 92(Pt 2): 346-354.
- Brugère-Picoux, J., P and S. Amer** (1992). "Manuel de pathologie aviaire." Maisons-Alfort : École nationale vétérinaire.
- Buchholz, U. J., S. Biacchesi, Q. N. Pham, K. C. Tran, L. Yang, C. L. Luongo, . . . P. L. Collins** (2005). "Deletion of M2 gene open reading frames 1 and 2 of human metapneumovirus: effects on RNA synthesis, attenuation, and immunogenicity." *J Virol* 79(11): 6588-6597.
- Buchholz, U. J., S. Finke and K. K. Conzelmann** (1999). "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." *J Virol* 73(1): 251-259.

- Bukreyev, A., B. R. Murphy and P. L. Collins** (2000). "Respiratory syncytial virus can tolerate an intergenic sequence of at least 160 nucleotides with little effect on transcription or replication in vitro and in vivo." *J Virol* 74(23): 11017-11026.
- Bukreyev, A., S. S. Whitehead, B. R. Murphy and P. L. Collins** (1997). "Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse." *J Virol* 71(12): 8973-8982.
- Buys, S. B. and J. H. Du Prees** (1980). "A preliminary report on the isolation of a virus causing sinusitis in turkeys in South Africa and attempts to attenuate the virus." *Turkeys* 28: 36.
- Buys, S. B., J. H. Du Preez and H. J. Els** (1989). "Swollen head syndrome in chickens: a preliminary report on the isolation of a possible aetiological agent." *J S Afr Vet Assoc* 60(4): 221-222.
- Cadman, H. F., P. J. Kelly, R. Zhou, F. Davelaar and P. R. Mason** (1994). "A serosurvey using enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies against poultry pathogens in ostriches (*Struthio camelus*) from Zimbabwe." *Avian Dis* 38(3): 621-625.
- Cai, H., Y. Zhang, M. Lu, X. Liang, R. Jennings, S. Niewiesk and J. Li** (2016). "Phosphorylation of Human Metapneumovirus M2-1 Protein Upregulates Viral Replication and Pathogenesis." *J Virol* 90(16): 7323-7338.
- Cai, H., Y. Zhang, Y. Ma, J. Sun, X. Liang and J. Li** (2015). "Zinc binding activity of human metapneumovirus M2-1 protein is indispensable for viral replication and pathogenesis in vivo." *J Virol* 89(12): 6391-6405.
- Calain, P. and L. Roux** (1993). "The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA." *J Virol* 67(8): 4822-4830.
- Carter, S. D., K. C. Dent, E. Atkins, T. L. Foster, M. Verow, P. Gorny, . . . J. N. Barr** (2010). "Direct visualization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus reveals the structural basis for membrane permeability." *FEBS Lett* 584(13): 2786-2790.
- Castagne, N., A. Barbier, J. Bernard, H. Rezaei, J. C. Huet, C. Henry, . . . J. F. Eleouet** (2004). "Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus P-P and P-N protein complexes and localization of the P protein oligomerization domain." *J Gen Virol* 85(Pt 6): 1643-1653.
- Catelli, E., M. Cecchinato, C. E. Savage, R. C. Jones and C. J. Naylor** (2006). "Demonstration of loss of attenuation and extended field persistence of a live avian metapneumovirus vaccine." *Vaccine* 24(42-43): 6476-6482.
- Cavanagh, D.** (2001). "Innovation and discovery: the application of nucleic acid-based technology to avian virus detection and characterization." *Avian Pathol* 30(6): 581-598.
- Cavanagh, D. and T. Barrett** (1988). "Pneumovirus-like characteristics of the mRNA and proteins of turkey rhinotracheitis virus." *Virus Res* 11(3): 241-256.
- Cecchinato, M., E. Catelli, C. Lupini, E. Ricchizzi, S. Proserpi and C. J. Naylor** (2014). "Reversion to virulence of a subtype B avian metapneumovirus vaccine: is it time for regulators to require availability of vaccine progenitors?" *Vaccine* 32(36): 4660-4664.
- Cevik, B., D. E. Holmes, E. Vrotsos, J. A. Feller, S. Smallwood and S. A. Moyer** (2004). "The phosphoprotein (P) and L binding sites reside in the N-terminus of the L subunit of the measles virus RNA polymerase." *Virology* 327(2): 297-306.
- Cha, R. M., M. Khatri and J. M. Sharma** (2007). "B-cell infiltration in the respiratory mucosa of turkeys exposed to subtype C avian metapneumovirus." *Avian Dis* 51(3): 764-770.
- Cha, R. M., Q. Yu and L. Zsak** (2013). "The pathogenicity of avian metapneumovirus subtype C wild bird isolates in domestic turkeys." *Virol J* 10: 38.
- Chacon, J. L., P. E. Brandao, M. Buim, L. Villarreal and A. J. Ferreira** (2007). "Detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and molecular characterization of subtype B avian metapneumovirus isolated in Brazil." *Avian Pathol* 36(5): 383-387.
- Chambers, P., C. R. Pringle and A. J. Easton** (1990). "Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins." *J Gen Virol* 71 (Pt 12): 3075-3080.
- Chandrika, R., S. M. Horikami, S. Smallwood and S. A. Moyer** (1995). "Mutations in conserved domain I of the Sendai virus L polymerase protein uncouple transcription and replication." *Virology* 213(2): 352-363.

- Chang, A., C. Masante, U. J. Buchholz and R. E. Dutch** (2012). "Human metapneumovirus (HMPV) binding and infection are mediated by interactions between the HMPV fusion protein and heparan sulfate." *J Virol* 86(6): 3230-3243.
- Chen, M. D., M. Vazquez, L. Buonocore and J. S. Kahn** (2000). "Conservation of the respiratory syncytial virus SH gene." *J Infect Dis* 182(4): 1228-1233.
- Chen, S., J. A. Short, D. F. Young, M. J. Killip, M. Schneider, S. Goodbourn and R. E. Randall** (2010). "Heterocellular induction of interferon by negative-sense RNA viruses." *Virology* 407(2): 247-255.
- Chen, Y., X. Deng, J. Deng, J. Zhou, Y. Ren, S. Liu, . . . X. Bao** (2016). "Functional motifs responsible for human metapneumovirus M2-2-mediated innate immune evasion." *Virology* 499: 361-368.
- Chiang, S., A. M. Dar, S. M. Goyal, M. A. Sheikh, J. C. Pedersen, B. Panigrahy, . . . V. Kapur** (2000). "A modified enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of avian pneumovirus antibodies." *J Vet Diagn Invest* 12(4): 381-384.
- Cleveland, S. B., J. Davies and M. A. McClure** (2011). "A bioinformatics approach to the structure, function, and evolution of the nucleoprotein of the order mononegavirales." *PLoS One* 6(5): e19275.
- Clubbe, J. and C. J. Naylor** (2011). "Avian metapneumovirus M2:2 protein inhibits replication in Vero cells: modification facilitates live vaccine development." *Vaccine* 29(51): 9493-9498.
- Collins, M. S. and R. E. Gough** (1988). "Characterization of a virus associated with turkey rhinotracheitis." *J Gen Virol* 69 (Pt 4): 909-916.
- Collins, M. S., R. E. Gough, S. A. Lister, N. Chettle and R. Eddy** (1986). "Further characterisation of a virus associated with turkey rhinotracheitis." *Vet Rec* 119(24): 606.
- Collins, P. L., M. G. Hill, E. Camargo, H. Grosfeld, R. M. Chanock and B. R. Murphy** (1995). "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 development." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(25): 11563-11567.
- Collins, P. L. and R. A. Karron** (2013). "Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus." *Fields Virology* 6th ed: 1086–1123.
- Collins, P. L., M. A. Mink and D. S. 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." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(21): 9663-9667.
- Collins, P. L. and G. W. Wertz** (1983). "cDNA cloning and transcriptional mapping of nine polyadenylated RNAs encoded by the genome of human respiratory syncytial virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(11): 3208-3212.
- Conzelmann, K. K. and M. Schnell** (1994). "Rescue of synthetic genomic RNA analogs of rabies virus by plasmid-encoded proteins." *J Virol* 68(2): 713-719.
- Cook, J. K.** (2000). "Avian pneumovirus infections of turkeys and chickens." *Vet J* 160(2): 118-125.
- Cook, J. K.** (2000). "Avian rhinotracheitis." *Rev Sci Tech* 19(2): 602-613.
- Cook, J. K. and D. Cavanagh** (2002). "Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses)." *Avian Pathol* 31(2): 117-132.
- Cook, J. K., M. B. Huggins, S. J. Orbell and D. A. Senne** (1999). "Preliminary antigenic characterization of an avian pneumovirus isolated from commercial turkeys in Colorado, USA." *Avian Pathology* 28(6): 607-617.
- Cook, J. K., M. B. Huggins, M. A. Woods, S. J. Orbell and A. P. Mockett** (1995). "Protection provided by a commercially available vaccine against different strains of turkey rhinotracheitis virus." *Vet Rec* 136(15): 392-393.
- Cook, J. K. A., M. M. Ellis and M. B. Huggins** (1991). "The pathogenesis of Turkey rhinotracheitis virus in turkey poults inoculated with the virus alone or together with two strains of bacteria." *Avian Pathology* 20: 155-156.
- Cook, J. K. A., F. Orthel, S. Orbell, M. A. Woods and M. B. Huggins** (1996). "An experimental turkey rhinotracheitis (TRT) infection in breeding turkeys and the prevention of its clinical effects using live-attenuated and inactivated TRT vaccines." *Avian Pathology* 25(2): 231-243.
- Coronel, E. C., T. Takimoto, K. G. Murti, N. Varich and A. Portner** (2001). "Nucleocapsid incorporation into parainfluenza virus is regulated by specific interaction with matrix protein." *J Virol* 75(3): 1117-1123.

- Cowton, V. M., D. R. McGivern and R. Fearn** (2006). "Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis." *J Gen Virol* 87(Pt 7): 1805-1821.
- Cox, R. G., S. B. Livesay, M. Johnson, M. D. Ohi and J. V. Williams** (2012). "The human metapneumovirus fusion protein mediates entry via an interaction with RGD-binding integrins." *J Virol* 86(22): 12148-12160.
- Cubitt, B. and J. C. de la Torre** (1994). "Borna disease virus (BDV), a nonsegmented RNA virus, replicates in the nuclei of infected cells where infectious BDV ribonucleoproteins are present." *J Virol* 68(3): 1371-1381.
- Dani, M. A., E. L. Durigon and C. W. Arns** (1999). "Molecular characterization of Brazilian avian pneumovirus isolates: comparison between immunochemiluminescent Southern blot and nested PCR." *J Virol Methods* 79(2): 237-241.
- de Graaf, M., S. Herfst, J. Aarbiou, P. C. Burgers, F. Zaaraoui-Boutahar, M. Bijl, . . . A. C. Andeweg** (2013). "Small hydrophobic protein of human metapneumovirus does not affect virus replication and host gene expression in vitro." *PLoS One* 8(3): e58572.
- de Graaf, M., S. Herfst, E. J. Schrauwen, Y. Choi, B. G. van den Hoogen, A. D. Osterhaus and R. A. Fouchier** (2008). "Specificity and functional interaction of the polymerase complex proteins of human and avian metapneumoviruses." *J Gen Virol* 89(Pt 4): 975-983.
- de Graaf, M., A. D. Osterhaus, R. A. Fouchier and E. C. Holmes** (2008). "Evolutionary dynamics of human and avian metapneumoviruses." *J Gen Virol* 89(Pt 12): 2933-2942.
- de Graaf, M., E. J. Schrauwen, S. Herfst, G. van Amerongen, A. D. Osterhaus and R. A. Fouchier** (2009). "Fusion protein is the main determinant of metapneumovirus host tropism." *J Gen Virol*.
- Deng, Q., Y. Weng, W. Lu, A. Demers, M. Song, D. Wang, . . . F. Li** (2011). "Topology and cellular localization of the small hydrophobic protein of avian metapneumovirus." *Virus Res* 160(1-2): 102-107.
- Derdowski, A., T. R. Peters, N. Glover, R. Qian, T. J. Utley, A. Burnett, . . . J. E. Crowe, Jr.** (2008). "Human metapneumovirus nucleoprotein and phosphoprotein interact and provide the minimal requirements for inclusion body formation." *J Gen Virol* 89(Pt 11): 2698-2708.
- Dolganiuc, V., L. McGinnes, E. J. Luna and T. G. Morrison** (2003). "Role of the cytoplasmic domain of the Newcastle disease virus fusion protein in association with lipid rafts." *J Virol* 77(24): 12968-12979.
- Dutch, R. E., T. S. Jardetzky and R. A. Lamb** (2000). "Virus membrane fusion proteins: biological machines that undergo a metamorphosis." *Biosci Rep* 20(6): 597-612.
- Easton, A. J., J. B. Domachowske and H. F. Rosenberg** (2004). "Animal Pneumoviruses: Molecular Genetics and Pathogenesis." *Clinical Microbiology Reviews* 17(2): 390-412.
- El Najjar, F., N. Cifuentes-Munoz and J. Chen** (2016). "Human metapneumovirus Induces Reorganization of the Actin Cytoskeleton for Direct Cell-to-Cell Spread." 12(9).
- Elliott, R. M., G. Blakqori, I. C. van Knippenberg, E. Koudriakova, P. Li, A. McLees, . . . A. M. Szemiel** (2013). "Establishment of a reverse genetics system for Schmallenberg virus, a newly emerged orthobunyavirus in Europe." *J Gen Virol* 94(Pt 4): 851-859.
- Epstein, L. M. and J. G. Gall** (1987). "Self-cleaving transcripts of satellite DNA from the newt." *Cell* 48(3): 535-543.
- Etteradossi, N., D. Toquin, M. Guittet and G. Bennejean** (1992). "Discrepancies in turkey rhinotracheitis ELISA results using different antigens." *Vet Rec* 131(24): 563-564.
- Etteradossi, N., D. Toquin, M. Guittet and G. Bennejean** (1995). "Evaluation of different turkey rhinotracheitis viruses used as antigens for serological testing following live vaccination and challenge." *Veterinary Medicine* 42(3): 175-186.
- Fabris, G. and P. N. D'aprile** (1990). "Rinotracheite infettiva del tacchino: osservazioni sul campo ed indagini di laboratorio. ." *Zootecnica International* I(6): 36-40.
- Fearn, R. and P. L. Collins** (1999). "Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription." *J Virol* 73(7): 5852-5864.
- Fearn, R., M. E. Peebles and P. L. Collins** (2002). "Mapping the transcription and replication promoters of respiratory syncytial virus." *J Virol* 76(4): 1663-1672.
- Fearn, R. and R. K. Plemper** (2017). "Polymerase of Paramyxoviruses and Pneumovirus." *Virus research* 234: 87-102.

- Ferron, F., S. Longhi, B. Henrissat and B. Canard** (2002). "Viral RNA-polymerases -- a predicted 2'-O-ribose methyltransferase domain shared by all Mononegavirales." *Trends Biochem Sci* 27(5): 222-224.
- Firquet, S., S. Beaujard, P. E. Lobert, F. Sane, D. Caloone, D. Izard and D. Hober** (2014). "Viruses contained in droplets applied on warmed surface are rapidly inactivated." *Microbes Environ* 29(4): 408-412.
- Firquet, S., S. Beaujard, P. E. Lobert, F. Sane, D. Caloone, D. Izard and D. Hober** (2015). "Survival of Enveloped and Non-Enveloped Viruses on Inanimate Surfaces." *Microbes Environ* 30(2): 140-144.
- Franzo, G., C. M. Tucciarone, M. Enache, V. Bejan, G. Ramon, K. C. Koutoulis and M. Cecchinato** (2017). "First Report of Avian Metapneumovirus Subtype B Field Strain in a Romanian Broiler Flock During an Outbreak of Respiratory Disease." *Avian Dis* 61(2): 250-254.
- Freyemouth, F., A. Vabret, L. Legrand, N. Eterradossi, F. Lafay-Delaire, J. Brouard and B. Guillois** (2003). "Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis." *Pediatr Infect Dis J* 22(1): 92-94.
- Fuentes, S., K. C. Tran, P. Luthra, M. N. Teng and B. He** (2007). "Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein." *J Virol* 81(15): 8361-8366.
- Fuerst, T. R., E. G. Niles, F. W. Studier and B. Moss** (1986). "Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(21): 8122-8126.
- Gan, S.-W., E. Tan, X. Lin, D. Yu, J. Wang, G. M.-Y. Tan, . . . J. Torres** (2012). "The Small Hydrophobic Protein of the Human Respiratory Syncytial Virus Forms Pentameric Ion Channels." *The Journal of Biological Chemistry* 287(29): 24671-24689.
- Ganapathy, K., P. Cargill, E. Montiel and R. C. Jones** (2005). "Interaction between live avian pneumovirus and Newcastle disease virus vaccines in specific pathogen free chickens." *Avian Pathol* 34(4): 297-302.
- García-Barreno, B., T. Delgado and J. A. Melero** (1996). "Identification of protein regions involved in the interaction of human respiratory syncytial virus phosphoprotein and nucleoprotein: significance for nucleocapsid assembly and formation of cytoplasmic inclusions." *Journal of Virology* 70(2): 801-808.
- García, J., B. Garcia-Barreno, A. Vivo and J. A. 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): 243-247.
- Gharaibeh, S. M. and G. R. Algharaibeh** (2007). "Serological and molecular detection of avian pneumovirus in chickens with respiratory disease in Jordan." *Poult Sci* 86(8): 1677-1681.
- Ghildyal, R., J. Mills, M. Murray, N. Vardaxis and J. Meanger** (2002). "Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells." *J Gen Virol* 83(Pt 4): 753-757.
- Giraud, P., G. Bennejean, M. Guittet and D. Toquin** (1986). "Turkey rhinotracheitis in France: preliminary investigations on a ciliostatic virus." *Vet Rec* 119(24): 606-607.
- Giraud, P., F. X. Le Gros, M. Guittet, J. F. Bouquet, D. Toquin and G. Bennejean** (1987). "Turkey rhinotracheitis: isolation of a viral agent and first trials with experimental inactivated or attenuated vaccines." Thirty-sixth Western Poultry Disease Conference, Davis, California.
- Giraud, P., D. Toquin, J. P. Picault, M. Guittet and G. Bennejean** (1987). "Le sérodiagnostic de l'infection par le virus de la rhinotrachéite de la dinde, la poule et la pintade : la séroneutralisation bêta sur cellules MA 104." *Bull. Lab. Vet* 27-28: 71-76.
- Gonzalez-Reyes, L., M. B. Ruiz-Arguello, B. Garcia-Barreno, L. Calder, J. A. Lopez, J. P. Albar, . . . J. A. Melero** (2001). "Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(17): 9859-9864.
- Gough, R. E., M. S. Collins, W. J. Cox and N. J. Chettle** (1988). "Experimental infection of turkeys, chickens, ducks, geese, guinea fowl, pheasants and pigeons with turkey rhinotracheitis virus." *Vet Rec* 123(2): 58-59.
- Gough, R. E., S. E. Drury, E. Aldous and P. W. Laing** (2001). "Isolation and identification of avian pneumovirus from pheasants." *Vet Rec* 149(10): 312.
- Gough, R. E. and R. C. Jones** (2008). "Avian Metapneumovirus." *Diseases of Poultry* 12th Edition.
- Gough, R. E. a. J. C. P.** (2008). "Avian metapneumovirus. In: Isolation and identification of Avian Pathogens." American association of Avian Pathologists, Jacksonville, Florida. : 142-145.

- Govindarajan, D., U. J. Buchholz and S. K. Samal** (2006). "Recovery of avian metapneumovirus subgroup C from cDNA: cross-recognition of avian and human metapneumovirus support proteins." *J Virol* 80(12): 5790-5797.
- Govindarajan, D., S. H. Kim and S. K. Samal** (2010). "Contribution of the attachment G glycoprotein to pathogenicity and immunogenicity of avian metapneumovirus subgroup C." *Avian Dis* 54(1): 59-66.
- Govindarajan, D., A. S. Yunus and S. K. Samal** (2004). "Complete sequence of the G glycoprotein gene of avian metapneumovirus subgroup C and identification of a divergent domain in the predicted protein." *J Gen Virol* 85(Pt 12): 3671-3675.
- Goyal, S. M., S. J. Chiang, A. M. Dar, K. V. Nagaraja, D. P. Shaw, D. A. Halvorson and V. Kapur** (2000). "Isolation of avian pneumovirus from an outbreak of respiratory illness in Minnesota turkeys." *J Vet Diagn Invest* 12(2): 166-168.
- Goyal, S. M., D. Lauer, K. Friendshuh and D. A. Halvorson** (2003). "Seroprevalence of avian pneumovirus in Minnesota turkeys." *Avian Dis* 47(3): 700-706.
- Grant, M., C. Baxter-Jones and G. P. Wilding** (1987). "An enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of turkey rhinotracheitis infection." *Vet Rec* 120(12): 279-280.
- Guionie, O., D. Toquin, E. Sellal, S. Bouley, F. Zwingelstein, C. Allee, . . . N. Eterradossi** (2007). "Laboratory evaluation of a quantitative real-time reverse transcription PCR assay for the detection and identification of the four subgroups of avian metapneumovirus." *J Virol Methods* 139(2): 150-158.
- Hafez, H. M.** (1987). "Rhinotracheitis der Puten." *Schriftreihe der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft - Fachgruppe Geflügelkrankheiten*, 34. und 35. Fachgespräch, Hannover, Germany, : 107-120
- Hafez, H. M.** (1993). "The role of pneumovirus in swollen head syndrome of chickens: review." *Arch.Geflugelkde*(57): 181-185.
- Hamaguchi, M., T. Yoshida, K. Nishikawa, H. Naruse and Y. Nagai** (1983). "Transcriptive complex of Newcastle disease virus. I. Both L and P proteins are required to constitute an active complex." *Virology* 128(1): 105-117.
- Hammond, D. C. and J. A. Lesnaw** (1987). "Functional analysis of hypomethylation variants of the New Jersey serotype of vesicular stomatitis virus." *Virology* 160(2): 330-335.
- Hastings, A. K., K. R. Amato, S. C. Wen, L. S. Peterson and J. V. Williams** (2016). "Human metapneumovirus small hydrophobic (SH) protein downregulates type I IFN pathway signaling by affecting STAT1 expression and phosphorylation." *Virology* 494: 248-256.
- He, B., G. P. Leser, R. G. Paterson and R. A. Lamb** (1998). "The paramyxovirus SV5 small hydrophobic (SH) protein is not essential for virus growth in tissue culture cells." *Virology* 250(1): 30-40.
- Heffels-Redman, U., Neumann, U., Branne, S., Cook, J. K. A. and Pruter, J.** (1998). "Serological evidence for susceptibility of sea gulls to avian pneumovirus (APV) infection." *International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus Infections in Poultry.*, Rauschholzhausen, Germany.
- Hengst, U. and P. Kiefer** (2000). "Domains of human respiratory syncytial virus P protein essential for homodimerization and for binding to N and NS1 protein." *Virus Genes* 20(3): 221-225.
- Herfst, S., M. de Graaf, J. H. Schickli, R. S. Tang, J. Kaur, C. F. Yang, . . . R. A. Fouchier** (2004). "Recovery of human metapneumovirus genetic lineages a and B from cloned cDNA." *J Virol* 78(15): 8264-8270.
- Horikami, S. M., J. Curran, D. Kolakofsky and S. A. Moyer** (1992). "Complexes of Sendai virus NP-P and P-L proteins are required for defective interfering particle genome replication in vitro." *J Virol* 66(8): 4901-4908.
- Hunt, D. M., R. Mehta and K. L. Hutchinson** (1988). "The L protein of vesicular stomatitis virus modulates the response of the polyadenylic acid polymerase to S-adenosylhomocysteine." *J Gen Virol* 69 (Pt 10): 2555-2561.
- Hutchins, C. J., P. D. Rathjen, A. C. Forster and R. H. Symons** (1986). "Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid." *Nucleic Acids Res* 14(9): 3627-3640.
- Inoue, K., Y. Shoji, I. Kurane, T. Iijima, T. Sakai and K. Morimoto** (2003). "An improved method for recovering rabies virus from cloned cDNA." *J Virol Methods* 107(2): 229-236.
- Iseni, F., F. Baudin, D. Blondel and R. W. Ruigrok** (2000). "Structure of the RNA inside the vesicular stomatitis virus nucleocapsid." *RNA* 6(2): 270-281.

- Ivancic-Jelecki, J., A. Slovic, S. Ljubin-Sternak, G. Mlinaric Galinovic and D. Forcic** (2018). "Variability analysis and inter-genotype comparison of human respiratory syncytial virus small hydrophobic gene." *Virology* 15(1): 109.
- Jardine, C. M., E. J. Parmley, T. Buchanan, L. Nituch and D. Ojkic** (2018). "Avian metapneumovirus subtype C in Wild Waterfowl in Ontario, Canada." *Transbound Emerg Dis* 65(4): 1098-1102.
- Jirjis, F. E., S. L. Noll, D. A. Halvorson, K. V. Nagaraja, E. L. Townsend, A. M. Sheikh and D. P. Shaw** (2000). "Avian pneumovirus infection in Minnesota turkeys: experimental reproduction of the disease." *Avian Dis* 44(1): 222-226.
- Jirjis, F. F., S. L. Noll, D. A. Halvorson, K. V. Nagaraja, F. Martin and D. P. Shaw** (2004). "Effects of bacterial coinfection on the pathogenesis of avian pneumovirus infection in turkeys." *Avian Dis* 48(1): 34-49.
- Jones, R. C.** (1996). "Avian pneumovirus infection: Questions still unanswered." *Avian Pathol* 25(4): 639-648.
- Jones, R. C.** (2001). *Pneumovirinae*, W.B.Saunders
- Jones, R. C., C. Baxter-Jones, C. E. Savage, D. F. Kelly and G. P. Wilding** (1987). "Experimental infection of chickens with a ciliostatic agent isolated from turkeys with rhinotracheitis." *Vet Rec* 120(13): 301-302.
- Jones, R. C., C. Baxter-Jones, G. P. Wilding and D. F. Kelly** (1986). "Demonstration of a candidate virus for turkey rhinotracheitis in experimentally inoculated turkeys." *Vet Rec* 119(24): 599-600.
- Jones, R. C., C. J. Naylor, A. al-Afaleq, K. J. Worthington and R. Jones** (1992). "Effect of cyclophosphamide immunosuppression on the immunity of turkeys to viral rhinotracheitis." *Res Vet Sci* 53(1): 38-41.
- Jones, R. C., C. J. Naylor, J. M. Bradbury, C. E. Savage, K. Worthington and R. A. Williams** (1991). "Isolation of a turkey rhinotracheitis-like virus from broiler breeder chickens in England." *Vet Rec* 129(23): 509-510.
- Jones, R. C. and S. Rautenschlein** (2013). *Avian Metapneumovirus. Diseases of Poultry*. D. E. Swayne, Wiley-blackwell. 13: 112-138.
- Jones, R. C., R. A. Williams, C. Baxter-Jones, C. E. Savage and G. P. Wilding** (1988). "Experimental infection of laying turkeys with rhinotracheitis virus: distribution of virus in the tissues and serological response." *Avian Pathol* 17(4): 841-850.
- Juhász, K. and A. J. Easton** (1994). "Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups." *J Gen Virol* 75(Pt 11): 2873-2880.
- Kaptur, P. E., R. B. Rhodes and D. S. Lyles** (1991). "Sequences of the vesicular stomatitis virus matrix protein involved in binding to nucleocapsids." *J Virol* 65(3): 1057-1065.
- Karger, A., U. Schmidt and U. J. Buchholz** (2001). "Recombinant bovine respiratory syncytial virus with deletions of the G or SH genes: G and F proteins bind heparin." *J Gen Virol* 82(Pt 3): 631-640.
- Karron, R. A., D. A. Buonagurio, A. F. Georgiu, S. S. Whitehead, J. E. Adamus, M. L. Clements-Mann, . . . M. S. 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." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(25): 13961-13966.
- Khattar, S. K., A. S. Yunus and S. K. Samal** (2001). "Mapping the domains on the phosphoprotein of bovine respiratory syncytial virus required for N-P and P-L interactions using a minigenome system." *J Gen Virol* 82(Pt 4): 775-779.
- Khehra, R. S. and R. C. Jones** (1999). "In vitro and in vivo studies on the pathogenicity of avian pneumovirus for the chicken oviduct." *Avian Pathology* 28(3): 257-262.
- Khehra, R. S., R. C. Jones and J. M. Bradbury** (1999). "Dual infection of turkey poults with avian pneumovirus and *Mycoplasma synoviae*." *Avian Pathol* 28(4): 401-404.
- Kleven, S. H.** (1997). "Report of the Committee. Transmissible Diseases of Poultry and Other Avian Species." *Proceedings of the U.S. Animal Health Association 101st Annual Meeting*. U.S. Animal Health Association, Louisville, KY: 486-491.
- Klumpp, K., R. W. Ruigrok and F. Baudin** (1997). "Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure." *The EMBO Journal* 16(6): 1248-1257.

- Kong, B. W., L. K. Foster and D. N. Foster** (2008). "Species-specific deletion of the viral attachment glycoprotein of avian metapneumovirus." *Virus Res* 132(1-2): 114-121.
- Kovacs, G. R., C. L. Parks, N. Vasilakis and S. A. Udem** (2003). "Enhanced genetic rescue of negative-strand RNA viruses: use of an MVA-T7 RNA polymerase vector and DNA replication inhibitors." *J Virol Methods* 111(1): 29-36.
- Kreml, C., B. R. Murphy and P. L. Collins** (2002). "Recombinant respiratory syncytial virus with the G and F genes shifted to the promoter-proximal positions." *J Virol* 76(23): 11931-11942.
- Kuo, L., R. Fearn and P. L. Collins** (1996). "The structurally diverse intergenic regions of respiratory syncytial virus do not modulate sequential transcription by a dicistronic minigenome." *J Virol* 70(9): 6143-6150.
- Kwon, J. S., H. J. Lee, S. H. Jeong, J. Y. Park, Y. H. Hong, Y. J. Lee, . . . C. S. Song** (2010). "Isolation and characterization of avian metapneumovirus from chickens in Korea." *J Vet Sci* 11(1): 59-66.
- Laconi, A., J. Clubbe, M. Falchieri, C. Lupini, M. Cecchinato, E. Catelli, . . . C. J. Naylor** (2016). "A comparison of AMPV subtypes A and B full genomes, gene transcripts and proteins led to reverse-genetics systems rescuing both subtypes." *J Gen Virol* 97(6): 1324-1332.
- Lai, W. S., E. Carballo, J. R. Strum, E. A. Kennington, R. S. Phillips and P. J. Blackshear** (1999). "Evidence that Tristetraprolin Binds to AU-Rich Elements and Promotes the Deadenylation and Destabilization of Tumor Necrosis Factor Alpha mRNA." *Molecular and Cellular Biology* 19(6): 4311-4323.
- Le Gros, F. X., Magand, G., Giraud, P., Bouquet, J. F., Guittet, M. and Benejean, G.** (1988). "Turkey Rhinotracheitis: Field results of the vaccination of day old turkey with a live attenuated virus. ." *Proceedings of the thirty-seventh western poultry disease conference*. Davis, California. .
- Le Mercier, P., Y. Jacob, K. Tanner and N. Tordo** (2002). "A Novel Expression Cassette of Lyssavirus Shows that the Distantly Related Mokola Virus Can Rescue a Defective Rabies Virus Genome." *Journal of Virology* 76(4): 2024-2027.
- Lee, E., M. S. Song, J. Y. Shin, Y. M. Lee, C. J. Kim, Y. S. Lee, . . . Y. K. Choi** (2007). "Genetic characterization of avian metapneumovirus subtype C isolated from pheasants in a live bird market." *Virus Res* 128(1-2): 18-25.
- Lemaitre, E., C. Allee, A. Vabret, N. Eterradossi and P. A. Brown** (2018). "Single reaction, real time RT-PCR detection of all known avian and human metapneumoviruses." *J Virol Methods* 251: 61-68.
- Lenard, J.** (1996). "Negative-strand virus M and retrovirus MA proteins: all in a family?" *Virology* 216(2): 289-298.
- Leyrat, C., G. C. Paesen, J. Charleston, M. Renner and J. M. Grimes** (2014). "Structural insights into the human metapneumovirus glycoprotein ectodomain." *J Virol* 88(19): 11611-11616.
- Leyrat, C., M. Renner, K. Harlos and J. M. Grimes** (2013). "Solution and crystallographic structures of the central region of the phosphoprotein from human metapneumovirus." *PLoS One* 8(11): e80371.
- Leyrat, C., M. Renner, K. Harlos, J. T. Huiskonen and J. M. Grimes** (2014). "Drastic changes in conformational dynamics of the antiterminator M2-1 regulate transcription efficiency in Pneumovirinae." *Elife* 3: e02674.
- Leyrat, C., M. Renner, K. Harlos, J. T. Huiskonen and J. M. Grimes** (2014). "Structure and self-assembly of the calcium binding matrix protein of human metapneumovirus." *Structure* 22(1): 136-148.
- Li, D., D. A. Jans, P. G. Bardin, J. Meanger, J. Mills and R. Ghildyal** (2008). "Association of Respiratory Syncytial Virus M Protein with Viral Nucleocapsids Is Mediated by the M2-1 Protein." *Journal of Virology* 82(17): 8863-8870.
- Li, Z., J. Xu, J. Patel, S. Fuentes, Y. Lin, D. Anderson, . . . B. He** (2011). "Function of the small hydrophobic protein of J paramyxovirus." *J Virol* 85(1): 32-42.
- Liman, M. and S. Rautenschlein** (2007). "Induction of local and systemic immune reactions following infection of turkeys with avian Metapneumovirus (aMPV) subtypes A and B." *Vet Immunol Immunopathol* 115(3-4): 273-285.
- Ling, R., P. J. Davis, Q. Yu, C. M. Wood, C. R. Pringle, D. Cavanagh and A. J. Easton** (1995). "Sequence and in vitro expression of the phosphoprotein gene of avian pneumovirus." *Virus Res* 36(2-3): 247-257.

- Ling, R., A. J. Easton and C. R. Pringle** (1992). "Sequence analysis of the 22K, SH and G genes of turkey rhinotracheitis virus and their intergenic regions reveals a gene order different from that of other pneumoviruses." *J Gen Virol* 73 (Pt 7): 1709-1715.
- Ling, R. and C. R. Pringle** (1988). "Turkey rhinotracheitis virus: in vivo and in vitro polypeptide synthesis." *J Gen Virol* 69 (Pt 4): 917-923.
- Ling, R., S. Sinkovic, D. Toquin, O. Guionie, N. Eterradossi and A. J. Easton** (2008). "Deletion of the SH gene from avian metapneumovirus has a greater impact on virus production and immunogenicity in turkeys than deletion of the G gene or M2-2 open reading frame." *J Gen Virol* 89(Pt 2): 525-533.
- Lister, S. A. and D. J. Alexander** (1986). "Turkey Rhinotracheitis: A Review." *Veterinary Bulletin* (56): 637-663.
- Litjens, J. B., F. C. van Willigen and M. Sinke** (1989). "[A case of swollen head syndrome in a flock of guinea fowl]." *Tijdschr Diergeneeskd* 114(13): 719-720.
- Liu, L., N. Bastien and Y. Li** (2007). "Intracellular processing, glycosylation, and cell surface expression of human metapneumovirus attachment glycoprotein." *J Virol* 81(24): 13435-13443.
- Loo, L. H., M. R. Jumat, Y. Fu, T. C. Ayi, P. S. Wong, N. W. Tee, . . . R. J. Sugrue** (2013). "Evidence for the interaction of the human metapneumovirus G and F proteins during virus-like particle formation." *Virol J* 10: 294.
- Loock, M. V., K. Loots, S. V. Zande, M. V. Heerden, H. Nauwynck, B. M. Goddeeris and D. Vanrompay** (2006). "Pathogenic interactions between *Chlamydomytila psittaci* and avian pneumovirus infections in turkeys." *Vet Microbiol* 112(1): 53-63.
- Luo, L., M. I. Sabara and Y. Li** (2009). "Analysis of antigenic cross-reactivity between subgroup C avian pneumovirus and human metapneumovirus by using recombinant fusion proteins." *Transbound Emerg Dis* 56(8): 303-310.
- Lupini, C., M. Cecchinato, E. Ricchizzi, C. J. Naylor and E. Catelli** (2011). "A turkey rhinotracheitis outbreak caused by the environmental spread of a vaccine-derived avian metapneumovirus." *Avian Pathol* 40(5): 525-530.
- Luytjes, W., M. Krystal, M. Enami, J. D. Parvin and P. Palese** (1989). "Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus." *Cell* 59(6): 1107-1113.
- Lwamba, H. C., R. Alvarez, M. G. Wise, Q. Yu, D. Halvorson, M. K. Njenga and B. S. Seal** (2005). "Comparison of the full-length genome sequence of avian metapneumovirus subtype C with other paramyxoviruses." *Virus Res* 107(1): 83-92.
- Maes, P. and G. K. Amarasinghe** (2019). "Taxonomy of the order Mononegavirales: second update 2018."
- Maharaj, S. B., D. K. Thomson and J. V. da Graca** (1994). "Isolation of an avian pneumovirus-like agent from broiler breeder chickens in South Africa." *Vet Rec* 134(20): 525-526.
- Majo, N., G. M. Allan, C. J. O'Loan, A. Pages and A. J. Ramis** (1995). "A sequential histopathologic and immunocytochemical study of chickens, turkey poults, and broiler breeders experimentally infected with turkey rhinotracheitis virus." *Avian Dis* 39(4): 887-896.
- Majo, N., X. Gibert, M. Vilafranca, C. J. O'Loan, G. M. Allan, L. Costa, . . . A. Ramis** (1997). "Turkey rhinotracheitis virus and *Escherichia coli* experimental infection in chickens: histopathological, immunocytochemical and microbiological study." *Vet Microbiol* 57(1): 29-40.
- Majo, N., M. Marti, C. J. O'Loan, G. M. Allan, A. Pages and A. Ramis** (1996). "Ultrastructural study of turkey rhinotracheitis virus infection in turbinates of experimentally infected chickens." *Vet Microbiol* 52(1-2): 37-48.
- Marien, M., A. Decostere, A. Martel, K. Chiers, R. Froyman and H. Nauwynck** (2005). "Synergy between avian pneumovirus and *Ornithobacterium rhinotracheale* in turkeys." *Avian Pathol* 34(3): 204-211.
- Marriott, A. C., J. M. Smith and A. J. Easton** (2001). "Fidelity of leader and trailer sequence usage by the respiratory syncytial virus and avian pneumovirus replication complexes." *J Virol* 75(14): 6265-6272.
- Martick, M., L. H. Horan, H. F. Noller and W. G. Scott** (2008). "A discontinuous hammerhead ribozyme embedded in a mammalian messenger RNA." *Nature* 454(7206): 899-902.
- Masante, C., F. El Najjar, A. Chang, A. Jones, C. L. Moncman and R. E. Dutch** (2014). "The human metapneumovirus small hydrophobic protein has properties consistent with those of a viroporin and can modulate viral fusogenic activity." *J Virol* 88(11): 6423-6433.

- Mase, M., S. Yamaguchi, K. Tsukamoto, T. Imada, K. Imai and K. Nakamura** (2003). "Presence of avian pneumovirus subtypes A and B in Japan." *Avian Dis* 47(2): 481-484.
- McDonnell, G.** (2006). "Hydrogen peroxide fogging/fumigation." *Journal of Hospital Infection* 62(3): 385-386.
- McDougall, J. S. and J. K. Cook** (1986). "Turkey rhinotracheitis: preliminary investigations." *Vet Rec* 118(8): 206-207.
- Meier, J. L. and M. F. Stinski** (1996). "Regulation of human cytomegalovirus immediate-early gene expression." *Intervirology* 39(5-6): 331-342.
- Meulemans, G., M. Boschmans, M. Decaesstecker, T. P. Berg, P. Denis and D. Cavanagh** (2001). "Epidemiology of infectious bronchitis virus in Belgian broilers: a retrospective study, 1986 to 1995." *Avian Pathol* 30(4): 411-421.
- Moudy, R. M., W. M. Sullender and G. W. Wertz** (2004). "Variations in intergenic region sequences of Human respiratory syncytial virus clinical isolates: analysis of effects on transcriptional regulation." *Virology* 327(1): 121-133.
- Naylor, C., K. Shaw, P. Britton and D. Cavanagh** (1997). "Appearance of type B avian Pneumovirus in great Britain." *Avian Pathol* 26(2): 327-338.
- Naylor, C. J., A. R. Al-Ankari, A. I. Al-Afalet, J. M. Bradbury and R. C. Jones** (1992). "Exacerbation of mycoplasma gallisepticum infection in turkeys by rhinotracheitis virus." *Avian Pathology* 21: 295-305.
- Naylor, C. J., P. A. Brown, N. Edworthy, R. Ling, R. C. Jones, C. E. Savage and A. J. Easton** (2004). "Development of a reverse-genetics system for Avian pneumovirus demonstrates that the small hydrophobic (SH) and attachment (G) genes are not essential for virus viability." *J Gen Virol* 85(Pt 11): 3219-3227.
- Naylor, C. J. and R. C. Jones** (1993). "Turkey rhinotracheitis: a review." *Veterinary Bulletin* 63(5): 439-449.
- Naylor, C. J. and R. C. Jones** (1994). "Demonstration of a virulent subpopulation in a prototype live attenuated turkey rhinotracheitis vaccine." *Vaccine* 12(13): 1225-1230.
- Naylor, C. J., C. Lupini and P. A. Brown** (2010). "Charged amino acids in the AMPV fusion protein have more influence on induced protection than deletion of the SH or G genes." *Vaccine* 28(41): 6800-6807.
- Nelson, J. A., J. W. Gnann, Jr. and P. Ghazal** (1990). "Regulation and tissue-specific expression of human cytomegalovirus." *Curr Top Microbiol Immunol* 154: 75-100.
- O'Brien, J. D.** (1985). "Swollen head syndrome in broiler breeders." *Vet Rec* 117(23): 619-620.
- Olmsted, R. A., B. R. Murphy, L. A. Lawrence, N. Elango, B. Moss and P. L. Collins** (1989). "Processing, surface expression, and immunogenicity of carboxy-terminally truncated mutants of G protein of human respiratory syncytial virus." *Journal of Virology* 63(1): 411-420.
- Ongor, H., M. Karahan, R. Kalin, H. Bulut and B. Cetinkaya** (2010). "Detection of avian metapneumovirus subtypes in turkeys using RT-PCR." *Vet Rec* 166(12): 363-366.
- Owoade, A. A., M. F. Ducatez, J. M. Hubschen, A. Sausy, H. Chen, Y. Guan and C. P. Muller** (2008). "Avian metapneumovirus subtype A in China and subtypes A and B in Nigeria." *Avian Dis* 52(3): 502-506.
- Patnayak, D. P., A. M. Prasad, Y. S. Malik, M. A. Ramakrishnan and S. M. Goyal** (2008). "Efficacy of disinfectants and hand sanitizers against avian respiratory viruses." *Avian Dis* 52(2): 199-202.
- Pattnaik, A. K., L. A. Ball, A. W. LeGrone and G. W. Wertz** (1992). "Infectious defective interfering particles of VSV from transcripts of a cDNA clone." *Cell* 69(6): 1011-1020.
- Pattnaik, A. K. and G. W. Wertz** (1990). "Replication and amplification of defective interfering particle RNAs of vesicular stomatitis virus in cells expressing viral proteins from vectors containing cloned cDNAs." *Journal of Virology* 64(6): 2948-2957.
- Pattnaik, A. K. and G. W. Wertz** (1991). "Cells that express all five proteins of vesicular stomatitis virus from cloned cDNAs support replication, assembly, and budding of defective interfering particles." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(4): 1379-1383.
- Paudel, S. and H. J. Shin** (2015). "Role of trypsin in the replication of Avian metapneumovirus subtype C (strain MN-2a) and its entry into the Vero cells." *Mol Cell Probes* 29(6): 485-491.

- Pereira, N., C. Cardone, S. Lassoued, M. Galloux, J. Fix, N. Assrir, . . . C. Sizun** (2017). "New Insights into Structural Disorder in Human Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein and Implications for Binding of Protein Partners." *J Biol Chem* 292(6): 2120-2131.
- Pham, Q. N., S. Biacchesi, M. H. Skiadopoulou, B. R. Murphy, P. L. Collins and U. J. Buchholz** (2005). "Chimeric recombinant human metapneumoviruses with the nucleoprotein or phosphoprotein open reading frame replaced by that of avian metapneumovirus exhibit improved growth in vitro and attenuation in vivo." *J Virol* 79(24): 15114-15122.
- Picault, J. P., P. Giraud, P. Drouin, M. Guittet, G. Bennejean, J. Lamande, . . . C. Gueguen** (1987). "Isolation of a TRTV-like virus from chickens with swollen-head syndrome." *Vet Rec* 121(6): 135.
- Picault, J. P., P. Giraud, J. Lamande, D. Toquin, C. Gueguen, V. Kles, . . . G. Bennejean** (1987). "syndrome de gonflement de la tête chez la poule et la pintade: Une étiologie commune avec la rhinotracheite infectieuse de la dinde." *L'Aviculteur* 481: 74-75.
- Poch, O., B. M. Blumberg, L. Bougueleret and N. Tordo** (1990). "Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains." *J Gen Virol* 71 (Pt 5): 1153-1162.
- Poch, O., I. Sauvaget, M. Delarue and N. Tordo** (1989). "Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements." *Embo j* 8(12): 3867-3874.
- Qin, J. Y., L. Zhang, K. L. Clift, I. Hukur, A. P. Xiang, B.-Z. Ren and B. T. Lahn** (2010). "Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter." *PloS one* 5(5): e10611-e10611.
- Racaniello, V. R. and D. Baltimore** (1981). "Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells." *Science* 214(4523): 916-919.
- Radecke, F., P. Spielhofer, H. Schneider, K. Kaelin, M. Huber, C. Dötsch, . . . M. A. Billeter** (1995). "Rescue of measles viruses from cloned DNA." *The EMBO Journal* 14(23): 5773-5784.
- Randhawa, J. S., A. C. Marriott, C. R. Pringle and A. J. Easton** (1997). "Rescue of synthetic minireplicons establishes the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumovirus." *J Virol* 71(12): 9849-9854.
- Reinhardt, A. K., A. V. Gautier-Bouchardon, M. Gicquel-Bruneau, M. Kobisch and I. Kempf** (2005). "Persistence of *Mycoplasma gallisepticum* in chickens after treatment with enrofloxacin without development of resistance." *Vet Microbiol* 106(1-2): 129-137.
- Ren, J., Q. Wang, D. Kolli, D. J. Prusak, C. T. Tseng, Z. J. Chen, . . . X. Bao** (2012). "Human metapneumovirus M2-2 protein inhibits innate cellular signaling by targeting MAVS." *J Virol* 86(23): 13049-13061.
- Ren, Y., E. Choi, K. Zhang, Y. Chen, S. Ye, X. Deng, . . . X. Bao** (2017). "Detection of Nuclear Protein Profile Changes by Human Metapneumovirus M2-2 Protein Using Quantitative Differential Proteomics." *Vaccines (Basel)* 5(4).
- Renner, M., M. Bertinelli, C. Leyrat, G. C. Paesen, L. F. S. de Oliveira, J. T. Huiskonen and J. M. Grimes** (2016). "Nucleocapsid assembly in pneumoviruses is regulated by conformational switching of the N protein." *eLife* 5(FEBRUARY2016).
- Renner, M., G. C. Paesen, C. M. Grison, S. Granier, J. M. Grimes and C. Leyrat** (2017). "Structural dissection of human metapneumovirus phosphoprotein using small angle x-ray scattering." *Sci Rep* 7(1): 14865.
- Rivera-Benitez, J. F., R. Martinez-Bautista, F. Rios-Cambre and H. Ramirez-Mendoza** (2014). "Molecular detection and isolation of avian metapneumovirus in Mexico." *Avian Pathol* 43(3): 217-223.
- Rodriguez, L., I. Cuesta, A. Asenjo and N. Villanueva** (2004). "Human respiratory syncytial virus matrix protein is an RNA-binding protein: binding properties, location and identity of the RNA contact residues." *J Gen Virol* 85(Pt 3): 709-719.
- Ruigrok, R. W., T. Crepin and D. Kolakofsky** (2011). "Nucleoproteins and nucleocapsids of negative-strand RNA viruses." *Curr Opin Microbiol* 14(4): 504-510.
- Rusin P., G. C.** (2001). "Association of chlorination and UV irradiation to increasing antibiotic resistance in bacteria." *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*: 1-52.
- Ryder, A. B., S. J. Tollefson, A. B. Podsiad, J. E. Johnson and J. V. Williams** (2010). "Soluble recombinant human metapneumovirus G protein is immunogenic but not protective." *Vaccine* 28(25): 4145-4152.

- Sabo, Y., M. Ehrlich and E. Bacharach** (2011). "The conserved YAGL motif in human metapneumovirus is required for higher-order cellular assemblies of the matrix protein and for virion production." *J Virol* 85(13): 6594-6609.
- Schickli, J. H., J. Kaur, M. MacPhail, J. M. Guzzetta, R. R. Spaete and R. S. Tang** (2008). "Deletion of human metapneumovirus M2-2 increases mutation frequency and attenuates growth in hamsters." *Virology Journal* 5: 69-69.
- Schildgen, V., B. van den Hoogen, R. Fouchier, R. A. Tripp, R. Alvarez, C. Manoha, . . . O. Schildgen** (2011). "Human Metapneumovirus: Lessons Learned over the First Decade." *Clinical Microbiology Reviews* 24(4): 734-754.
- Schlender, J., G. Zimmer, G. Herrler and K. K. Conzelmann** (2003). "Respiratory Syncytial Virus (RSV) Fusion Protein Subunit F2, Not Attachment Protein G, Determines the Specificity of RSV Infection." *Journal of Virology* 77(8): 4609-4616.
- Schneider, H., P. Spielhofer, K. Kaelin, C. Dotsch, F. Radecke, G. Sutter and M. A. Billeter** (1997). "Rescue of measles virus using a replication-deficient vaccinia-T7 vector." *J Virol Methods* 64(1): 57-64.
- Schnell, M. J., T. Mebatsion and K. K. Conzelmann** (1994). "Infectious rabies viruses from cloned cDNA." *The EMBO Journal* 13(18): 4195-4203.
- Schowalter, R. M., A. Chang, J. G. Robach, U. J. Buchholz and R. E. Dutch** (2009). "Low-pH triggering of human metapneumovirus fusion: essential residues and importance in entry." *J Virol* 83(3): 1511-1522.
- Seal, B. S.** (1998). "Matrix protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first US avian pneumovirus isolate is distinct from European strains." *Virus Res* 58(1-2): 45-52.
- Seal, B. S.** (2000). "Avian pneumovirus and emergence of a new type in the United States of America." *Anim. Health Res. Rev*(1): 67-72.
- Senne, D. A., Edson, J. C. Pederson and B. Panigrahy** (1997). Avian pneumovirus update. Schaumburg. Illinois: , American Veterinary Medical Association
- Shin, H.-J., K. T. Cameron, J. A. Jacobs, E. A. Turpin, D. A. Halvorson, S. M. Goyal, . . . M. K. Njenga** (2002). "Molecular epidemiology of subgroup C avian pneumoviruses isolated from the United States and comparison with subgroup A and B viruses." *J. Clin. Microbiol*(40): 1687-1693.
- Shin, H. J., K. V. Nagaraja, B. McComb, D. A. Halvorson, F. F. Jirjis, D. P. Shaw, . . . M. K. Njenga** (2002). "Isolation of avian pneumovirus from mallard ducks that is genetically similar to viruses isolated from neighboring commercial turkeys." *Virus Res* 83(1-2): 207-212.
- Shin, H. J., M. K. Njenga, D. A. Halvorson, D. P. Shaw and K. V. Nagaraja** (2001). "Susceptibility of ducks to avian pneumovirus of turkey origin." *Am J Vet Res* 62(7): 991-994.
- Shin, H. J., M. K. Njenga, B. McComb, D. A. Halvorson and K. V. Nagaraja** (2000). "Avian pneumovirus (APV) RNA from wild and sentinel birds in the United States has genetic homology with RNA from APV isolates from domestic turkeys." *J Clin Microbiol* 38(11): 4282-4284.
- Shin, H. J., G. Rajashekara, F. F. Jirjis, D. P. Shaw, S. M. Goyal, D. A. Halvorson and K. V. Nagaraja** (2000). "Specific detection of avian pneumovirus (APV) US isolates by RT-PCR." *Arch Virol* 145(6): 1239-1246.
- Skiadopoulos, M. H., S. Biacchesi, U. J. Buchholz, E. Amaro-Carambot, S. R. Surman, P. L. Collins and B. R. Murphy** (2006). "Individual contributions of the human metapneumovirus F, G, and SH surface glycoproteins to the induction of neutralizing antibodies and protective immunity." *Virology* 345(2): 492-501.
- Smallwood, S., C. D. Easson, J. A. Feller, S. M. Horikami and S. A. Moyer** (1999). "Mutations in conserved domain II of the large (L) subunit of the Sendai virus RNA polymerase abolish RNA synthesis." *Virology* 262(2): 375-383.
- Sourimant, J., M. A. Rameix-Welti, A. L. Gaillard, D. Chevret, M. Galloux, E. Gault and J. F. Eleouet** (2015). "Fine mapping and characterization of the L-polymerase-binding domain of the respiratory syncytial virus phosphoprotein." *J Virol* 89(8): 4421-4433.
- Stuart, J. C.** (1989). Rhinotracheitis: turkey rhinotracheitis (TRT) in Great Britain. London, Butterworth.
- Sun, J., Y. Wei, A. Rauf, Y. Zhang, Y. Ma, X. Zhang, . . . J. Li** (2014). "Methyltransferase-defective avian metapneumovirus vaccines provide complete protection against challenge with the homologous Colorado strain and the heterologous Minnesota strain." *J Virol* 88(21): 12348-12363.

- Sun, S., F. Chen, S. Cao, J. Liu, W. Lei, G. Li, . . . H. Li** (2014). "Isolation and characterization of a subtype C avian metapneumovirus circulating in Muscovy ducks in China." *Vet Res* 45: 74.
- Svenda, M., M. Berg, J. Moreno-Lopez and T. Linne** (1997). "Analysis of the large (L) protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: identification of possible functional domains." *Virus Res* 48(1): 57-70.
- Szerman, N., C. Allee, E. Lemaitre, C. Courtillon, M. Amelot, D. Courtois, . . . P. A. Brown** (2019). "The small hydrophobic (SH) gene of North American turkey AMPV-C does not attenuate nor modify host tropism in recombinant European duck AMPV-C." *Virology* 526: 138-145.
- Takeuchi, K., K. Tanabayashi, M. Hishiyama and A. Yamada** (1996). "The mumps virus SH protein is a membrane protein and not essential for virus growth." *Virology* 225(1): 156-162.
- Tanaka, M., H. Takuma, N. Kokumai, E. Oishi, T. Obi, K. Hiramatsu and Y. Shimizu** (1995). "Turkey rhinotracheitis virus isolated from broiler chicken with swollen head syndrome in Japan." *J Vet Med Sci* 57(5): 939-941.
- Tanner, S. J., A. Ariza, C.-A. Richard, H. F. Kyle, R. L. Dods, M.-L. Blondot, . . . J. N. Barr** (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): 1580-1585.
- Tarpey, I., M. B. Huggins, P. J. Davis, R. Shilleto, S. J. Orbell and J. K. Cook** (2001). "Cloning, expression and immunogenicity of the avian pneumovirus (Colorado isolate) F protein." *Avian Pathol* 30(5): 471-474.
- Tawar, R. G., S. Duquerroy, C. Vornrhein, P. F. Varela, L. Damier-Piolle, N. Castagne, . . . F. A. Rey** (2009). "Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus." *Science* 326(5957): 1279-1283.
- Tedcastle, A. B., F. Fenwick, M. J. Robinson and G. L. Toms** (2014). "Immunogenicity in mice of human metapneumovirus with a truncated SH glycoprotein." *J Med Virol* 86(4): 547-557.
- Tekes, G., A. A. Rahmeh and S. P. Whelan** (2011). "A freeze frame view of vesicular stomatitis virus transcription defines a minimal length of RNA for 5' processing." *PLoS Pathog* 7(6): e1002073.
- Teng, M. N. and P. L. Collins** (1998). "Identification of the Respiratory Syncytial Virus Proteins Required for Formation and Passage of Helper-Dependent Infectious Particles." *Journal of Virology* 72(7): 5707-5716.
- Thammawat, S., T. A. Sadlon, P. G. Hallsworth and D. L. Gordon** (2008). "Role of cellular glycosaminoglycans and charged regions of viral G protein in human metapneumovirus infection." *J Virol* 82(23): 11767-11774.
- Tiwari, A., D. P. Patnayak and S. M. Goyal** (2006). "Attempts to improve on a challenge model for subtype C avian pneumovirus." *Avian Pathol* 35(2): 117-121.
- Toquin, D.** (2009). "Contribution à l'étude de la variabilité moléculaire et antigénique de la glycoprotéine d'attachement des métapneumovirus aviaires." Thesis.
- Toquin, D., M. H. Bayon-Auboyer, N. Eterradossi and V. Jestin** (1999). "Isolation of a pneumovirus from a Muscovy duck." *Vet Rec* 23(145): 680.
- Toquin, D., M. H. Bayon-Auboyer, V. Jestin and N. Eterradossi** (1999). Réponse sérologique et protection croisée vis à vis de l'infection par une souche non-A non-B du virus de la rhinotrachéite infectieuse de la dinde. 3èmes Journées de la Recherche Avicole, St Malo, France.
- Toquin, D., M. H. Bayon-Auboyer, D. A. Senne and N. Eterradossi** (2000). "Lack of antigenic relationship between French and recent North American non-A/non-B turkey rhinotracheitis viruses." *Avian Dis* 44(4): 977-982.
- Toquin, D., C. de Boisseson, V. Beven, D. A. Senne and N. Eterradossi** (2003). "Subgroup C avian metapneumovirus (MPV) and the recently isolated human MPV exhibit a common organization but have extensive sequence divergence in their putative SH and G genes." *J Gen Virol* 84(Pt 8): 2169-2178.
- Toquin, D., N. Eterradossi and M. Guittet** (1996). "Use of a related ELISA antigen for efficient TRT serological testing following live vaccination." *Vet Rec* 139(3): 71-72.
- Toquin, D., N. Eterradossi and V. Jestin** (2000). "Un nouveau pneumovirus isolé chez le canard : Etude de la sensibilité comparée du caneton, du dindonneau et du poulet." *Filières Avicoles* 627: 55-57.
- Toquin, D., O. Guionie, C. Allee, Y. Morin, L. Le CoQ, F. Zwingelstein, . . . N. Eterradossi** (2006). Compared susceptibility of SPF ducklings and SPF turkeys to the infection by avian metapneumoviruses belonging to the four subgroups. V. International Symposium on Avian Corona and Pneumoviruses and

- Complicating Pathogens University of Giessen Rauschholzhausen, Germany, VVB Laifersweiler Verlag.
- Toquin, D., O. Guionie, V. Jestin, F. Zwingelstein, C. Allee and N. Eterradossi** (2006). "European and American subgroup C isolates of avian metapneumovirus belong to different genetic lineages." *Virus Genes* 32(1): 97-103.
- Townsend, E., D. A. Halvorson, K. V. Nagaraja and D. P. Shaw** (2000). "Susceptibility of an avian pneumovirus isolated from Minnesota turkeys to physical and chemical agents." *Avian Dis* 44(2): 336-342.
- Tran, T. L., N. Castagne, V. Dubosclard, S. Noinville, E. Koch, M. Moudjou, . . . J. F. Eleouet** (2009). "The respiratory syncytial virus M2-1 protein forms tetramers and interacts with RNA and P in a competitive manner." *J Virol* 83(13): 6363-6374.
- Turpin, E. A., L. E. Perkins and D. E. Swayne** (2002). "Experimental infection of turkeys with avian pneumovirus and either Newcastle disease virus or *Escherichia coli*." *Avian Dis* 46(2): 412-422.
- Turpin, E. A., D. E. Stallknecht, R. D. Slemons, L. Zsak and D. E. Swayne** (2008). "Evidence of avian metapneumovirus subtype C infection of wild birds in Georgia, South Carolina, Arkansas and Ohio, USA." *Avian Pathol* 37(3): 343-351.
- Van de Zande, S., H. Nauwynck, D. Cavanagh and M. Pensaert** (1998). "Infections and reinfections with avian pneumovirus subtype A and B on Belgian turkey farms and relation to respiratory problems." *J. Vet. Med. B* 45: 621-626.
- Van de Zande, S., H. Nauwynck, S. De Jonghe and M. Pensaert** (1999). "Comparative pathogenesis of Avian pneumovirus subtype A and B in turkeys." *Avian Pathol* 28: 239-244.
- Van de Zande, S., H. Nauwynck, C. Naylor and M. Pensaert** (2000). "Duration of cross-protection between subtypes A and B avian pneumovirus in turkeys." *Vet Rec* 147(5): 132-134.
- Van de Zande, S., H. Nauwynck and M. Pensaert** (2001). "The clinical, pathological and microbiological outcome of an *Escherichia coli* O2:K1 infection in avian pneumovirus infected turkeys." *Vet Microbiol* 81(4): 353-365.
- van den Hoogen, B. G., T. M. Bestebroer, A. D. Osterhaus and R. A. Fouchier** (2002). "Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus." *Virology* 295(1): 119-132.
- van den Hoogen, B. G., J. C. de Jong, J. Groen, T. Kuiken, R. de Groot, R. A. Fouchier and A. D. Osterhaus** (2001). "A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease." *Nat Med* 7(6): 719-724.
- Vanmechelen, B., M. Bletsa, L. Laenen, A. R. Lopes, V. Vergote, L. Beller, . . . P. Maes** (2018). "Discovery and genome characterization of three new Jeilongviruses, a lineage of paramyxoviruses characterized by their unique membrane proteins." *BMC Genomics* 19(1): 617.
- Velayudhan, B. T., V. C. Lopes, S. L. Noll, D. A. Halvorson and K. V. Nagaraja** (2003). "Avian pneumovirus and its survival in poultry litter." *Avian Dis* 47(3): 764-768.
- Velayudhan, B. T., Q. Yu, C. N. Estevez, K. V. Nagaraja and D. A. Halvorson** (2008). "Glycoprotein gene truncation in avian metapneumovirus subtype C isolates from the United States." *Virus Genes* 37(2): 266-272.
- Wei, L., S. Zhu, X. Yan, J. Wang, C. Zhang, S. Liu, . . . J. Liu** (2013). "Avian metapneumovirus subgroup C infection in chickens, China." *Emerg Infect Dis* 19(7): 1092-1094.
- Weisman, Y., C. Strengal, R. Blumenkranz and Y. Segal** (1988). Turkey rhinotracheitis (TRT) in turkey flocks in Israel - Virus isolation and serological response Sacramento California, USA.
- Welch, S. R., A. K. Chakrabarti, L. Wiggleton Guerrero, H. M. Jenks and M. K. Lo** (2018). "Development of a reverse genetics system for Sosuga virus allows rapid screening of antiviral compounds." *PLoS One* 13(3): e0006326.
- Wen, X., J. C. Krause, G. P. Leser, R. G. Cox, R. A. Lamb, J. V. Williams, . . . T. S. Jardetzky** (2012). "Structure of the human metapneumovirus fusion protein with neutralizing antibody identifies a pneumovirus antigenic site." *Nat Struct Mol Biol* 19(4): 461-463.
- Wen, X., J. Pickens, J. J. Mousa, G. P. Leser, R. A. Lamb, J. E. Crowe, Jr. and T. S. Jardetzky** (2016). "A Chimeric Pneumovirus Fusion Protein Carrying Neutralizing Epitopes of Both MPV and RSV." *PLoS One* 11(5): e0155917.
- Whitehead, S. S., A. Bukreyev, M. N. Teng, C. Y. Firestone, M. St Claire, W. R. Elkins, . . . B. R. Murphy** (1999). "Recombinant respiratory syncytial virus bearing a deletion of either the NS2 or SH gene is attenuated in chimpanzees." *J Virol* 73(4): 3438-3442.

- Williams, R. A., C. E. Savage and R. C. Jones** (1991). "Development of a live attenuated vaccine against turkey rhinotracheitis." *Avian Pathol* 20(1): 45-55.
- Wilson, R. L., S. M. Fuentes, P. Wang, E. C. Taddeo, A. Klatt, A. J. Henderson and B. He** (2006). "Function of small hydrophobic proteins of paramyxovirus." *J Virol* 80(4): 1700-1709.
- Yu, Q., P. J. Davis, T. Barrett, M. M. Binns, M. E. Boursnell and D. Cavanagh** (1991). "Deduced amino acid sequence of the fusion glycoprotein of turkey rhinotracheitis virus has greater identity with that of human respiratory syncytial virus, a pneumovirus, than that of paramyxoviruses and morbilliviruses." *J Gen Virol* 72 (Pt 1): 75-81.
- Yu, Q., P. J. Davis, T. D. Brown and D. Cavanagh** (1992). "Sequence and in vitro expression of the M2 gene of turkey rhinotracheitis pneumovirus." *J Gen Virol* 73 (Pt 6): 1355-1363.
- Yu, Q., C. Estevez, M. Song, D. Kapczynski and L. Zsak** (2010). "Generation and biological assessment of recombinant avian metapneumovirus subgroup C (aMPV-C) viruses containing different length of the G gene." *Virus Res* 147(2): 182-188.
- Yu, Q., C. N. Estevez, J. P. Roth, H. Hu and L. Zsak** (2011). "Deletion of the M2-2 gene from avian metapneumovirus subgroup C impairs virus replication and immunogenicity in Turkeys." *Virus Genes* 42(3): 339-346.
- Yu, W., C. Yang, X. Hao, T. Ma and F. Huang** (2018). "Successful infection of BALB/c mice by a swine hepatitis E virus clone constructed with reverse genetics." *Virus Res* 18(1): 687.
- Yun, B., X. Guan, Y. Liu, Y. Gao, Y. Wang, X. Qi, . . . X. Wang** (2015). "Trypsin- and low pH-mediated fusogenicity of avian metapneumovirus fusion proteins is determined by residues at positions 100, 101 and 294." *Sci Rep* 5: 15584.
- Yun, B. L., X. L. Guan, Y. Z. Liu, Y. Zhang, Y. Q. Wang, X. L. Qi, . . . X. M. Wang** (2016). "Integrin alphavbeta1 Modulation Affects Subtype B Avian Metapneumovirus Fusion Protein-mediated Cell-Cell Fusion and Virus Infection." *J Biol Chem* 291(28): 14815-14825.
- Yunus, A. S., D. Govindarajan, Z. Huang and S. K. Samal** (2003). "Deduced amino acid sequence of the small hydrophobic protein of US avian pneumovirus has greater identity with that of human metapneumovirus than those of non-US avian pneumoviruses." *Virus Res* 93(1): 91-97.
- Zhang, Y., J. Sun, Y. Wei and J. Li** (2016). "A Reverse Genetics Approach for the Design of Methyltransferase-Defective Live Attenuated Avian Metapneumovirus Vaccines." *Methods Mol Biol* 1404: 103-121.

Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort

Service Management Qualité

Thèse préparée par Nathan
SZERMAN

« Bases moléculaires de la spécificité d'hôte chez les métapneumovirus aviaires »

Attestation de management qualité de la thèse
Par Eric CHORIN, chef du Service de Management Qualité

Les travaux de thèse conduits par Nathan SZERMAN se sont déroulés sous management de la qualité, dans l'unité « Virologie, Immunologie et Parasitologie Aviaires et Cunicoles » (U VIPAC) à compter du 01 Décembre 2015. Cela s'est concrétisé par la rédaction, par le doctorant, d'un Plan de Management Qualité (PMQ) signé par lui-même, le Directeur de thèse et le Responsable qualité du Laboratoire. Véritable engagement pour le management de la thèse, ce PMQ a deux normes pour référence :

- la norme NF EN ISO/CEI 17025 (Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais) appliquée dans ce projet, pour la gestion des ressources au sein de l'unité VIPAC ;
- la norme ISO 10006 (Systèmes de management de la qualité – lignes directrices pour le management de la qualité dans les projets) mise en œuvre pour la conduite du projet de thèse.

La préparation du PMQ

Avant la rédaction du PMQ, une réunion de travail a été organisée entre le doctorant, le directeur de thèse, le chef de projet selon la norme ISO 10006, et le Responsable qualité, chef du Service Management Qualité du Laboratoire. Cette réunion a d'abord permis au doctorant de connaître et comprendre les exigences et recommandations de la norme ISO 10006, celles relatives à la norme NF EN ISO/CEI 17025 faisant l'objet d'une information systématique de tout nouvel arrivant au Laboratoire, par la Correspondante qualité de l'unité.

La deuxième partie de la réunion a surtout permis d'aborder le contenu attendu pour le PMQ en faisant systématiquement un lien entre le sujet de la thèse, sa mise en œuvre et la formalisation de son déroulement. Ainsi, les notions de « point critique » dans le projet de thèse, ou de « revue de projet » conformément à la norme ISO 10006, ont fait l'objet d'échanges avec l'équipe de thèse.

Nathan SZERMAN a ensuite rédigé le PMQ de sa thèse en lien avec son directeur de thèse, le chef de projet et le Responsable qualité. Avec ce document, ce sont des éléments d'organisation et de gestion des travaux de thèse qui ont été réfléchis, décidés et formalisés.

La mise en œuvre du PMQ

Comme pour toute démarche de management qualité, la conduite de la thèse s'est traduite par un suivi régulier du chef de projet et du directeur de thèse avec validation des travaux du doctorant. De nombreuses données ont été enregistrées conformément aux engagements pris en termes de traçabilité.

Le management de projet a donné lieu à des vérifications de l'application des dispositions d'organisation formalisées dans le PMQ. Cela s'est notamment traduit par un audit interne de management de projet conduit par le Chef du Service Management Qualité le 12 Octobre 2018. Au terme de cet audit, aucune fiche de constat d'écart n'a été ouverte.

Les exercices de traçabilité faits par l'auditeur, se sont révélés conformes aux engagements de l'équipe de thèse. Plusieurs cahiers de laboratoires normalisés ont été utilisés, y compris pour les réunions de l'équipe de thèse. Le doctorant a aussi stocké ses nombreuses données dans un dossier électronique structuré permettant de retrouver aisément la majorité des données brutes.

Les réunions d'avancement du projet et de suivi de la doctorante sont effectivement tracées.

Dans ses conclusions générales, l'auditeur, a notamment souligné :

- le travail réalisé par l'équipe et en particulier par le doctorant ;
- la qualité de la traçabilité des travaux conduits.

L'audit a permis de confirmer le maintien du respect des exigences de traçabilité et de rigueur scientifique lors de la dernière année de thèse.

Bilan du management qualité de la thèse

Le déroulement de la thèse sous management qualité, a d'abord permis à Nathan SZERMAN de découvrir deux référentiels qualité qui, dans l'esprit au moins, lui seront nécessaires pour sa carrière professionnelle et directement bénéfiques pour des fonctions éventuelles au sein d'un laboratoire ou dans le management d'un projet.

En second lieu, ce management qualité a dû lui être utile sur plusieurs points :

- la formalisation la plus complète possible du projet scientifique, en particulier au démarrage ;
- l'importance de clarifier les rôles respectifs des différents acteurs du projet mais aussi de s'intégrer dans leur agenda respectif ;
- l'intérêt de réfléchir, au moins au début du projet, aux éventuels points critiques et les actions préventives nécessaires pour les maîtriser. Dans le cas présent, cet aspect « point critique » a été parfaitement géré ;
- la nécessité de mettre en œuvre la traçabilité des ressources (personnels compétents et formés, équipements principaux suivis et vérifiés, consommables critiques, locaux attribués à certains usages,...) afin de pouvoir analyser dans les meilleures conditions tout résultat inattendu ;
- l'importance de formaliser tous les résultats et les cheminements intellectuels.

Au final, je suis convaincu que Nathan SZERMAN, a pu acquérir une méthode rigoureuse de conduite de projet en ayant partagé dès le début de sa thèse avec son directeur de thèse et son chef de projet, la démarche de management qualité.

Fait à Ploufragan le 28 Janvier
2019



Eric CHORIN
Chef du Service Management Qualité

Titre : Bases moléculaires de la spécificité d'hôte chez les métapneumovirus aviaires

Mots clés : Métapneumovirus, tropisme d'hôte, génétique inverse

Résumé : Les métapneumovirus aviaires (AMPV) sont responsables d'infections aiguës des voies respiratoires et du tractus génital chez les volailles d'élevage – dont notamment les dindes, poulets et canards – ayant d'importantes conséquences pour l'industrie avicole. A ce jour, quatre sous-groupes (A, B, C et D) et deux lignées d'AMPV-C (Us et Fr) ont été établis selon leurs différences génétiques et antigéniques. Cependant leurs spectres d'hôtes n'ont encore jamais été clairement élucidés. Pour résoudre ce problème, la première partie de cette thèse a consisté à étudier le spectre d'hôte, la pathogénicité comparée et la transmission horizontale des AMPV chez les dindes, poulets et canards. Les résultats de cette étude révèlent que les AMPV-A, B, Us-C et D sont mieux adaptés aux galliformes (dindes et poulets) et que le Fr-AMPV-C est mieux adapté aux palmipèdes (canards). Fait intéressant, des AMPV-C des deux lignées ont été réisolés chez des hôtes pouvant être décrits comme « non conventionnels »,

à savoir Fr-AMPV-C chez des galliformes et Us-AMPV-C chez des poulets, avec des éléments suggérant que l'expression ou l'intégrité du gène SH ont été modifiés. Pour tester le rôle de SH dans le spectre d'hôte, la seconde partie de ma thèse a consisté à développer un système de génétique inverse pour le Fr-AMPV-C permettant la régénération de virus chimérique dont la protéine SH a été échangé avec celle d'un Us-AMPV-C. Ces virus recombinants ont été testés chez des dindes et canards EOPS en conditions expérimentales. Le virus chimérique n'a pas montré de modification de son phénotype en comparaison avec le virus parental, ce qui suggère que les différences de tropisme d'hôte des différentes lignées d'AMPV-C ne sont pas liées au type de protéine SH. Cependant, cela doit être confirmé en régénérant un virus Us-AMPV-C chimérique qui exprime la protéine SH de Fr-AMPV-C et en effectuant les mêmes essais expérimentaux sur des dindes et canards EOPS

Title : Molecular basis of the host specificity of avian metapneumoviruses

Keywords : Metapneumovirus, host tropism, reverse genetics

Abstract : Avian metapneumoviruses (AMPV) cause respiratory and genital disorders in poultry, most notably, turkeys, chickens and ducks and are a major economic concern for the industry. To date, four subgroups of AMPV (A, B, C and D) and two genetic lineages of AMPV-C (Us and Fr) have been identified based on antigenic and genetic differences. However, their host tropism is not clearly defined. To address this issue the first part of the thesis focused on the host spectrum of the different subgroups and lineages of AMPV in turkeys, chickens and ducks, in respect to pathogenicity and horizontal transmission of the viruses. Globally, the results showed that AMPV-A, B, Us-C and D were well adapted to Galliformes (turkeys and chickens) and that the Fr-AMPV-C virus was well adapted to ducks. Interestingly, infectious AMPV-C viruses of both lineages were re-isolated from what could be considered as "non-conventional" hosts i.e. galliformes for Fr-AMPV-C and

chickens for Us-AMPV-C with indications of genome modifications that altered the expression or the integrity of the SH gene. To test a hypothesis that SH plays a role in host tropism, the second part of the thesis consisted in the development of a reverse genetic system for Fr-AMPV-C from which recombinant Fr-AMPV-C viruses with SH proteins derived from Us-AMPV-C's were rescued. These viruses were then tested in SPF ducks and Turkeys under experimental conditions. Recombinant viruses did not demonstrate any notable alteration in host tropism in respect to the parental viruses. Thus it would be reasonable to assume that host tropism differences among AMPV Cs are not linked to the type of SH protein however, this needs to be confirmed by rescuing recombinant Us-AMPV-C viruses that express the SH protein of Fr-AMPV-C's and performing the same experimental trials in SPF ducks and turkeys.