



**HAL**  
open science

# Caractérisation des génomes défectifs de la plateforme vaccinale rougeole et intérêt pour le développement d'un vaccin antipaludique

Marie Mura

## ► To cite this version:

Marie Mura. Caractérisation des génomes défectifs de la plateforme vaccinale rougeole et intérêt pour le développement d'un vaccin antipaludique. Virologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT : 2018USPCC255 . tel-02868691v2

**HAL Id: tel-02868691**

**<https://theses.hal.science/tel-02868691v2>**

Submitted on 16 Jun 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.

Thèse de doctorat  
de l'Université Sorbonne Paris Cité  
Préparée à l'Université Paris Diderot  
**Ecole doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (BioSPC 562)**  
*Unité de Génomique Virale et Vaccination / CNRS UMR 3569*  
*Institut Pasteur Paris*

Caractérisation des génomes défectifs de la plateforme  
vaccinale rougeole et intérêt pour le développement d'un  
vaccin antipaludique

Par Marie Mura

Thèse de doctorat de virologie

Dirigée par Dr. Frédéric Tangy

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 24 mai 2018

Président du jury : Pr. Sylvie Van der Werf, Institut Pasteur, Paris

Rapporteur : Pr. Christophe Rogier, DCSSA, Paris

Rapporteur : Pr. Dominique Garcin, UNIGE, Genève

Examineur : Dr. Branka Horvat, CIRI, INSERM, Lyon

Examineur : Pr. Sylvie Van der Werf, Institut Pasteur, Paris

Directeur de thèse : Dr. Frédéric Tangy, CNRS, Institut Pasteur, Paris

Co-directeur de thèse : Dr. Anastassia V. Komarova, Institut Pasteur, Paris

Membre invité : Pr. Jean-Nicolas Tournier, IRBA, Brétigny sur Orge

*« La science n'a pas de patrie parce que le savoir est le patrimoine de l'humanité, le flambeau qui éclaire le monde. »*

Louis Pasteur

## Remerciements

Mes premiers remerciements vont à **Fred** pour m'avoir pris sous son aile durant ces années de thèse. Merci pour le temps que tu m'as toujours accordé, pour ces discussions parfois tard le soir où ta vision de la science et de la recherche m'a toujours remise sur les rails lorsque je vivais la frustration de l'absence de résultats, ou que j'avais du mal à donner du sens dans mon travail au quotidien. Ma transition de la médecine à la recherche n'aurait pas été possible sans un guide comme toi. Un grand merci également pour les conditions de travail exceptionnelles de l'unité. Il est rare de trouver un lieu aussi accueillant et dynamique, dans lequel chacun peut s'épanouir !

Je remercie ensuite chaleureusement **Anastassia** pour ta présence au quotidien tout au long de ce travail de thèse. Un grand merci pour tout ce que tu m'as appris, de la rigueur à la paillasse jusqu'à la rigueur dans l'écriture, avec toujours un œil bienveillant et un brin de malice !

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail. J'adresse toute ma gratitude à Madame la professeure **Sylvie Van der Werf**. Vous m'aviez permis d'intégrer l'école doctorale en cours d'année et me faites aujourd'hui l'honneur de présider mon jury de thèse. A Monsieur le **MG Christophe Rogier**. Vous étiez déjà présent dans le comité de suivi de ma thèse de médecine à l'HIA Laveran et me faites aujourd'hui l'honneur d'être rapporteur de mon travail. Quel chemin parcouru, toujours sous votre regard bienveillant. Je remercie le Pr. **Dominique Garcin** pour le temps que vous avez bien voulu accorder à la lecture attentive de mon manuscrit. Merci au Dr. **Branka Horvat** pour votre présence en tant qu'examinatrice à ma soutenance. Vos travaux scientifiques m'ont été précieux lors de la rédaction de cette thèse.

**Jean Nicolas**, je ne trouve pas de mot assez fort pour te remercier d'avoir ouvert (et d'ouvrir encore) tant de portes pour moi. Nous n'aurions pas parié sur ce chemin lors de mes planches de préparation de l'assistantat... mais si je suis là, c'est bien grâce à toi !

**Sébastien**, tu m'as donné le goût de la recherche, de cette recherche appliquée qui fait sens. J'espère de tout cœur pouvoir partager des projets de recherche à tes côtés dans les années à venir. Et avec Vincent bien sûr ! Merci également pour ton œil de paludologue avisé sur ce manuscrit.

Je remercie chaleureusement toute l'équipe **G2V**, où j'ai passé de merveilleuses années de travail dans une ambiance incroyable. Quelle chance de travailler dans ces conditions !

**Chanchan**, tu as réussi le miracle de former un médecin au travail de paillasse, toujours dans la bonne humeur, et avec des quantités impressionnantes de trucs et astuces ! Sans toi, j'en serai encore à me demander comment on tient une pipette ! Un grand merci !

**Claude**, tu as été incroyable dans le soutien de mon travail à l'animalerie. Mille mercis ! Les petites souris agouti ont bien de la chance que tu veilles sur elles ! Je ne pense pas pouvoir maîtriser aussi bien les gestes que toi mais je penserai à toi dès que j'aurai une cocotte dans mes mains (ce ne sont pas des cocottes, je sais...).

**Val**, à chaque fois que j'ai été dans la panique de l'urgence, tu as été présente pour les manips. Un grand merci ! Sans compter le soutien moral et l'écoute dont tu fais toujours preuve au sein du laboratoire, et le travail à 4 mains sous la hotte à ARN si prisée !

Et bien sûr, à tous les membres présents et passés de G2V. **Marianne** pour ta bonne humeur et ton humour décalé que j'adore. Les thésards **Dasha, Raul, Sam, Laura, Lucie** et **Alice**. Chacun son tour... **Lucie** is next ! **Jibby**, ta bonne humeur est primordiale dans l'unité. **Atoussa**, où sont passés les kinders ? C'est Mozart qui a dû tout manger... A toute l'équipe de **Nolwenn, Guillaume** pour son côté Geek assumé (on adore) et ses galères de permis, **Maxime** pour avoir squatté la hotte à ARN un bon

bout de temps, et **Ségo** notre baromètre ! Merci à **Heidy** d'avoir repris le flambeau sur les constructions vaccinales antipaludiques. A **Marie-Laurence** puis **Denise**, pour votre soutien logistique administratif ! Et à tous les autres, **Roseline, Nicolas, Jérémy, Alexandre, Stéphanie Laura...**j'en oublie certainement.

Je remercie aussi tous les membres de l'équipe **B2I**. Vous ne m'avez pas beaucoup vu ces dernières années et je sais que vous avez fait un travail de fond incroyable à l'IRBA. Grâce à vous, j'ai pu me consacrer entièrement à ma thèse, et je vous en suis infiniment reconnaissante. Un merci particulier à l'équipe vaccino, **Emma** et **Annabelle**, pour leur contribution à la paillasse, et à **Cyril** pour sa relecture attentive du manuscrit, jusqu'à même corriger le style ! Merci à **Cédric, Clémence, Arnaud, Jessica, Emilie, Clarisse, Belinda, Ousseem, Julien, Frédéric** et **Mathilde**.

Je remercie l'ensemble de nos collaborateurs spécialistes du paludisme pour leur aide précieuse tout au long de ce travail. **Rogério**, merci pour ta disponibilité, ta gentillesse, ta bonne humeur et tes questions philosophiques sur la science. **Pauline**, merci pour ton aide dans la validation du modèle animal et ton implication dans la suite du projet. **Chetan, Aneesh** et **Micheline**, un grand merci pour votre aide dans l'analyse des réponses RH5. Merci également à **Chetan** pour la compilation de nos données pour le GPF vaccinologie.

Je remercie chaleureusement **Mercedes** pour son aide précieuse et sa gentillesse à chaque étape du dépôt de brevet.

A **Claudia, Cécile** et tous les anciens du cours Pasteur de Vaccinologie et du cours Pasteur d'Immunologie avancée. J'ai hâte de vous retrouver chacune autour d'un café !

A mes camarades santards de l'IRBA **Aurélie, Déborah, Lionel, Fabrice, Damien, Benjamin**. Il est loin le temps de la boîte...et nous voilà ici autour d'une même passion pour le travail de recherche. J'espère que nous pourrons mettre en place de nombreux projets collaboratifs dans le futur.

Un grand merci à ma **famille**, ma **belle-famille** et mes **amis** pour leur soutien sans faille et leurs encouragements. **Mes parents**, que je sais très fiers de moi, et qui ont effectué une relecture attentive du manuscrit, et **ma sœur Alice** pour les franches rigolades sur nos vies et leurs contraintes, rendant les difficultés plus légères. Un clin d'œil particulier à **Seb** (et **Nono**) pour avoir permis la validation finale avant impression !

Je finirai par remercier les amours de ma vie, **Cédric** et **Quentin**, qui sont les deux rayons de soleil qui éclairent ma vie.

## Résumé

Le vaccin vivant rougeole a été atténué dans les années 1960 par passages successifs en culture de cellules embryonnaires de poulet. C'est un vaccin très sûr et efficace qui confère une protection à vie. L'essor de la génétique inverse a permis son développement comme vecteur vaccinal, et ouvre de nouvelles perspectives vaccinales pour la prévention des maladies émergentes ou négligées, comme le paludisme, problème de santé publique mondial mais également pour les forces armées françaises. Les bases moléculaires de l'atténuation restent encore partiellement incomprises, mais impliquent des modifications de stimulation de la voie interféron de type I (IFN-I) et du tropisme cellulaire. La stimulation de la voie IFN-I par les souches vaccinales apparaît comme étroitement liée à la présence de génomes défectifs interférents (DI-RNA). Nous avons ainsi recherché et caractérisé de façon systématique les DI-RNAs produits par la plateforme vaccinale rougeole, puis validé leurs fonctions immunostimulatrices par leur liaison spécifique aux récepteurs cytosoliques de l'immunité innée RIG-I et LGP2. La modification du tropisme cellulaire a été décrite comme dépendante du récepteur humain ubiquitaire CD46. Cependant, nous avons montré *in vivo* sur modèle murin que ce récepteur n'est pas essentiel et que seule la barrière IFN-I restreint la réplication virale. Enfin, nous avons développé une stratégie vaccinale antipaludique vectorisée par la rougeole reposant sur l'effet adjuvant des DI-RNAs produits par les vaccins recombinants rougeole.

**Mots-clés :** virus de la rougeole, vaccin vivant atténué, génomes défectifs interférents, barrière d'espèce, tropisme cellulaire, immunité innée, vaccin antipaludique, adjuvant

## Abstract

Measles virus has been attenuated in the 60s after multiple passages in chicken embryo cell culture. It is one of the most efficient and safe vaccines, conferring life-long protection. Thanks to reverse genetics revolution, it is now used as an efficient viral vaccine platform that open new opportunities to develop vaccines against emerging or neglected diseases, as malaria, which remains an issue for global health but also for the French armed forces. The molecular bases of measles attenuation are still not fully elucidated, but mainly lie on type-I interferon (IFN-I) stimulation and cellular tropism. IFN-I stimulation by vaccine strains was linked to the presence of defective interfering genomes (DI-RNAs). Thus, we characterized the DI-RNAs produced by various recombinant measles viruses and studied their immunostimulatory properties after their specific recognition by immune sensors of innate immunity RIG-I and LGP2. Modification of cellular tropism has long been described as dependent on human ubiquitous CD46 receptor. Nevertheless, we showed *in vivo* on murine model that hCD46 is not required for measles vaccine replication and that only IFN-I restricted host susceptibility. Finally, we developed an antimalarial vaccine strategy using measles vector by using adjuvant effect of DI-RNAs naturally produced by recombinant measles vaccines.

**Key words:** Measles virus, live attenuated vaccine, defective interfering genomes, host restriction, cellular tropism, innate immunity, antimalarial vaccine, adjuvant

# SOMMAIRE

<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>1</b>
<b>ABREVIATIONS</b> .....	<b>4</b>
<b>RESUME</b> .....	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>7</b>
A. VACCINATION : HISTORIQUE .....	7
1. <i>Atténuation</i> .....	7
2. <i>Inactivation</i> .....	9
3. <i>Protéines et polysaccharides</i> .....	9
4. <i>Génie génétique</i> .....	10
5. <i>Notion d'adjuvant vaccinal</i> .....	10
B. VIRUS DE LA ROUGEOLE, ATTENUATION VIRALE ET VECTEUR VACCINAL .....	11
1. <i>Morbillivirus et spécificité d'hôte</i> .....	11
2. <i>Virus de la rougeole</i> .....	14
a) Structure .....	14
a) Cycle viral .....	15
b) Physiopathologie .....	19
3. <i>Atténuation virale et vaccin</i> .....	20
4. <i>Epidémiologie post-vaccinale</i> .....	24
5. <i>Plateforme vaccinale rougeole</i> .....	25
a) Vecteur viral et génétique inverse .....	26
b) Réponse immunitaire induite contre l'antigène exogène .....	28
C. ROUGEOLE ET INTERFERONS DE TYPE I .....	31
1. <i>Les interférons</i> .....	31
2. <i>Barrière d'espèce et modèles animaux</i> .....	33
3. <i>Induction d'IFN par le vaccin rougeole</i> .....	35
a) Reconnaissance par les récepteurs de l'immunité innée.....	35
b) Les voies de contournement par le VR .....	37
c) Vaccin versus virus sauvage .....	39
D. LES GENOMES DEFECTIFS INTERFERENTS .....	41
1. <i>Définition</i> .....	41
a) Différents types de DI-RNAs.....	41
b) Notion d'interférence .....	42
c) Pertinence clinique.....	43
2. <i>Paramyxovirus et 5' copy-back DI-RNAs</i> .....	44

a) DI-RNAs produits par les virus rougeole .....	45
b) Rôle immunostimulateur .....	45
3. <i>Intérêt thérapeutique et prophylactique</i> .....	47
4. <i>Questions ouvertes</i> .....	48
E. MODELE D'APPLICATION VACCINALE : LE PALUDISME .....	50
1. <i>Agent causal du paludisme</i> .....	50
2. <i>Problématique de santé publique, dans le monde et pour les forces françaises</i> .....	51
3. <i>Biologie du paludisme</i> .....	53
4. <i>Réponse immunitaire</i> .....	58
a) Immunité innée.....	59
b) Immunité adaptative humorale .....	59
c) Immunité adaptative cellulaire .....	60
d) Stratégies d'échappement immunitaire .....	61
5. <i>Candidats vaccins</i> .....	64
a) Les candidats vaccins les plus avancés.....	64
b) Les autres stratégies développées.....	67
c) Les antigènes d'intérêt.....	68
d) Rationnel d'utilisation du vecteur rougeole .....	70
<b>OBJECTIFS DE LA THESE</b> .....	<b>71</b>
<b>RESULTATS</b> .....	<b>72</b>
A. CARACTERISATION DES GENOMES DEFECTIFS DE LA PLATEFORME VACCINALE ROUGEOLE.....	72
1. <i>Article I : les 5' copy-back DI-RNAs produits par les virus rougeole recombinants sont reconnus sous leur forme non-encapsidée par RIG-I et LGP2, mais pas MDA5</i> .....	72
2. <i>Article II : développement d'un outil bio-informatique pour détecter les DI-RNAs à partir de données de séquençage de nouvelle génération</i> .....	74
B. COMPARAISON DES MODELES MURINS ET BARRIERE D'ESPECE .....	75
1. <i>Article III : le récepteur hCD46 n'est pas requis pour la répllication du VacR in vivo chez la souris : l'IFN-I est la barrière d'espèce</i> .....	75
C. DEVELOPPEMENT D'UN VACCIN ANTIPALUDIQUE VECTORISE PAR LA ROUGEOLE .....	99
1. <i>Article IV : preuve de concept de l'utilisation du vecteur rougeole pour délivrer l'antigène « gold standard » CS</i> .....	99
2. <i>Production d'un vecteur vaccinal multi-stade / multi-antigénique</i> .....	124
3. <i>Développement d'une stratégie vaccinale basée sur l'effet adjuvant des génomes défectifs produits par le vecteur rougeole</i> .....	127
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>130</b>
A. GENOMES DEFECTIFS INTERFERENTS : BIOLOGIE, FONCTION, EVOLUTION .....	130



1. <i>Caractéristiques essentielles</i> .....	130
2. <i>Hypothèses pour la génération des 5' copy-back DI-RNAs</i> .....	131
3. <i>Fonctions immunostimulatrices : balance bénéfice/risque</i> .....	132
4. <i>Hypothèses évolutives et rôle biologique</i> .....	134
B. INTERFERON DE TYPE I ET RESTRICTION D'HOTE .....	135
1. <i>Rôle des IFNs dans la barrière d'espèce des virus</i> .....	135
2. <i>Rôle des IFNs dans la barrière d'espèce des virus rougeole</i> .....	136
3. <i>Intérêt du modèle murin IFNAR</i> .....	138
C. STRATEGIE VACCINALE ANTIPALUDIQUE UTILISANT LE VECTEUR ROUGEOLE .....	139
1. <i>Place de la stratégie vaccinale sous-unitaire</i> .....	139
2. <i>Pertinence des antigènes choisis et découverte de nouveaux antigènes candidats</i> .....	140
3. <i>Avantages et limites de l'utilisation du vecteur rougeole</i> .....	142
<b>PERSPECTIVES</b> .....	<b>144</b>
A. VIRUS VIVANTS ATTENUÉS ET ADJUVANTS NATURELS .....	144
1. <i>Mieux maîtriser les compositions vaccinales</i> .....	144
2. <i>Adjuvant : une nécessité vaccinale qui s'oppose à un rejet sociétal</i> .....	144
3. <i>Usage vétérinaire potentiel de la plateforme vaccinale rougeole</i> .....	145
B. PERSPECTIVES VACCINALES ANTIPALUDIQUES VECTORISÉES PAR LA ROUGEOLE .....	146
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>148</b>
<b>ANNEXE</b> .....	<b>173</b>

# ABBREVIATIONS

Ac	Anticorps	OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ADN/ADNc	Acide desoxyribonucléique/ ADN complémentaire	PAMPs	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>
AMA-1	<i>Aapical membrane antigen 1</i>	<i>Pb</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
ARN/ARNm	Acide ribonucléique/ ARN messager	PBMC	Cellules mononuclées du sang périphérique
ATU	<i>Additional transcription unit</i>	PESS	Panencéphalite sclérosante subaiguë
BCG	Bacille de Calmette et Guérin	<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
CAM	<i>Cell adhesion molecules</i>	<i>Pk</i>	<i>Plasmodium knowlesi</i>
CDC	<i>Center for Diseases Control</i>	<i>Pm</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
CHMI	<i>Controlled human malaria infection</i>	PNH	Primates non humains
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité	<i>Po</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
CS	Protéine circumsporozoïte	PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
DAMPs	<i>Danger associated molecular patterns</i>	RdRp	ARN polymérase ARN dépendante
DC/pDC	<i>Dendritic cells Plasmacytoid DCs</i>	RH5	<i>Reticulocyte binding-like protein 5</i>
DI-RNAs	<i>Defective interfering genomes</i>	RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene 1</i>
eGFP	<i>enhanced Green Fluorescent Protein</i>	RLRs	<i>RIG-I like receptors</i>
EPI	Encéphalomyélite post-infectieuse	rMV	<i>Recombinant measles virus</i>
GS/GE	<i>Gene start / Gene end</i>	RNP	Ribonucléoprotéine
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>	SCR	<i>Short consensus repeat</i>
IFN	Interferon	SeV	Virus Sendai
IFNAR	<i>Interferon alpha/beta receptor</i>	SLAM	<i>Signalling lymphocyte activation molecule</i>
Ig	Immunoglobuline	SPZ	Sporozoïte
ISG	<i>Interferon stimulated genes</i>	STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>
KO	<i>Knock out</i>	TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
LGP2	<i>Laboratory of genetics and physiology 2</i>	TRAP	<i>Thrombospondin-related adhesive protein</i>
MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated protein 5</i>	VacR	Vaccin rougeole
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>	VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
MVA	<i>Modified vaccinia Ankara</i>	VLP	<i>Virus-like particle</i>
NGS	<i>Next generation sequencing</i>	VR	Virus de la rougeole
NK	<i>Natural killer</i>	VRS	Virus respiratoire syncytial
NLRs	<i>NOD-like receptors</i>	VSV	Virus de la stomatite vésiculaire

# RESUME

Le vaccin vivant rougeole a été atténué dans les années 1960 par passages successifs en culture de cellules embryonnaires de poulet. C'est un vaccin très sûr et efficace qui confère une protection à vie. L'essor de la génétique inverse a permis son développement comme vecteur vaccinal, et ouvre de nouvelles perspectives vaccinales pour la prévention des maladies émergentes ou négligées, comme le paludisme, problème de santé publique mondial mais également pour les forces armées françaises. Les bases moléculaires de l'atténuation restent encore partiellement incomprises, mais impliquent des modifications de stimulation de la voie interféron de type I (IFN-I) et du tropisme cellulaire. La stimulation de la voie IFN-I par les souches vaccinales apparaît comme étroitement liée à la présence de génomes défectifs interférents (DI-RNA). Nous avons ainsi recherché et caractérisé de façon systématique les DI-RNAs produits par la plateforme vaccinale rougeole, puis validé leurs fonctions immunostimulatrices par leur liaison spécifique aux récepteurs cytosoliques de l'immunité innée RIG-I et LGP2. La modification du tropisme cellulaire a été décrite comme dépendante du récepteur humain ubiquitaire CD46. Cependant, nous avons montré *in vivo* sur modèle murin que ce récepteur n'est pas essentiel et que seule la barrière IFN-I restreint la réplication virale. Enfin, nous avons développé une stratégie vaccinale antipaludique vectorisée par la rougeole reposant sur l'effet adjuvant des DI-RNAs produits par les vaccins recombinants rougeole.

**Mots-clés** : virus de la rougeole, vaccin vivant atténué, génomes défectifs interférents, barrière d'espèce, tropisme cellulaire, immunité innée, vaccin antipaludique, adjuvant

# ABSTRACT

Measles virus has been attenuated in the 60s after multiple passages in chicken embryo cell culture. It is one of the most efficient and safe vaccines, conferring life-long protection. Thanks to reverse genetics revolution, it is now used as an efficient viral vaccine platform that open new opportunities to develop vaccines against emerging or neglected diseases, as malaria, which remains an issue for global health but also for the French armed forces. The molecular bases of measles attenuation are still not fully elucidated, but mainly lie on type-I interferon (IFN-I) stimulation and cellular tropism. IFN-I stimulation by vaccine strains was linked to the presence of defective interfering genomes (DI-RNAs). Thus, we characterized the DI-RNAs produced by various recombinant measles viruses and studied their immunostimulatory properties after their specific recognition by immune sensors of innate immunity RIG-I and LGP2. Modification of cellular tropism has long been described as dependent on human ubiquitous CD46 receptor. Nevertheless, we showed *in vivo* on murine model that hCD46 is not required for measles vaccine replication and that only IFN-I restricted host susceptibility. Finally, we developed an antimalarial vaccine strategy using measles vector by using adjuvant effect of DI-RNAs naturally produced by recombinant measles vaccines.

**Key words:** Measles virus, live attenuated vaccine, defective interfering genomes, host restriction, cellular tropism, innate immunity, antimalarial vaccine, adjuvant

# INTRODUCTION

# INTRODUCTION

## A. Vaccination : historique

Depuis la découverte par Edward Jenner en 1796 de la protection contre la variole humaine par l'inoculation d'un virus de la même famille (les *orthopoxvirus*) infectant la vache, puis la mise au point de la vaccination contre la rage par Pasteur en 1885, les vaccins sont considérés comme une des réussites les plus importantes de l'histoire de la médecine et de la santé publique. Le succès le plus frappant fut atteint à la fin des années 1970 avec l'éradication de la variole. Cependant, malgré ce succès majeur, il reste de nombreux défis pour le développement de nouveaux vaccins contre les pandémies actuelles, comme l'infection par le virus de l'immunodéficience (VIH) ou le paludisme. La plupart des vaccins, et tout particulièrement les vaccins vivants atténués qui induisent une immunité protectrice de longue durée, ont été produits de façon empirique. Malgré d'importants progrès dans la compréhension des mécanismes immunologiques sous-jacents à l'efficacité vaccinale, les bases moléculaires de l'atténuation et les corrélats de protection restent encore mal compris. Nous présentons ici un rappel historique sur la découverte de la vaccination et les différents types de vaccins développés, avant de concentrer notre propos sur le virus de la rougeole et son atténuation, sujet de notre étude. L'histoire vaccinale, sous sa forme chronologique, est représentée par une frise historique sur la Figure 1. Cependant, pour plus de clarté, nous la présenterons dans le texte sous l'angle des avancées technologiques : atténuation, inactivation, vaccins polysaccharidiques, vaccins protéiques, ingénierie génétique (1).

### 1. Atténuation

L'histoire vaccinale commence à la fin du XVIII<sup>ème</sup> siècle avec l'utilisation par Edward Jenner de la vaccine, variole de la vache, pour remplacer la variolisation déjà pratiquée depuis le XVII<sup>ème</sup> siècle en Chine avec des souches plus ou moins virulentes obtenues des malades eux-mêmes. L'idée développée alors était qu'une petite dose de « poison » administrée protégeait contre ses effets toxiques. Jenner utilisait les pustules d'un *orthopoxvirus* d'origine animale (*cowpox*, infectant la vache), considéré comme atténué, pour protéger l'homme de la variole humaine. Ce

n'est qu'un siècle plus tard que Louis Pasteur formula clairement l'idée d'atténuation et en démontra son utilité, tout d'abord sur le choléra des poules, puis le charbon du mouton, et enfin avec la rage chez l'homme en 1885. Les techniques d'atténuation développées alors étaient l'exposition à la chaleur ou à l'oxygène. Par la suite, les procédés d'atténuation reposèrent sur des passages en série d'un pathogène *in vitro*, sur un hôte inhabituel, ou bien en culture cellulaire. Calmette et Guérin passèrent ainsi le bacille tuberculeux 230 fois sur un milieu artificiel pour obtenir un bacille tuberculeux atténué, dit bacille de Calmette et Guérin (BCG). Theiler et Smith développèrent en 1935 le vaccin contre la fièvre jaune après plusieurs passages du virus chez la souris puis sur des tissus embryonnaires de poulet. La découverte de la culture cellulaire *in vitro* a ensuite révolutionné les travaux en permettant la culture de virus, leur atténuation et l'isolement des souches vaccinales des virus de la poliomyélite, de la rougeole, des oreillons et de la rubéole à partir des années 1950.

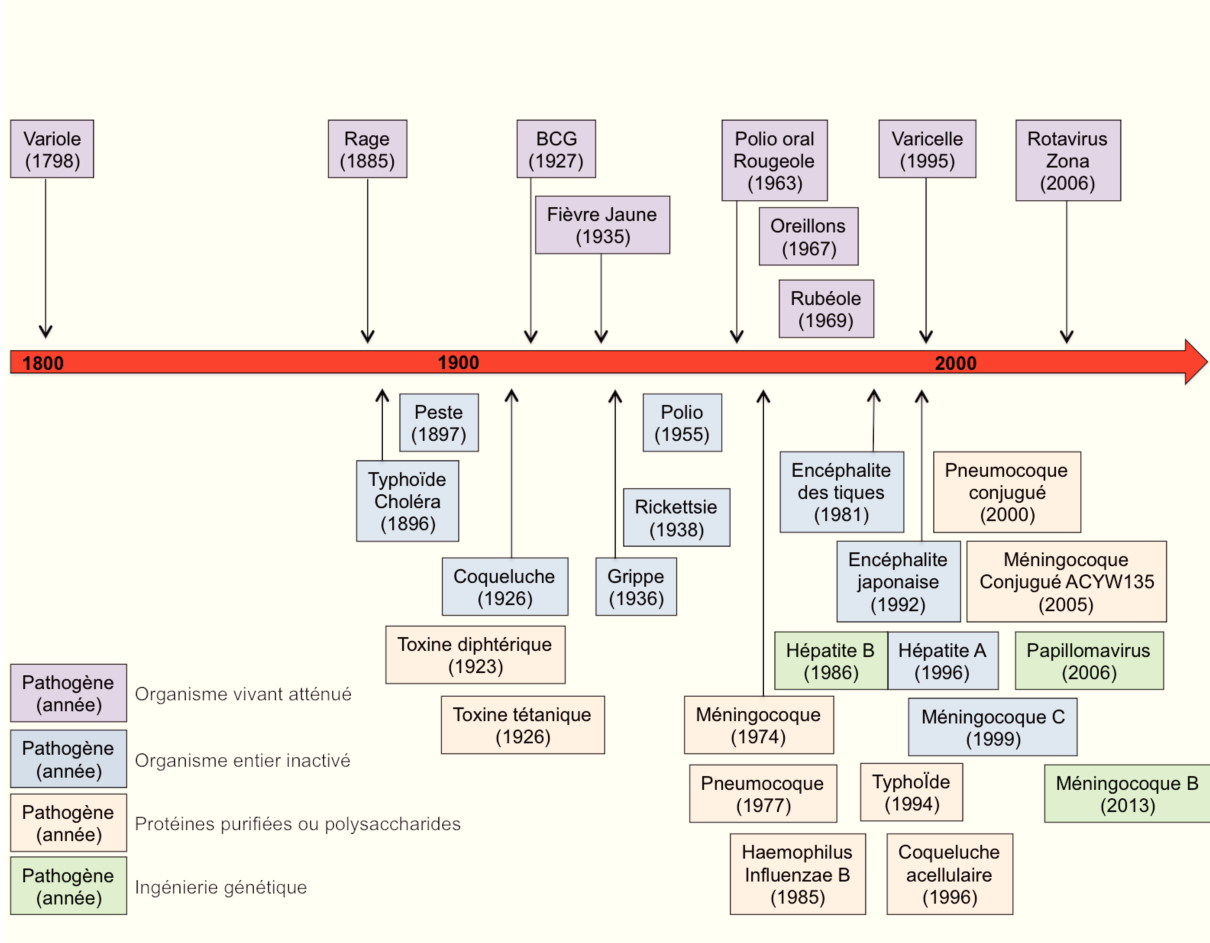


Figure 1 : Frise historique de l'histoire vaccinale.

## 2. Inactivation

Le procédé d'inactivation a été découvert à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle. Son principe repose sur l'observation qu'un micro-organisme tué par la chaleur ou un traitement chimique reste immunogène. Il a été développé initialement pour le développement de vaccins antibactériens (typhoïde, peste, choléra), puis les toxines (toxine pertussique et tétanique) au début du XX<sup>ème</sup> siècle avec la découverte des anatoxines par Gaston Ramon, et dans la deuxième partie du XX<sup>ème</sup> siècle contre les virus (grippe, poliomyélite, hépatite A, encéphalite japonaise). Ces vaccins inactivés sont supposés être plus sûrs car exempts de risques infectieux liés à une réplication incontrôlée ou à une réversion de l'atténuation. Néanmoins, ils ne sont pas non plus exempts d'effets secondaires mal tolérés (douleurs, rougeur et gonflement au point d'injection, fièvre, douleurs musculaires et articulaires). A titre d'exemple, le vaccin cellulaire anticoquelucheux entier inactivé développé en 1926 a ainsi été remplacé en 1996 par un vaccin dit « acellulaire », comportant uniquement des fragments du pathogène, pour améliorer la tolérance vaccinale et donc son acceptabilité.

## 3. Protéines et polysaccharides

Les vaccins sous-unitaires sont constitués d'un ou plusieurs fragments d'un pathogène : protéine ou polysaccharide. Ils limitent les effets secondaires des vaccins, mais avec une immunogénicité souvent plus faible, nécessitant des injections de rappel. Les deux grands exemples sont les anatoxines tétaniques et diphtériques pour les vaccins protéiques sous-unitaires, et les vaccins typhoïdique, méningococcique et pneumococcique pour les vaccins polysaccharidiques. Cependant, les vaccins polysaccharidiques n'induisent qu'une protection de courte durée et n'ont pas d'impact sur le portage et donc l'immunité dite de « groupe ». La conjugaison protéique de ces polysaccharides à la fin du XX<sup>ème</sup> siècle a permis d'améliorer la durée de l'efficacité et le contrôle des portages asymptomatiques (2, 3), ce qui a eu un impact de santé publique important.



#### 4. Génie génétique

La révolution génétique qui s'est opérée à la fin du XXème siècle a ouvert de nouvelles opportunités vaccinales en ne dépendant plus de l'isolement et de la purification d'un agent infectieux ou de ses composants, mais en se basant sur la production directe de l'antigène d'intérêt dans des systèmes cellulaires en culture. Le premier exemple est le vaccin contre l'hépatite B, composé d'antigènes HBs produits en culture de levure modifiée. Par la suite, le développement de vaccins contre les papillomavirus humains oncogènes a été rendu possible par les propriétés de la protéine L1 du virus à s'agréger pour former des particules ressemblant à des particules virales (« *virus-like particles* » ou VLPs), bien plus immunogènes qu'une protéine soluble. Plus récemment, le vaccin méningococcique B est le premier vaccin issu de la vaccinologie inverse (« *reverse vaccinology* »), c'est-à-dire dont l'analyse génétique a permis la sélection de protéines capables d'induire une réponse immune protectrice. D'autres stratégies basées sur les acides nucléiques ont également été développées. Les vaccins à ADN nu n'ont malheureusement pas été capables de reproduire chez l'homme l'immunogénicité observée sur des modèles animaux (4). Plus récemment, des vaccins ARN ont vu le jour. Leur principale difficulté réside en l'emballage des molécules d'ARN pour à la fois protéger l'ARN de la dégradation et les délivrer à l'intérieur des cellules. Des essais cliniques contre la rage (RNAActive® Rabies Vaccine) ou la grippe (mRNA-1440) (5) sont actuellement en cours chez l'homme, avec des premiers résultats encourageants. Enfin, de nombreux virus et bactéries sont aujourd'hui développés comme vecteurs vaccinaux d'antigènes. Le premier vecteur vaccinal viral autorisé a été la souche vaccinale atténuée de fièvre jaune 17D servant de vecteur à l'expression des protéines prM et E du virus de l'encéphalite japonaise (6). La plateforme vaccinale développée au sein de l'unité de Génomique Virale et Vaccination de l'Institut Pasteur utilise le virus de la rougeole comme vecteur pour délivrer des antigènes. Son candidat vaccinal le plus avancé, contre le chikungunya (7, 8), est actuellement en essai clinique de phase II.

#### 5. Notion d'adjuvant vaccinal

Les vaccins sous-unitaires sont moins immunogènes que les vaccins entiers. Pour induire une réponse immunitaire innée et adaptative de qualité, il est nécessaire

d'ajouter à la formulation un adjuvant, défini comme une molécule ayant des effets stimulants de l'immunité sans présenter d'activité antigénique propre (9). Cette notion d'adjuvant vaccinal a été établie par Gaston Ramon dans les années 1920 sur les chevaux servant à produire les sérums anti-diptériques. A ce jour, seul l'hydroxyde d'aluminium est utilisé chez l'homme comme adjuvant dans les vaccins actuellement commercialisés. Ses capacités immunostimulatrices ont été découvertes par Alexander Glenny en 1926 (10) La découverte des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs pour « pathogen associated molecular patterns ») a permis de développer récemment de nombreux dérivés synthétiques stimulant une voie déterminée de l'immunité innée. En effet, l'importance de la stimulation de l'immunité innée pour façonner la réponse adaptative est bien connue aujourd'hui (11). Nous pouvons même considérer que tous les vaccins requièrent des adjuvants, qu'ils soient endogènes (naturellement présents ou produits par le vaccin) ou exogènes (molécule associée à l'antigène) (9). Ainsi, les vaccins vivants atténués (fièvre jaune, rougeole) possèdent intrinsèquement des molécules immunostimulatrices jouant le rôle d'adjuvant.

Après ce rapide tableau de l'histoire des vaccins, nous allons présenter plus en détail le virus de la rougeole, son atténuation, et son développement comme vecteur vaccinal grâce aux techniques de génétique inverse.

## B. Virus de la rougeole, atténuation virale et vecteur vaccinal

Le virus de la rougeole (VR) est un virus à ARN simple brin non segmenté de polarité négative, membre de la famille des *Paramyxoviridae*, du genre *Morbillivirus*, de l'ordre *Mononegavirales*. C'est un pathogène restreint à l'homme et aux Primates non humains (PNH). Cette restriction d'hôte justifie de présenter les *Morbillivirus* avant d'introduire le VR pour une meilleure compréhension de sa spécificité d'hôte.

### 1. Morbillivirus et spécificité d'hôte

Les *Morbillivirus* regroupent huit virus : le VR, le canine distemper virus, le rinderpest virus, le virus de la peste des petits ruminants, le phocine distemper virus, le cetacean morbillivirus, le feline morbillivirus, et le vampire bat morbillivirus. Ces virus ont des caractéristiques génotypiques et phénotypiques communes.

Tous ces virus ont un génome à ARN simple brin non segmenté de polarité négative, dont la taille varie de 15 690 à 16 050 nucléotides et qui comporte six unités transcriptionnelles (12) codant pour huit protéines (Figure 2). L'hémagglutinine (H) et la protéine de fusion (F) sont des glycoprotéines transmembranaires intégrées dans l'enveloppe virale nécessaires à l'attachement du virus et à son entrée dans la cellule. La nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P) et l'ARN polymérase virale ARN-dépendante (RdRp ou L) s'assemblent en complexes ribonucléoprotéiques (RNPs) et assurent la réplication et la transcription du virus au sein du cytoplasme de la cellule infectée. La protéine de matrice (M) relie les RNPs à l'enveloppe et participe à l'assemblage des virions ainsi qu'au processus de bourgeonnement viral. Le gène de la P comporte un chevauchement de cadre de lecture ouverte qui permet de produire la protéine C, et un site d'édition de l'ARN qui, par l'introduction d'un nucléotide G supplémentaire, génère un deuxième transcrit avec décalage du cadre de lecture en C-terminal pour produire la protéine V. Les protéines V et C sont deux facteurs de virulence. Les *Morbillivirus*, comme d'autres *Paramyxovirus*, respectent la « règle de six » qui stipule que la longueur de la totalité du génome doit être divisible par six pour une encapsidation efficace (13, 14). Il existe également une région du génome non traduite de grande taille, localisée entre les gènes des protéines M et F, dont la fonction n'est pas encore comprise. Cette région est particulièrement longue pour le VR (1 kb environ). Enfin, la partie 3' non codante du génome (Leader) comporte une séquence de 107 nucléotides contenant un motif (CN<sub>5</sub>)<sub>3</sub> en position 79, 85 et 91, et la conservation d'un nucléotide C en position 97 (15).

Les *Morbillivirus* sont lymphotropiques et utilisent le récepteur CD150 d'activation lymphocytaire pour initier l'infection. La divergence des récepteurs CD150 au sein des différentes espèces semble expliquer en partie la restriction d'hôte : homme et PNH pour le VR (16), chien pour le canine distemper virus (17), bovin pour le rinderpest virus (18). Cependant, bien que le spectre d'hôte de la maladie pour chaque *Morbillivirus* soit restreint, il semblerait qu'ils puissent tous infecter la majorité des espèces mammifères de façon infraclinique, au moins suffisamment pour induire une séroconversion (19). Le facteur de restriction majeur est alors la réponse immunitaire de l'hôte.

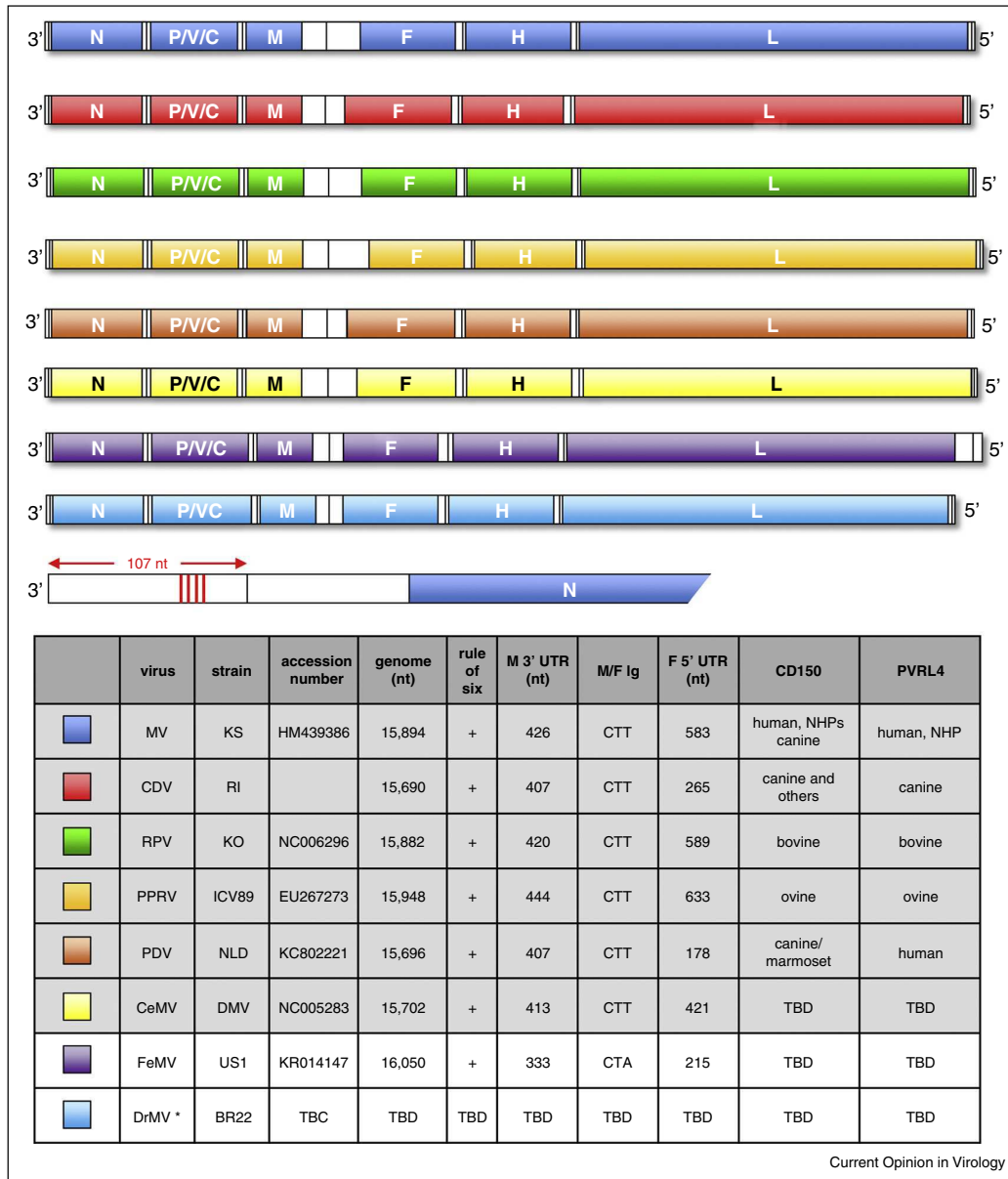


Figure 2 : Représentation schématique de l'organisation génomique des Morbillivirus. MV = VR (bleu), CDV = canine distemper virus (rouge), RPV = rinderpest virus (vert), PPRV = peste des petits ruminants virus (orange clair), PDV = phocine distemper (orange foncé), CeMV = cetacean morbilliviruses (jaune), FeMV = feline morbillivirus (violet) and DrMV = vampire bat morbillivirus (bleu ciel) (12).

D'un point de vue évolutif, le rinderpest virus est le plus ancien *Morbillivirus*. Il serait originaire d'Asie et son essor serait la conséquence directe de la domestication du bétail. Le VR aurait émergé chez l'homme bien plus tard, probablement en parallèle à l'instauration des premières civilisations humaines. Ceci s'explique par la taille des populations nécessaires au maintien d'une transmission endémique de ces

virus à haute contagiosité (de 250 000 à 400 000 individus) (20). Le rinderpest virus était un virus aux conséquences dramatiques pour les élevages bovins. La vaccination a permis d'éradiquer le virus, avec un dernier cas observé au Kenya en 2001 et la déclaration d'éradication 10 ans plus tard en 2011 (21). Nous concentrerons maintenant notre propos sur le VR.

## 2. Virus de la rougeole

### a) *Structure*

Le VR est un virus enveloppé dont le génome est un ARN simple brin non segmenté de polarité négative de 15 894 nucléotides. Les particules virales sont pléiomorphiques en microscopie électronique (Figure 3), d'une taille allant de 300 à 1000  $\mu\text{m}$  (22). La structure générale de la particule virale du VR est représentée Figure 4. Deux protéines importantes sont exprimées à la surface : la protéine H qui permet l'attachement aux récepteurs, et la protéine F responsable de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. L'ARN génomique viral est associé aux protéines N et P pour former un complexe ribonucléoprotéique (RNP) extrêmement stable, résistant à la digestion par les nucléases (23). Le complexe de réplication ARN polymérase ARN dépendant est composé des protéines P et L. Ce complexe est associé aux RNPs dans les virions. La protéine M se localise sous l'enveloppe virale ou autour des RNPs et sert de lien entre l'enveloppe et les RNPs.

Le génome du VR suit l'organisation de génome des *Morbillivirus* (Figure 2). Les parties non codantes en 3' (*Leader*) et 5' (*Trailer*) jouent un rôle majeur dans l'initiation et la terminaison de la transcription, de la réplication, et de l'encapsulation du génome. La séquence promotrice *Leader* initie la transcription et la réplication du génome en antigénome. A l'inverse, la séquence *Trailer* initie la réplication de l'antigénome en génome de polarité négative. Les deux sites comportent des motifs identiques pour la reconnaissance par la polymérase virale, la régulation de la transcription et la réplication (motifs G(N)<sub>5</sub> et B-box). Enfin, des séquences « *gene start* » (GS) et « *gene end* » (GE) assez semblables d'un gène à l'autre sont retrouvées dans toutes les régions intergéniques pour stopper et réinitier la transcription. Elles sont séparées d'un triplet GAA caractéristique (24). Il existe 24 génotypes différents du VR (A, B1-B3, C1-C2, D1-D11, E, F, G1-G3 et H1-H2) (25) mais un seul sérotype, c'est à dire que les anticorps neutralisants acquis protègent

contre tous les virus circulants à ce jour. Ceci implique une haute conservation des antigènes de surface à travers les souches de VR (26).

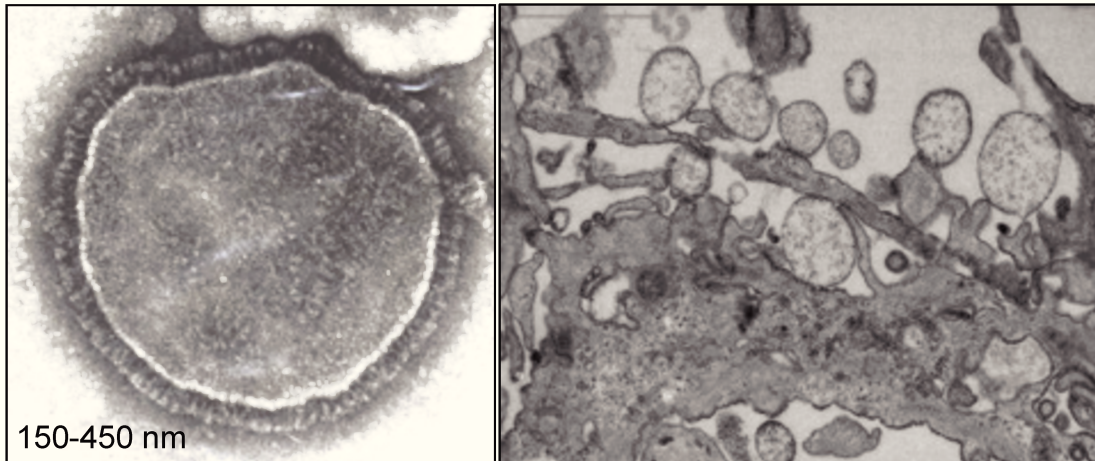


Figure 3 : particules virales du VR en microscopie électronique.

#### a) *Cycle viral*

Le VR se développe dans le cytoplasme des cellules. Nous détaillerons successivement l'entrée dans la cellule avec les différents récepteurs connus, les étapes de transcription/réplication, puis l'assemblage et le bourgeonnement des virions (Figure 4).

- **Entrée dans la cellule**

La protéine H permet au virus de s'attacher à son récepteur cellulaire et d'induire le changement de conformation de la protéine F nécessaire à la fusion membranaire, libérant ainsi la RNP dans le cytoplasme. Les récepteurs identifiés du VR sont CD150/SLAM (16) et nectin-4/PVRL4 (27). Les souches vaccinales (VacR) utilisent également le récepteur ubiquitaire CD46 (28, 29), ce qui semble être la résultante de l'adaptation du virus à la culture cellulaire. Nous décrivons l'atténuation virale au chapitre suivant.

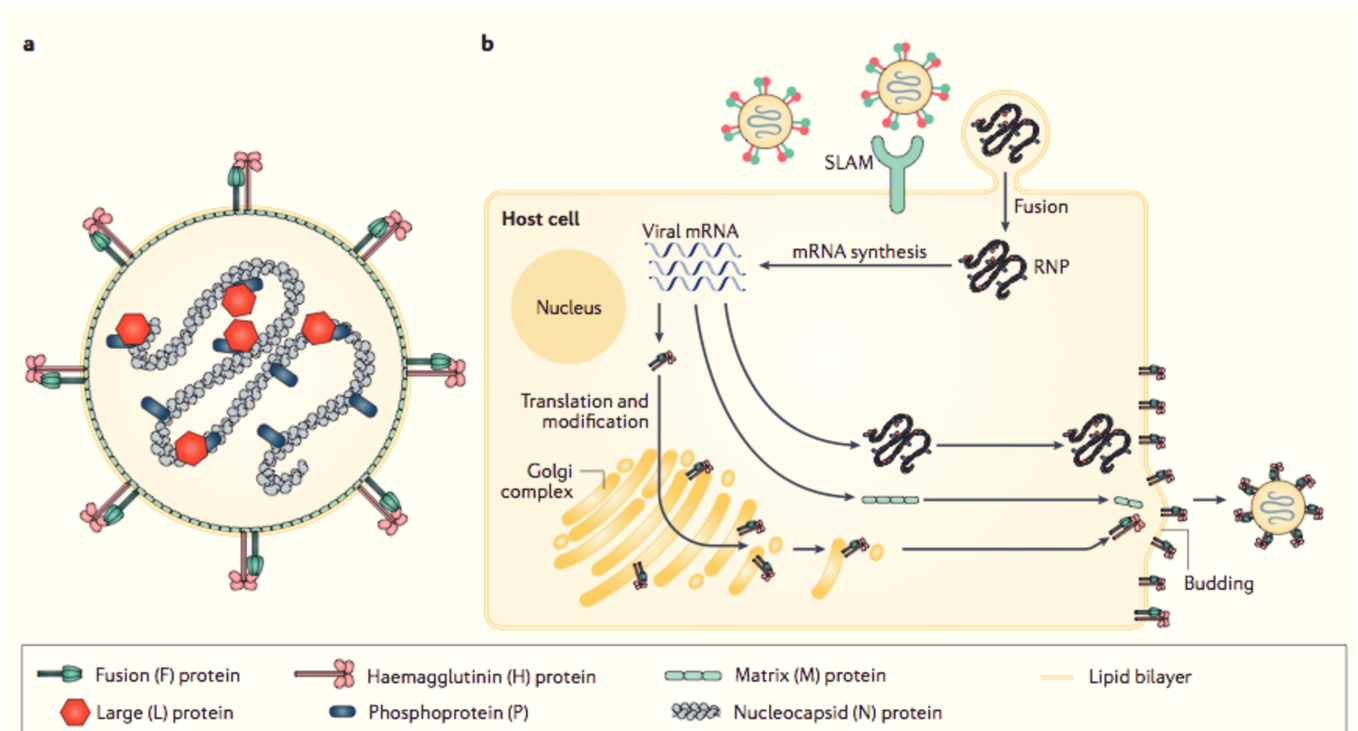


Figure 4 : Cycle viral du VR. (a) Structure du VR. (b) Cycle infectieux cellulaire. (36)

### CD46 (Figure 5a)

La protéine CD46 est un facteur membranaire de régulation du complément. C'est une protéine transmembranaire de type I, constituée de 4 répétitions consensus courtes (SCR pour *short consensus repeat*), suivies d'une région riche en sérines, thréonines et prolines de longueur variable, puis d'une région transmembranaire avec une queue intracytoplasmique. Les deux domaines distaux SCR-1 et SCR-2 sont impliqués dans la liaison à la protéine H du VacR. L'interaction est probablement conformationnelle et met en jeu les résidus en position 451 et 481 de H (30), différents entre souches sauvages et vaccinales. Les isolats primaires de VR non adaptés à la culture cellulaire sont incapables d'interagir avec CD46 (31). L'expression de ce récepteur est quasi-ubiquitaire chez l'homme et les PNH à la surface de toutes les cellules nucléées (32). Il existe plusieurs isoformes produits par épissage alternatif des exons, pouvant être coexprimés. Néanmoins, 4 isoformes prédominent : BC1, C1, BC2 et C2. La lettre fait référence à l'expression des exons

B et C de l'ectodomaine STP (domaine Ser/Thr/Pro) ; le chiffre fait référence au type de queue cytoplasmique (Cyt) exprimée (Cyt 1 étant plus courte que Cyt 2).

#### CD150/SLAM (Figure 5b)

Le récepteur SLAM (pour *signalling lymphocyte activation molecule*) est une glycoprotéine transmembranaire de type I de 70 kDa appartenant à la super famille des immunoglobulines (33), dans un sous-ensemble de la famille des récepteurs CD2. Elle est exprimée par les lymphocytes, les cellules dendritiques et les monocytes activés. La protéine SLAM fonctionne comme corécepteur pour l'activation et/ou l'adhésion des lymphocytes et induit des signaux de phosphorylation de la tyrosine. Egalement connue sous le nom de CD150, c'est une glycoprotéine transmembranaire dont l'expression est régulée positivement sur les cellules B polarisées Th2. La liaison à SLAM favorise l'activation des cellules Th0/Th1, des cellules B, des éosinophiles, des mastocytes et des macrophages. Elle est composée d'un domaine variable (V) situé à l'extrémité N-terminale et critique pour l'interaction avec la protéine H du VR (34). Ce récepteur explique le lymphotropisme du VR.

#### Nectin-4/PVRL4 (Figure 5c)

Découvert plus récemment, ce récepteur a été identifié sur des lignées de cellules épithéliales susceptibles au VR en l'absence du récepteur SLAM (27). Nectin 4 est une molécule cellulaire d'adhésion (CAM) exprimée au niveau des jonctions adhérentes des épithéliums. C'est une protéine transmembranaire de type I appartenant à la super famille des immunoglobulines. Historiquement, cette molécule était connue comme récepteur des poliovirus (35). Dans la physiopathologie de la rougeole, le récepteur Nectin 4 jouerait un rôle dans l'excrétion du VR par l'épithélium respiratoire permettant sa transmission d'un hôte à l'autre par aérosols (36).



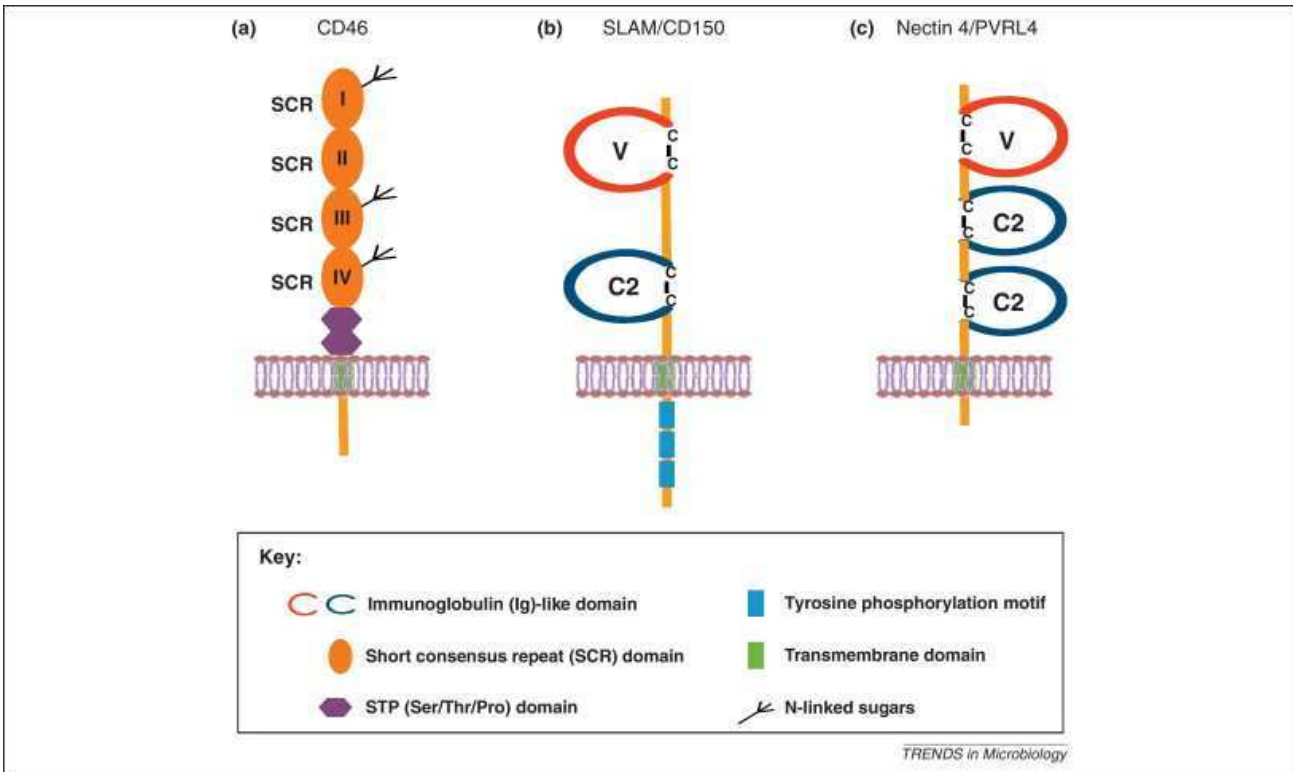


Figure 5 : Structure des 3 récepteurs connus du VR et du VacR (37).

- Transcription et réplication

Ces deux fonctions sont portées par le complexe de réplication viral RdRP. L'ARN génomique de polarité négative sert de matrice pour la transcription qui est initiée en 3'. Les gènes sont transcrits de 3' vers 5', en suivant un mécanisme séquentiel de « *start-stop* », avec un gradient décroissant. Ainsi, de nombreux ARNm codent pour la protéine N, alors que peu codent pour la polymérase L. Les ARNm sont ensuite traduits en protéines grâce à la machinerie cellulaire.

Le génome sert également de matrice pour la synthèse de l'antigénome, qui à son tour servira de matrice pour la réplication du génome entier. La réplication est couplée à l'encapsidation par les protéines N et P (38), de telle façon que les génomes et antigénomes ne se retrouvent pas nus au sein de la cellule mais toujours sous forme de RNP. Les mécanismes de bascule de la transcription à la réplication restent encore peu clairs. Cependant, l'accumulation de la protéine N semble jouer un rôle critique dans ce phénomène (39). La protéine C est également impliquée dans la processivité de la polymérase virale (40) puisqu'en son absence

de nombreux génomes défectifs sont générés. Nous reviendrons sur ce point dans le troisième chapitre de cette introduction.

- Assemblage des virions et bourgeonnement

La protéine M joue un rôle central dans cette étape, en liant les RNPs par l'intermédiaire du domaine C-terminal des protéines N (41), puis en les guidant (42) jusqu'à la membrane cellulaire où sont insérées les protéines F et H. L'assemblage final, grâce à la capacité de polymérisation de la protéine M, permet aux virions de bourgeonner par un mécanisme indépendant de la machinerie cellulaire ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) (43).

### *b) Physiopathologie*

Le VR est un pathogène humain qui se transmet par voie respiratoire. Sa contagiosité est majeure avec un  $R_0$  de 15 à 20 (44), c'est-à-dire que le nombre moyen d'individus qu'une personne infectieuse pourra infecter, tant qu'elle sera contagieuse, dans une population non immunisée, est de 15 à 20 personnes. Ceci explique le fort potentiel épidémique du virus en l'absence de couverture vaccinale suffisante au sein de la population. Ainsi, l'interruption de la transmission endémique du VR au sein d'une population nécessite une couverture vaccinale de plus de 95%.

L'infection par le VR se présente cliniquement chez l'homme par des prodromes avec fièvre, toux et conjonctivite 10-12 jours après exposition au virus, puis l'apparition d'un exanthème caractéristique avec une fièvre élevée (45). Le virus dissémine initialement dans l'organisme par voie lymphatique, avant d'être retrouvé dans le sang 5 à 7 jours après exposition lui permettant de disséminer vers l'ensemble des organes et les épithéliums, notamment respiratoire, par lequel il sera transmis à un autre hôte. L'exanthème marque le début de la réponse immunitaire adaptative, coïncidant avec l'apparition de l'immunité cellulaire et humorale. Cette immunité induit la résolution de l'infection, en l'absence de complications, avec une clairance virale en 7 à 10 jours après l'apparition de l'exanthème. Cependant, l'immunosuppression transitoire causée par la rougeole peut être responsable de sévères complications par d'autres pathogènes (46). La rougeole peut également induire deux manifestations dégénératives du système nerveux central : la panencéphalite sclérosante subaiguë (PESS) et l'encéphalomyélite post-infectieuse

(EPI). La PESS est lentement progressive. Elle apparaît 5 à 15 ans après l'infection par le virus de la rougeole dans 1 cas sur 10 000 (47) et entraîne des troubles cognitifs suivis de troubles moteurs conduisant invariablement au décès. L'EPI apparaît plus fréquemment, touchant 1 cas sur 1000 personnes infectées. Les symptômes neurologiques à type d'ataxie, d'épilepsie ou de mouvements désordonnés sont observés 5 à 14 jours après l'exanthème infectieux. Les séquelles sont fréquentes et l'issue fatale dans 25% des cas.

### 3. Atténuation virale et vaccin

En 1954, l'isolation du VR sur culture cellulaire à partir du sang d'un enfant infecté a ouvert les voies au développement du vaccin (48). Le premier VacR a été développé par atténuation virale après passages successifs de cette souche « Edmonston » (du nom de l'enfant chez qui le virus avait été isolé) sur fibroblastes embryonnaires de poulet pour obtenir la souche Edmonston B (Enders, 1962). Celle-ci protégeait les enfants de la rougeole (49) et a été mise sur le marché en mars 1963. Cependant, elle induisait de la fièvre et un exanthème dans un grand nombre de cas (50). Une atténuation supplémentaire du VR a été obtenue par de nouveaux passages sur fibroblastes embryonnaires de poulet à 32°C afin d'obtenir les souches Schwarz et Moraten, largement utilisées aujourd'hui (Figure 6). D'autres souches ont été développées, dérivées d'Edmonston (Zagreb, AIK-C) ou développées indépendamment (CAM, Shanghai-191, Changchun-47), et qui ont une efficacité vaccinale similaire. La Figure 6 résume l'historique des passages cellulaires des différentes souches.

Toutes les souches vaccinales actuellement utilisées dérivent d'un virus rougeole de type A. L'analyse phylogénétique des génomes des souches vaccinales montre un nombre restreint de substitutions (de 33 à 78, 43 pour la souche Schwarz) par rapport à la souche Edmonston sauvage d'origine, et entre souches vaccinales (51). Les souches vaccinales n'induisent que peu de symptômes. Contrairement à l'infection par le VR, les VacR n'entraînent pas d'immunosuppression et aucun cas de PESS ou d'EPI n'a été observé par la pharmacovigilance.

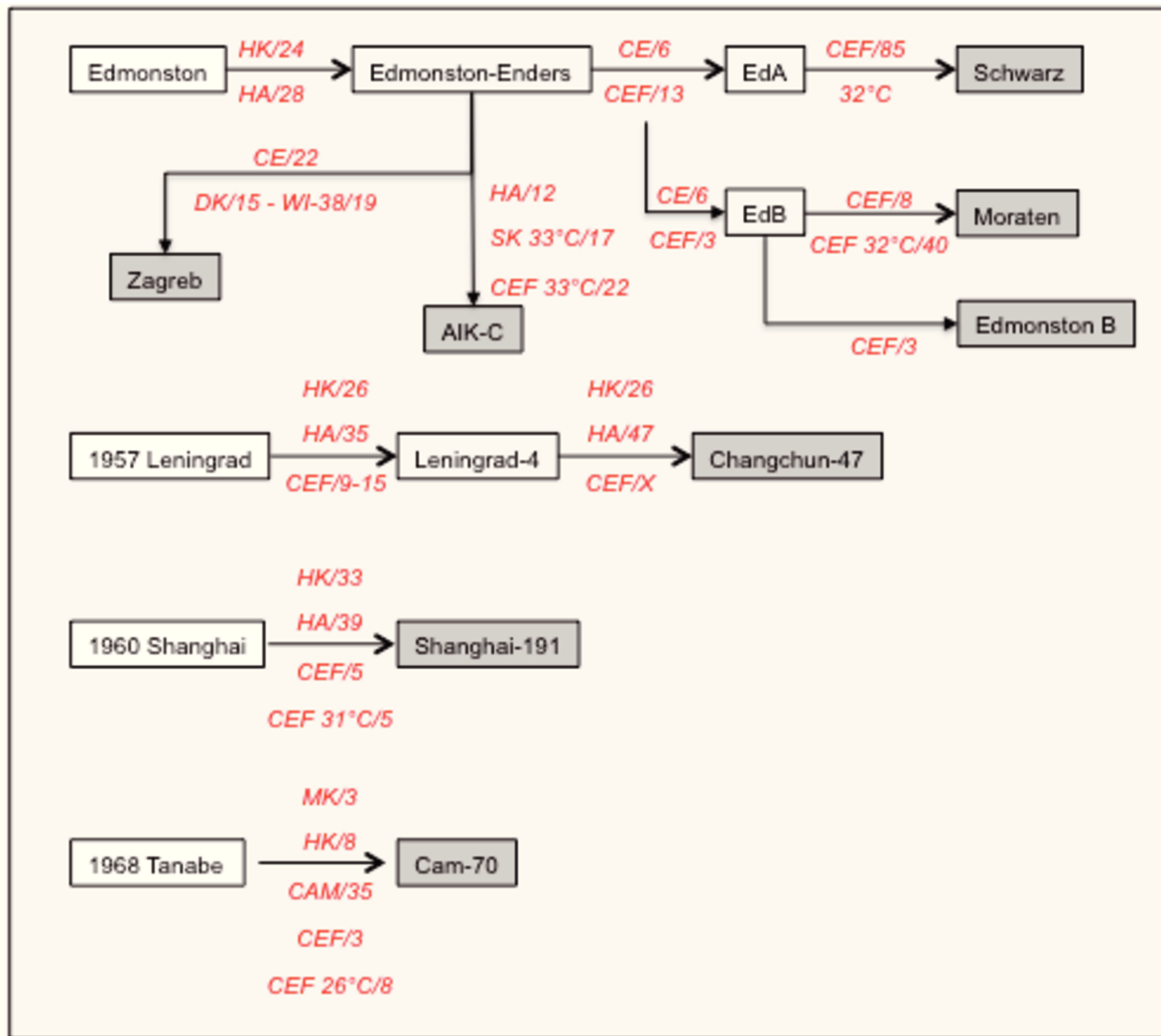


Figure 6 : Atténuation des différentes souches vaccinales de rougeole. Le type de cellule et le nombre de passages sont indiqués entre chaque isolat. La température, lorsqu'elle n'est pas précisée est de 37°C. (HK) human kidney ; (HA) human amnion ; (CE) ; Chick embryo ; (CEF) Chick embryo fibroblast ; (DK) dog kidney ; (SK) sheep kidney ; (WI-38) human diploid cell.

La généralisation de la vaccination en 1974 grâce au programme de vaccination élargi (PVE) instauré par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a permis de réduire drastiquement le nombre de cas. Ainsi, si au début des années 1960, 135 millions de cas étaient rapportés dans le monde et plus de 6 millions de décès liés, entre 1999 et 2005, une réduction de 60% des cas et des décès liés était observée. A ce jour, le VacR a été administré à des milliards d'enfants dans le monde et a largement prouvé sa sécurité et son efficacité. Sa sécurité repose sur la stabilité de son génome et l'absence d'intégration chez l'hôte du fait de son cycle uniquement cytosolique. Son efficacité vaccinale repose sur plusieurs arguments : (i) il reproduit

au plus près l'infection virale ; (ii) c'est un virus répliquatif qui induit une réponse immune « systémique » et non pas uniquement localisée aux ganglions de drainage du site de vaccination ; (iii) il stimule l'immunité innée de façon complexe en exposant plusieurs PAMPs qui seront reconnus par différents récepteurs de l'immunité innée (PRRs pour « *pattern recognition receptors* ») et vont donc induire plusieurs voies d'activation simultanées. L'immunité protectrice est corrélée aux titres d'anticorps neutralisants (52) bien que les déterminants immunologiques de la protection restent incompris. Les composants d'une réponse immune efficace contre la rougeole sont résumés dans la figure 7. La majeure partie des anticorps est dirigée contre la nucléoprotéine et la phosphoprotéine (53) alors que les anticorps neutralisants sont dirigés contre les protéines H et F du VR (54, 55). A partir d'études effectuées au cours d'épidémies de rougeole au sein de populations partiellement vaccinées, l'OMS a défini un titre d'anticorps neutralisants à 200 mUI/ml comme seuil nécessaire pour conférer une immunité protectrice (52, 56). Cependant, plusieurs études ont démontré que l'immunité cellulaire jouait un rôle crucial dans la guérison. En effet, des enfants porteurs d'une agammaglobulinémie présentaient une histoire naturelle de rougeole classique, alors que des enfants présentant des déficits de l'immunité cellulaire développaient une infection chronique pouvant conduire au décès (57, 58). De plus, l'infection de singes macaques déplétés en lymphocytes T CD8+ provoque une virémie massive avec des symptômes exacerbés et le décès (59). Le VacR induit à la fois des réponses lymphocytaires T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, et humorale de longue durée après une injection unique de 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>. L'immunité cellulaire est donc primordiale et le taux d'anticorps neutralisants doit plus être pensé comme un outil de mesure ou corrélat de protection indirect. La notion de corrélat de protection, telle que définie par l'OMS (60), désigne un marqueur de la réponse immunitaire qui est statistiquement associé à la protection des individus dans une large population. Il peut être la cause directe de la protection (substitut de protection), ou n'être qu'une conséquence de la protection sans en être responsable (corrélat de protection indirect).

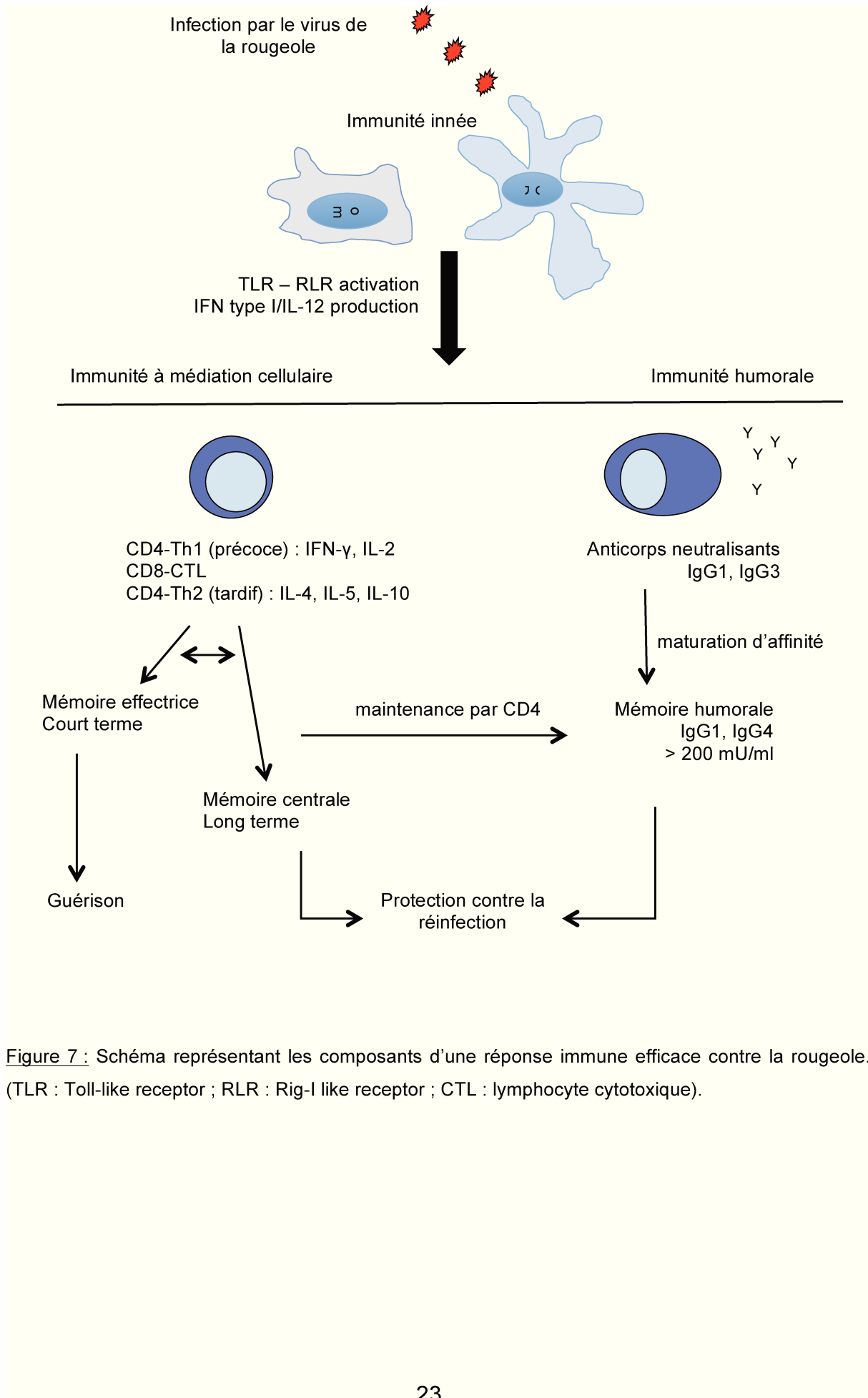


Figure 7 : Schéma représentant les composants d'une réponse immune efficace contre la rougeole. (TLR : Toll-like receptor ; RLR : Rig-I like receptor ; CTL : lymphocyte cytotoxique).

#### 4. Epidémiologie post-vaccinale

Du fait du  $R_0$  élevé du VR, des clusters d'épidémies apparaissent dès que la couverture vaccinale diminue. Lancée en 2001, l'Initiative contre la rougeole et la rubéole est un partenariat mondial placé sous l'égide de la Croix-Rouge américaine, de la Fondation des Nations Unies, des *Centers for Disease Control and Prevention* des États-Unis d'Amérique (CDC), de l'UNICEF et de l'OMS. Ce partenariat avait pour objectif de réduire le nombre de décès par rougeole de 95% d'ici 2015, et à parvenir à éliminer la rougeole et la rubéole dans au moins cinq régions de l'OMS d'ici 2020. La région des Amériques avait déclaré l'élimination de la rougeole en 2016 après avoir maintenu ce statut depuis 2002. Malheureusement, depuis 2017, plusieurs clusters d'épidémies ont vu le jour sur le continent. Les données publiées dans les rapports « *Morbidity and Mortality Weekly Report* » des CDC et dans les Relevés épidémiologiques hebdomadaires de l'OMS montrent que la couverture vaccinale mondiale a récemment atteint un palier et n'atteindra pas les objectifs fixés. Alors que la couverture par la première dose du VacR a progressé pour passer de 72% à 85% dans le monde entre 2000 et 2010, ce pourcentage n'a pas évolué ces dernières années (Figure 8).

L'interruption de la circulation endémique de la rougeole en Europe est un des objectifs de l'OMS. En France, un plan national d'élimination a été mis en place en 2005 en fixant notamment un objectif de couverture vaccinale de 95% à l'âge de deux ans et une incidence annuelle inférieure à 0,1 cas / 100 000 habitants. Le rapport biennuel de la rougeole édité en octobre 2017 par le Centre Européen de prévention des maladies (ECDC pour « European centre for disease control ») rapportait plus de 14 000 cas de rougeole en Europe entre janvier 2016 et juin 2017, dont 34 décès. Les taux de couverture vaccinale étaient sous le seuil des 95% pour la première dose dans 18 pays (61). En France, près de 25 000 cas ont été déclarés ces dix dernières années, avec quatre vagues épidémiques dont une majeure en 2011 (15 000 cas). Un nouveau foyer épidémique persiste depuis novembre 2017, principalement en Nouvelle Aquitaine. Aucun département français n'a à ce jour atteint les 95% de couverture vaccinale à deux ans pour les deux doses de vaccin (62).

Ainsi, la nécessité du vaccin rougeole est toujours d'actualité et ouvre la place à son utilisation comme vecteur vaccinal pour protéger l'homme contre d'autres pathogènes.

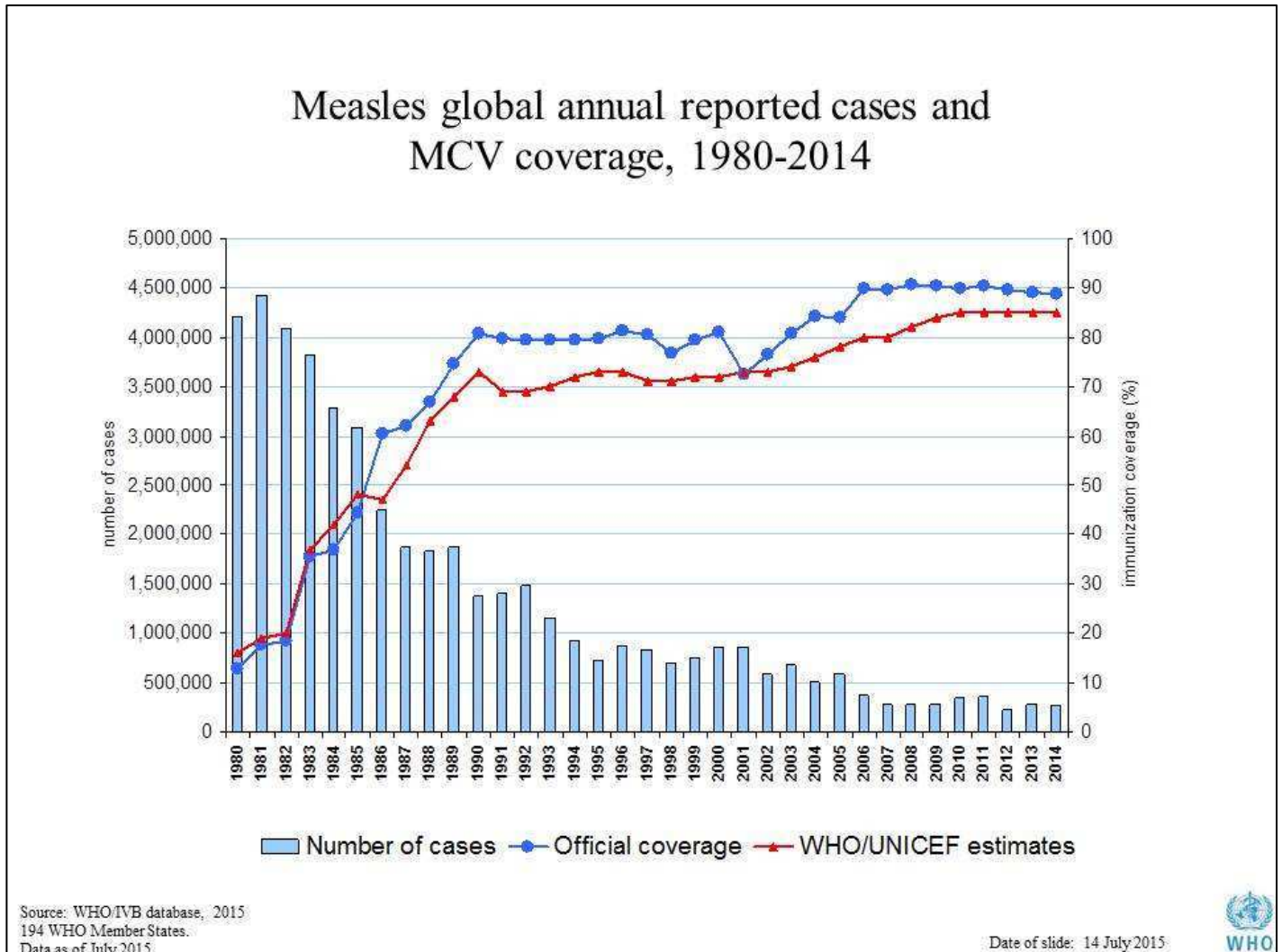


Figure 8 : Couverture vaccinale globale mondiale avec le nombre de cas de rougeole rapporté par année. Données issues de l'Organisation Mondiale de la Santé.

### 5. Plateforme vaccinale rougeole

L'unité de Génomique Virale et Vaccination de l'Institut Pasteur a développé dans les années 2000 une plateforme vaccinale dérivée de la souche vaccinale Schwarz. Depuis, de nombreux candidats vaccins ont été produits et testés sur modèles animaux murins et PNH. Le candidat vaccinal le plus avancé, dirigé contre le virus Chikungunya, a été testé avec succès en essai clinique de phase I (8) et est



actuellement en essai clinique de phase II. Nous présenterons successivement le concept de génétique inverse, la mise au point du vecteur vaccinal, puis la réponse immune de l'hôte à l'antigène exogène.

a) *Vecteur viral et génétique inverse*

La génétique inverse, c'est à dire l'introduction de mutations définies dans le génome d'un organisme et la production de cet organisme à partir de son ADN complémentaire (ADNc), a ouvert la porte à la production de virus et au développement de plateformes vaccinales utilisant les virus comme vecteurs pour délivrer des antigènes exogènes. Les premiers virus à ARN négatifs à avoir été recréés à partir d'un plasmide (virus de la rage (63) puis VSV (64)) ont nécessité la présence d'un virus dit « helper ». Puis des cellules dites « helper » ont été produites pour se passer des virus « helper » et donc des étapes de purifications nécessaires à la séparation des virus produits des virus « helper ». En effet, la séparation n'était pas toujours facilement réalisable et les titres de virus obtenus étaient très réduits.

Le laboratoire de Martin Billeter à l'Université de Zürich a mis au point le premier protocole de production de VR en système cellulaire dans les années 1990 (Figure 9). Il a cloné un ADNc de l'antigénome d'une souche Edmonston B du VR sous contrôle du promoteur du phage T7. Les cellules dites « helper » ont été dérivées de la lignée humaine embryonnaire de rein HEK293 et expriment stablement l'ARN polymérase du phage T7 et les protéines N et P du VR (65). La transfection simultanée du plasmide contenant l'ADNc de l'antigénome viral et du plasmide codant la polymérase L du VR permet la production du virus Edmonston B. L'ARN polymérase du phage T7 transcrit l'ADNc de l'antigénome viral en ARN antigénomique de polarité positive qui est simultanément encapsidé par les protéines N et P produites par les cellules « helper ». Parallèlement, l'ARNm de la polymérase virale L est transcrit par l'ARN polymérase du phage T7. Enfin, la polymérase L prend le relais pour la transcription et la réplication du génome viral. Les particules virales bourgeonnantes sont cultivées sur des cellules de rein de singes (Vero) pour l'amplification et la réalisation de stock viraux.

Des unités additionnelles de transcription (ATU) ont été insérées dans 3 sites du génome : en amont du gène N (ATU1), entre les gènes P et M (ATU2), entre les gènes H et L (ATU3). Ces ATU sont une répétition de la séquence intergénique

située entre les gènes N et P avec les signaux cis-actifs permettant la transcription d'un transgène inséré dans une cassette de clonage (65, 66) (Figure 10). Ces transgènes doivent respecter la « règle de six » pour permettre l'encapsidation virale. En effet, la totalité du génome de la rougeole obéit à cette règle pour être efficacement encapsidé par la multimérisation de protéines N couvrant chacune 6 nucléotides (13, 67).

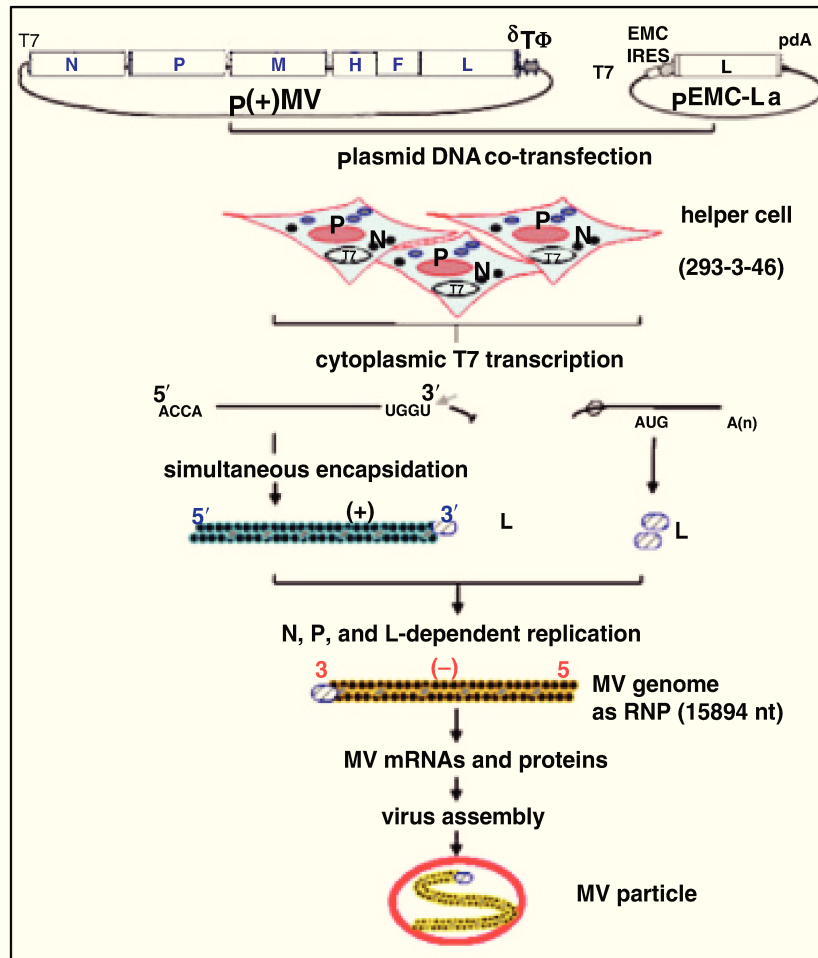


Figure 9 : Système de « rescue » du virus rougeole décrits par Radecke *et al.* utilisant des cellules HEK293 helper exprimant les protéines N et P du VR et la polymérase du phage T7.

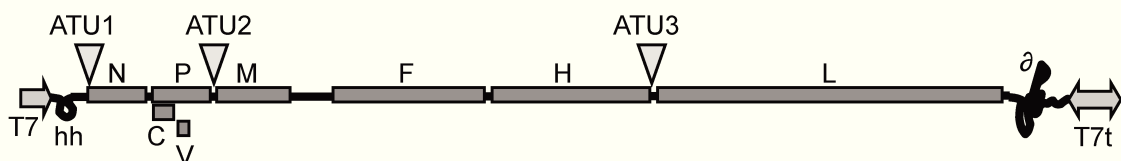


Figure 10 : Sites du génome du VacR permettant l'insertion d'unités additionnelles de transcription (ATU).

La souche vaccinale Edmonston B ayant été abandonnée en 1965 pour des problèmes de réactogénicité, un vecteur dérivé de la souche vaccinale Schwarz a été construit au sein de notre laboratoire dans les années 2000 (68). L'ADNc a été cloné à partir de l'ARN de particules virales purifiées provenant d'une préparation virale industrielle (Rouvax, Aventis Pasteur). De la même façon que pour la souche Edmonston, l'antigénome viral de la souche Schwarz a été cloné sous le contrôle du promoteur de la polymérase du phage T7, incluant un motif GGG pour optimiser son efficacité. Deux ribozymes (hammerhead et hépatite delta) encadrent la séquence d'ADNc afin de permettre un clivage de l'ARN viral au nucléotide près, en respectant la règle de six. Le plasmide résultant, appelé pTM-MV-Schwarz permet de produire le virus vaccinal à partir du protocole décrit par Radecke (65) et modifié par Parks (66). Trois plasmides ont ensuite été générés, portant les cassettes de clonages en position 1 (pTM1-MV-Schwarz), en position 2 (pTM2-MV-Schwarz) ou en position 3 (pTM3-MV-Schwarz) et exprimant l'eGFP (enhanced green fluorescent protein). A partir de ces plasmides initiaux, des combinaisons ont été générées pour permettre l'expression simultanée de transgènes dans plusieurs ATU (principalement ATU 2 et 3). Le génome de la rougeole présente un gradient décroissant d'expression de ses gènes (69). Ainsi, la position d'insertion du transgène a des conséquences sur le niveau d'expression du transgène. L'ATU 2 induira donc une expression plus forte que l'ATU 3. L'ATU 1 est relativement peu utilisé car le transgène s'exprime plus fortement que la protéine N et perturbe ainsi l'efficacité virale.

A ce jour, de nombreux transgènes ont été introduits dans le vecteur rougeole à différentes fins : (i) molécules fluorescentes pour étudier la physiopathologie du virus (70-72) ; (ii) copie taguée de gènes de rougeole pour étudier leurs interacteurs protéiques et acides nucléiques (73, 74) ; (iii) inactivation de l'expression des gènes pour étudier le rôle des facteurs de virulence (40, 75, 76) ; (iv) antigènes de différents pathogènes pour produire des candidats vaccins (tableau 1) (77) ; (v) antigènes visant à augmenter le potentiel oncolytique du virus (78, 79).

#### *b) Réponse immune induite contre l'antigène exogène*

Le virus produit à partir du vecteur pTM-MV-Schwarz induit des réponses humorales et cellulaires identiques à la souche vaccinale classique parentale MV-

Schwarz (68). La réponse au VacR induit des réponses humorales et cellulaires de longue durée (Figure 7). Chez le nourrisson vacciné, en l'absence d'anticorps maternels, l'injection de  $10^4$  TCID<sub>50</sub> du VacR induit dans plus de 95% des cas des titres élevés d'anticorps neutralisants, et dans plus de la moitié des cas, des réponses lymphoprolifératives (80, 81). Cependant, l'utilisation de la rougeole comme vecteur induit-il le même profil de réponse contre l'antigène exogène ?

Sur modèle animal murin ou PNH (ces modèles seront décrits au chapitre suivant), la présence d'anticorps neutralisants a été démontrée contre des antigènes des virus de la dengue, du chikungunya, du virus West Nile, du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), des coronavirus (MERS, SARS), ou encore du virus respiratoire syncytial (VRS) (Tableau 1). La réponse anticorps se fait à des titres élevés, mais qui dépend de la quantité de protéine exprimée (82). De plus, la présence d'une réponse cellulaire a été démontrée pour plusieurs antigènes, dont ceux issus du VIH avec induction de réponses lymphocytaires T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (83, 84). Enfin, la protection à l'épreuve infectieuse est validée dans de nombreux modèles. Le Tableau 1 récapitule l'ensemble des candidats vaccins dérivés du vecteur vaccinal rougeole (77).

Chez l'homme, seuls des antigènes du virus Chikungunya (8) et du VIH ont été testés (résultats non publiés à ce jour). Le candidat vaccinal rougeole-chikungunya a démontré au cours des essais cliniques de phase I sa très bonne tolérance clinique et l'induction d'une immunogénicité (anticorps neutralisants) pour 100% des sujets après 2 injections à  $1.5 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub> espacées d'un mois, ou après une seule dose à  $3 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>. De plus, il apporte la première preuve chez l'homme que la pré-immunité contre la rougeole ne bloque pas l'induction d'une réponse spécifique à l'antigène exogène. Ce point démarque nettement le vecteur rougeole des vecteurs vaccinaux non réplicatifs tels que les adénovirus ou les virus de vaccine modifié de type Modified Vaccinia Ankara (MVA). L'essai clinique de phase II est en cours, mais les premiers résultats vont dans le même sens.

L'antigène exogène semble ainsi profiter entièrement du bénéfice de la réponse immunitaire humorale et cellulaire induite par le vaccin rougeole, et donc très certainement aussi de l'induction d'une mémoire à long terme. La persistance de titres élevés d'anticorps a déjà été montrée sur modèle murin (85), mais reste encore à démontrer dans des essais chez l'homme.

Target	Antigen	ATU <sup>a</sup>	Strain <sup>b</sup>	Model <sup>c</sup>	Response <sup>d</sup>	Challenge <sup>e</sup>
CHIKV	C-E3-E2-6 k-E1	P	Schwarz	CD46-mice, Human (Phase I)	ELISA, nAbs, ELISpot	Yes
DENV	E, M; EDIII	P	Schwarz, Moraten	CD46-mice	ELISA, nAbs, Cytokines,	Yes
EBV	gB350	N, P	Edm- Zagreb	Cotton rats, Rhesus mac.	ELISA ELISpot	n.t.
FluV	HA	P	Edm- Zagreb	n.t.	n.t.	n.t.
HBV	sHBsAg	P, H, L	Edm-B, Moraten	CD46-mice, Rhesus mac.	ELISA, nAbs	n.t. (MV)
HCV	C, E1, E2; E1/Ft, E2/Ft	P	Edm-B, Moraten	CD46-mice, humanized mice	ELISA, nAbs	n.t.
<i>Helicobac-ter pylori</i>	NAP	N	Edm-B	CD46-mice	ELISA, ELISpot	n.t.
HIV-1	Env	P	Schwarz	CD46-mice, Rhesus mac., Cynomolgus mac., Human (Phase I)	nAbs, ELISA, IFN $\gamma$ -ICS	n.t.
HPV	L1	P	Edm- Zagreb	CD46-mice Rhesus mac.	ELISA, nAbs	n.t.
JEV	prM-E	P	AIK-C	Cotton rats	ELISA, nAbs	n.t.
MERS-CoV	S	P, H	Moraten	CD46-mice	ELISA, nAbs, ELISpot	Yes
MuV	HN, F	P	Edm-B Edm- Zagreb	n.t.	n.t.	n.t.
NiV	G	N	Edm-B, (wtHL)	AGM, golden hamsters	ELISA	Yes
RSV	F, G, M2-1, NP	N, P	AIK-C, Edm- Zagreb	Cotton rats, Rhesus mac.	ELISA, nAbs, ELISpot	Yes
SARS-CoV	S, N	P	Schwarz	CD46-mice	ELISA, nAbs, ELISpot	Yes
SIVmac	Env (+ Gag), Gag, Pol	P, H	Edm-B, Edm- Zagreb	CD46-mice, Rhesus mac.	ELISA, ICS, ELISpot	n.t.
WNV	E	P	Schwarz	CD46-mice, Squirrel monkeys	ELISA nAbs, ELISpot	Yes

Tableau 1 : Vaccins recombinants vectorisés par différentes souches de VacR (77).

## C. Rougeole et interférons de type I

L'efficacité vaccinale repose en grande partie sur la stimulation appropriée de l'immunité innée afin de polariser et façonner la réponse adaptative. La première ligne de défense antivirale est l'interféron de type I. Après avoir défini les différents types d'interférons, nous présenterons l'importance de la voie interféron de type I (IFN-I) dans la restriction d'hôte du VR et le choix du modèle animal d'étude, puis nous discuterons des données actuelles sur l'induction d'IFN-I par le VR et le VacR.

### 1. Les interférons

La notion d'interférence a été développée dès 1935, suite à l'observation suivante : l'infection expérimentale d'un animal par un virus peut empêcher l'infection par un autre virus inoculé 48 heures après. Ce n'est que 20 ans plus tard, en 1957, qu'Isaacs et Lindenmann découvrent la protéine responsable de cet effet : c'est l'IFN (86). Les IFNs sont des petites protéines d'environ 150 acides aminés, glycosylées ou non. D'après leurs propriétés biologiques et l'origine cellulaire, on distingue trois familles d'IFN (87, 88).

Les IFNs de type I (IFN-I) sont portés par un locus multigénique sur le bras court du chromosome 9 chez l'homme. Il existe 13 sous-types d'IFN $\alpha$  chez l'homme (14 chez la souris), un seul IFN $\beta$  et plusieurs IFNs mal définis (IFN $\epsilon$ , IFN $\iota$ , IFN $\kappa$ , IFN $\omega$ , IFN $\delta$ , IFN $\zeta$ ). Ils agissent tout d'abord par voie autocrine ou paracrine sur leurs récepteurs (IFNAR) afin d'induire dans les cellules infectées ou avoisinantes un état antiviral : la mise en place d'un large programme de transcription génique qui interfère avec les différentes étapes du cycle viral au sein de la cellule. Ensuite, ils activent l'immunité innée en stimulant la présentation antigénique et l'activation des cellules Natural Killers (NK). Enfin, ils influencent la polarisation de la réponse immune adaptative vers une reconnaissance spécifique de l'antigène et l'induction d'une mémoire (88). La plupart des cellules produisent de l'IFN $\beta$ , alors que seules les cellules hématopoïétiques, et plus particulièrement les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), produisent l'IFN $\alpha$ .

L'IFN de type II (IFN-II) consiste en un seul gène codant pour l'IFN $\gamma$ . Il est principalement produit par les lymphocytes T et les cellules NK et agit comme

activateur des cellules de l'immunité (macrophages, cellules NK et lymphocytes T cytotoxiques) qui exposent à leur surface cellulaire un récepteur à IFN $\gamma$  (IFNGR).

Les IFNs de type III (IFN-III) regroupent l'IFN $\lambda$ 1 (ou IL-29), l'IFN $\lambda$ 2 (ou IL-28A), l'IFN $\lambda$ 3 (ou IL-28B) et l'IFN $\lambda$ 4. Leurs fonctions sont similaires à celles des IFN-I (89) mais leur spectre d'action est plus restreint, limité aux cellules épithéliales qui expriment leurs récepteurs à leur surface (90).

Nous allons concentrer notre propos sur les IFN-I et leurs propriétés antivirales. Les IFN $\alpha$  et IFN $\beta$  lient un récepteur transmembranaire hétérodimérique (IFNAR), composé de deux sous-unités (IFNAR1 et IFNAR2). Dans cette voie d'activation canonique de l'IFN-I, l'engagement du récepteur induit l'activation des kinases Janus (Jak) qui vont phosphoryler et activer les transducteurs de signal et facteurs de transcription STAT1 et STAT2 (Figure 11) pour aboutir, dans le noyau, au complexe tri-moléculaire ISGF3 (STAT1, STAT2 et IRF9) de liaison à l'ADN (*IFN-stimulated response elements* ou ISRE : séquence consensus TTTCNNTTTC). Ce dernier induit la transcription de quelques centaines de gènes, dits « *interferon-stimulated genes* » (ISGs) qui sont responsables de l'induction d'un état antiviral cellulaire *via* plusieurs mécanismes, dont l'inhibition de la réplication virale, la transcription et la traduction, la dégradation des acides nucléiques viraux et l'altération du métabolisme cellulaire lipidique. Mais les effets de l'IFN-I ne se résument pas à la réponse aiguë antivirale. En effet, l'IFN-I polarise la réponse immune innée qui va façonner efficacement la réponse adaptative cellulaire. Il active les cellules dendritiques immatures en augmentant l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), ainsi que les molécules de costimulation tel que CD80/CD86, améliorant la capacité à stimuler les cellules lymphocytaires T (91). De plus, l'IFN-I favorise la présentation croisée des antigènes par les DCs (92) et accélère le processus de migration vers les ganglions lymphatiques (93). Les DCs ainsi activées produisent l'IL12 qui est une cytokine essentielle dans la polarisation de la réponse Th1 stimulant la production d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes T et NK. L'action sur les lymphocytes B et T est également directe et favorise la survie et la prolifération cellulaire, ainsi que les fonctions effectrices et la formation d'une mémoire immunologique (87). Il est à noter toutefois que l'IFN-I peut avoir des effets néfastes au cours des infections chroniques virales en stimulant la sécrétion de cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 (94) ou la voie apoptotique TRAIL/DR5 (95).

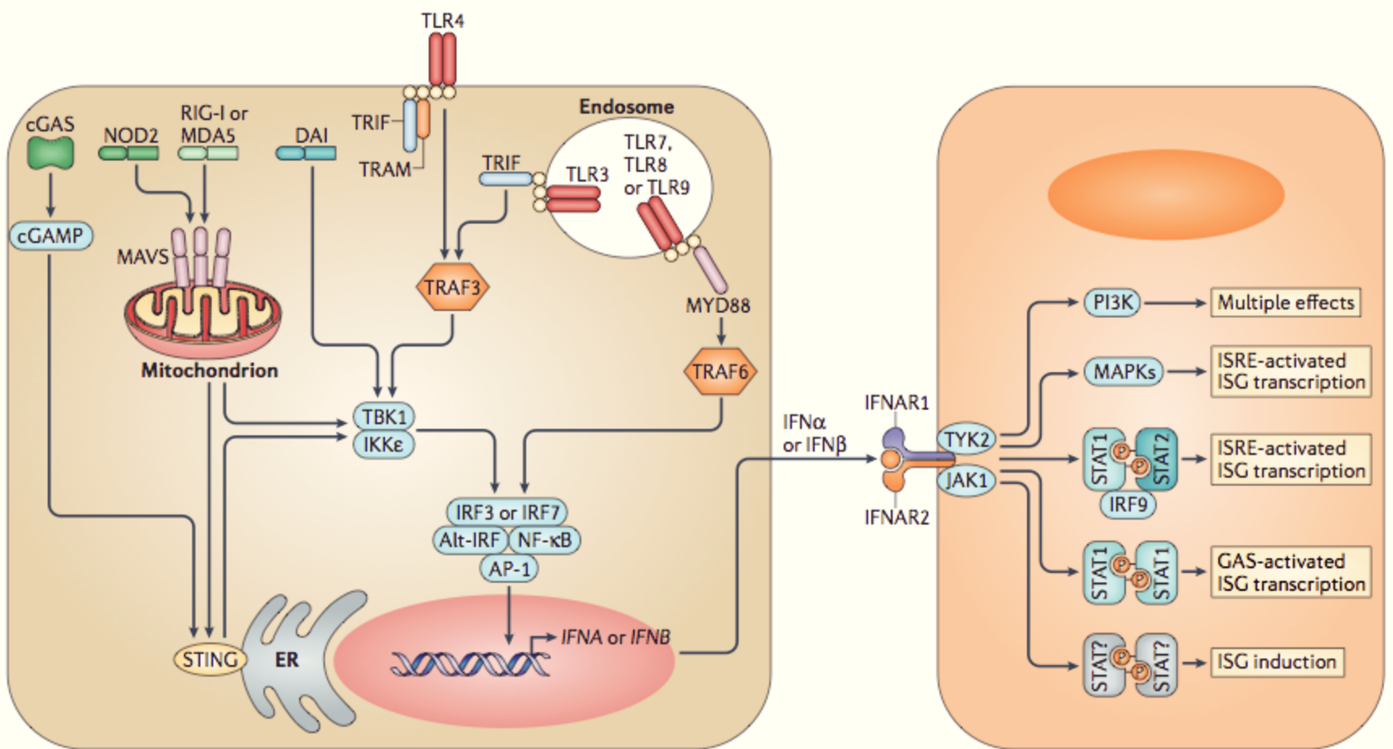


Figure 11 : Voie d'activation et de transduction du signal interféron de type I (87).

## 2. Barrière d'espèce et modèles animaux

La rougeole est un virus restreint à l'homme et aux PNH. L'infection expérimentale des PNH par le VR reproduit l'infection humaine au plus près (96) : réplication systémique, immunosuppression post-infectieuse et signes cliniques typiques. Néanmoins, les modèles PNH (*cynomolgus* et *rhesus* macaques principalement) (97) sont coûteux et d'utilisation raisonnablement restreinte. Les rongeurs, hormis le *Cotton rat*, sont naturellement résistants à l'infection par le VR. Chez ce dernier, le VR se réplique dans le tractus respiratoire et les ganglions lymphatiques après instillation nasale, sans dissémination systémique (98, 99), et ne reproduit donc pas l'infection humaine. Depuis l'identification des récepteurs CD46 en 1993 (28) pour les souches vaccinales et CD150 en 2000 (16) pour les souches sauvages et vaccinales, des modèles murins transgéniques pour ces récepteurs ont été générés (100-102). En effet, les protéines CD150 et CD46 murines ne présentent pas d'identité fonctionnelle avec les protéines humaines, et ne lient pas le VR (103). Cependant, bien que montrant la facilitation de l'infection par le VR sur les cellules



de rongeurs, ces modèles transgéniques ne permettaient pas de diffusion systémique du virus. Les modèles d'étude de la rougeole étaient limités aux souriceaux et à l'injection intracrânienne chez les adultes pour induire une infection sévère (104). Pour reproduire au plus près l'infection humaine, ces souris ont donc été rendues défectives pour la voie IFN-I (105, 106).

L'efficacité des virus recombinants de la plateforme vaccinale rougeole de notre laboratoire est testée sur modèle murin IFNARhCD46, KO pour le récepteur IFN-I (IFNAR) et exprimant le récepteur humain CD46 (hCD46), avec un fond génétique 129-sv exprimant le complexe moléculaire d'histocompatibilité H-2d<sup>b</sup>, H-2k<sup>b</sup> et I-A<sup>b</sup> (68). Ces souris imposent des contraintes de production pour maintenir le transgène hCD46 à l'état hétérozygote et éviter l'état homozygote du gène qui induit chez les souris obésité, comportement agressif et stérilité chez les mâles. Ce modèle permet d'étudier la réponse humorale et cellulaire. En effet, l'induction d'anticorps neutralisants et la présence d'une réponse cellulaire ont été démontrées à maintes reprises contre la rougeole et l'antigène exogène, comme vu précédemment. Les travaux de Marty *et al.* ont suggéré qu'un modèle transgénique hCD46 avec une voie IFN-I conservée permettait de mieux caractériser le profil de réponse immunologique de la rougeole et des virus recombinants (107). Cependant, les réponses cellulaires observées dans ce modèle restent très faibles.

Ainsi, le tropisme cellulaire et la voie IFN semblent être les deux versants de la barrière d'espèce du VR. La notion de barrière d'espèce est un concept large, multifactoriel, prenant en compte les barrières moléculaires, métaboliques et immunologiques (108). Pourtant, la restriction d'hôte des virus est connue pour reposer essentiellement sur les composants de l'immunité innée *in vivo* (109). De plus, Iwasaki *et al.* ont montré que l'expression de la protéine C du virus Sendai murin permettait de lever la restriction de croissance du VR sur cellules de souris exprimant le récepteur CD150 mais non permissives à la réplication virale (110). La protéine C étant un facteur de virulence jouant un rôle dans l'échappement immunitaire, cette étude suggère que la barrière d'espèce repose principalement sur la voie IFN-I.

### 3. Induction d'IFN par le vaccin rougeole

Comme nous l'avons décrit au premier chapitre, le VacR induit des réponses T et B protectrices sans causer ni maladie ni immunosuppression post-infectieuse significative comme le VR. Les mécanismes moléculaires de l'atténuation virale sont encore mal définis, et de nombreuses hypothèses ont été formulées. Une des hypothèses majeures proposée repose sur une différence d'induction des IFN-I (111), bien qu'une atténuation d'un VR sauvage ait pu être obtenue sans modifier l'induction d'IFN-I (112). A ce jour, les résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* ne sont pas toujours concordants. Nous allons esquisser un tableau des données actuellement connues.

#### a) *Reconnaissance par les récepteurs de l'immunité innée*

Les réponses immunes innées sont activées par les PRRs reconnaissant des PAMPs. La détection des virus à ARN fait intervenir plusieurs familles de senseurs de l'immunité innée : récepteurs RIG-I-like (RLRs), récepteurs Toll-like (TLRs) et récepteurs Nod-like (NLRs) (Figure 12).

Par l'intermédiaire de ces senseurs, les cellules hôtes reconnaissent tout particulièrement les protéines H, N et l'ARN viral du VR (113). Du fait du cycle intracytosolique du VR, les récepteurs cytosoliques RLRs sont particulièrement impliqués dans la reconnaissance de l'ARN viral du VR. De plus, les RLRs sont exprimés de façon ubiquitaire et pas uniquement par les cellules de l'immunité innée. Ils représentent donc de vraies sentinelles à l'infection virale. A l'état basal, ces récepteurs sont exprimés à bas niveau mais une boucle de rétrocontrôle induit leur surexpression après activation (114). Ils comprennent trois récepteurs : Retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I), Melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) et Laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2). Ce sont des hélicases possédant 3 grands domaines : un domaine central DExD/H Box hélicase, un domaine N-terminal d'activation CARD (pour « *caspase activation and recruitment domain* ») et un domaine C-terminal encodant un domaine répresseur (Figure 13). RIG-I, MDA5 et LGP2 ont été décrits comme liant les acides nucléiques du VR (115-117). La reconnaissance par les RLRs induit la voie d'activation de la protéine MAVS de signalisation antivirale mitochondriale, pour aboutir à la transduction du facteur de régulation de l'IFN 3 (IRF3). Contrairement à RIG-I et MDA5, LGP2 ne possède pas

de domaine CARD d'activation de MAVS. Il agirait plutôt comme un régulateur négatif des réponses RIG-I (118, 119) et un régulateur positif des réponses MDA5 (120).

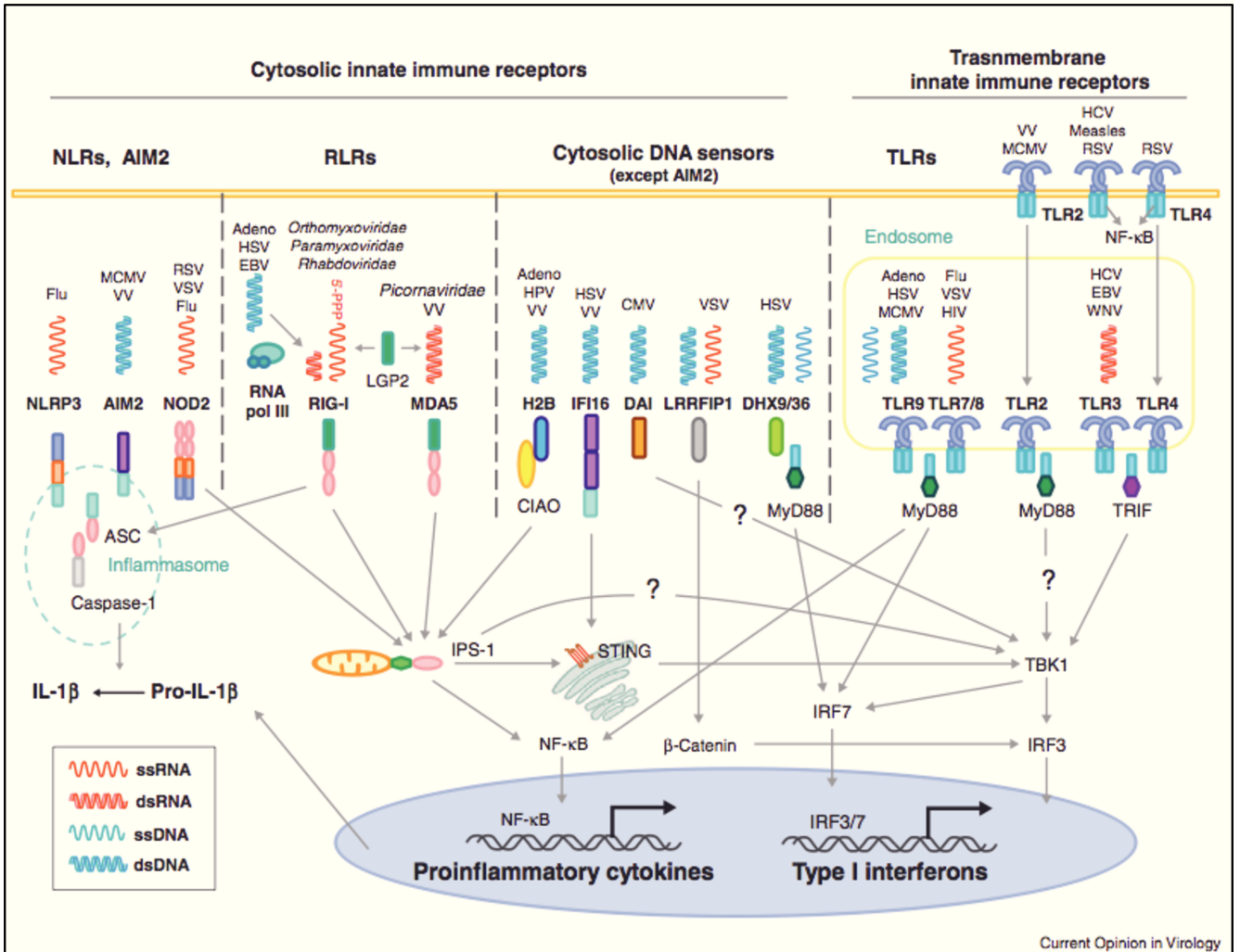


Figure 12 : Récepteurs de l'immunité innée impliqués dans la reconnaissance des virus (121).

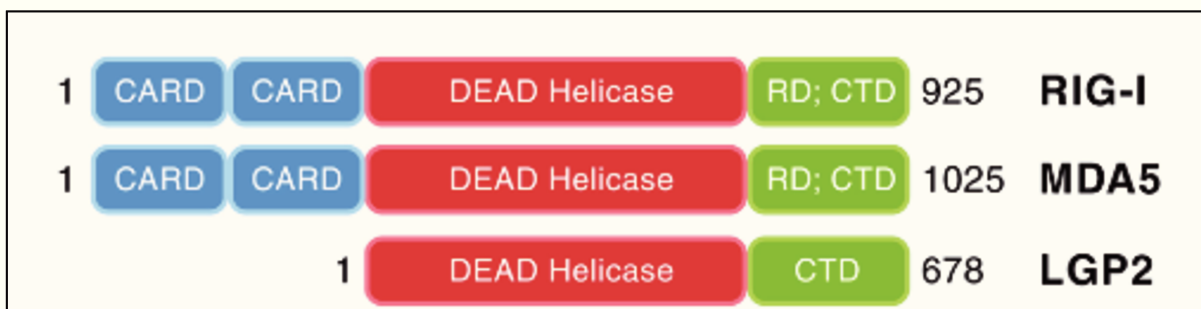


Figure 13 : Représentation schématique des récepteurs RLRs (122).

Les TLRs sont des récepteurs membranaires présents à la surface des cellules du système immunitaire (DCs, lymphocytes) et des cellules épithéliales, ou à l'intérieur de leurs endosomes. C'est dans ce dernier compartiment que l'ARN viral du VR est détecté par les récepteurs TLR7 et TLR9 (123). La reconnaissance par les TLRs induit également la synthèse d'IFN mais par une voie différente : activation de MyD88 pour aboutir à la transduction d'IRF7. Les deux voies d'activation, déclenchées par la reconnaissance des acides nucléiques viraux par les RLRs ou les TLRs, vont également induire la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et l'induction de cytokines pro-inflammatoires. La protéine H quant à elle induit une activation immune *via* sa reconnaissance par le récepteur de surface TLR2 (124). L'interaction H-TLR2 induit l'augmentation de l'expression de la protéine SLAM et favoriserait ainsi la susceptibilité des cellules immunitaires au VR. Ce facteur pourrait jouer un rôle majeur dans l'immunopathologie du VR. Enfin, la protéine N interagit directement avec IRF3 pour activer la synthèse d'IFN $\beta$  (125).

La reconnaissance du VR par les récepteurs de l'immunité innée aboutit ainsi à des cascades de signalisation ayant pour finalité d'activer les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et IRF3/7 et induire tout particulièrement la synthèse d'IFN-I. Pour contourner ce système de réponse immunitaire innée très efficace, le VR a développé diverses stratégies d'échappement.

#### *b) Les voies de contournement par le VR*

Le VR est ainsi capable d'interférer à la fois avec la synthèse d'IFN et avec la voie d'activation induite par la fixation de l'IFN sur le récepteur IFNAR (Figure 14). Les protéines impliquées dans les diverses stratégies déployées sont les protéines V, P et C.

La protéine V joue un rôle majeur en interagissant et inhibant directement l'activation de différentes protéines : MDA5 (126, 127), IRF3 (128), la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B (129), Jak-1, STAT1 (130, 131). Elle inhibe également l'induction d'IFN par l'inflammasome NLRP3 (76).

La protéine P se lie elle aussi à la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B et inhibe la phosphorylation de STAT1, via le domaine N-terminal commun aux deux protéines (132, 133).

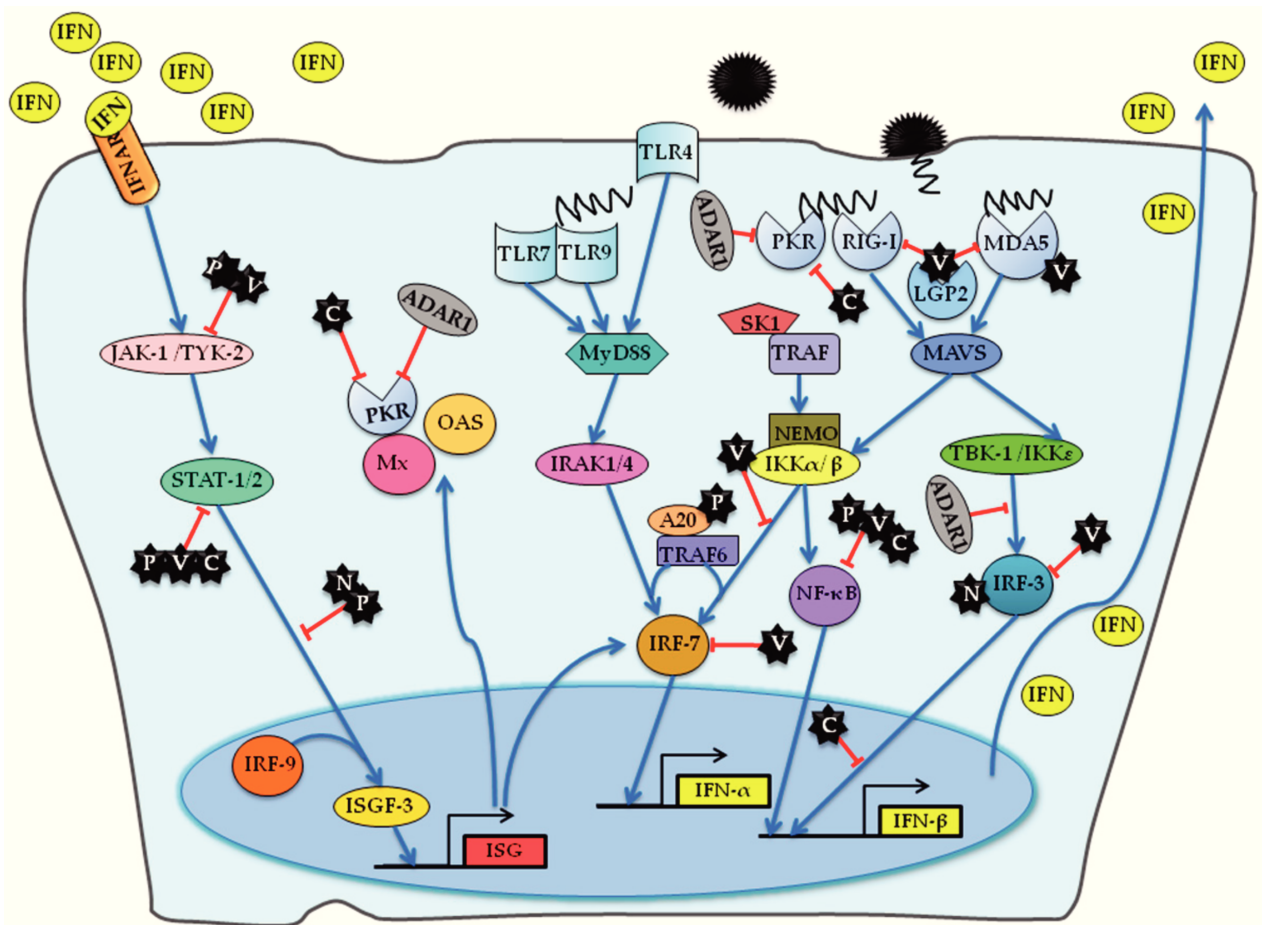


Figure 14 : Schématisation des sites d'interaction des protéines du VR avec la voie d'activation IFN-I permettant de bloquer l'induction des réponses antivirales innées (Jiang, Viruses, 2016).

La protéine C, quant à elle, prévient la dimérisation et la phosphorylation de STAT1 (134). De plus, elle interagirait directement avec le promoteur de l'IFN $\beta$  pour inhiber son activation. En effet, la protéine C exprime un signal de localisation nucléaire lui permettant de faire la navette entre le cytoplasme et le noyau, et lui permettant d'interagir à différents niveaux de la voie biologique d'activation. L'étude de Sparrer *et al.* suggère que les souches VacR seraient incapables de se localiser dans le noyau (135), contribuant en partie à l'atténuation virale des souches vaccinales. Cependant, la souche vaccinale Schwarz étudiée au sein de notre laboratoire possède une protéine C se localisant efficacement dans le noyau (données non publiées).

Ainsi, des différences d'induction d'IFN-I par les souches sauvages et vaccinales pourraient supporter la base de l'atténuation virale.

### c) Vaccin *versus* virus sauvage

De multiples études *in vitro* ont comparé l'induction d'IFN-I par les souches de VR ou de VacR (136, 137), en montrant pour les souches vaccinales une induction plus forte d'IFN-I. Cependant, l'interprétation de la plupart de ces études a été rendue compliquée par la présence de particules virales contenant des génomes défectifs interférents (DI-RNA) dans le stock viral utilisé (137-139). Nous allons présenter dans ce sous-chapitre uniquement les résultats d'études obtenues à partir de stocks viraux sans DI-RNA et présenterons dans le chapitre suivant plus en détail les DI-RNAs.

*In vivo* chez l'homme, une étude d'expression génique sur PBMC obtenus à partir d'enfants hospitalisés pour une rougeole tendait à montrer une régulation positive d'ISGs (140). Une étude bien plus ancienne (141) démontrait par un essai radioimmunologique l'induction d'IFN $\alpha$  dans le plasma de patients infectés. A l'inverse, Yu *et al.* (142), plus récemment, soulignaient la suppression de la réponse IFN-I sur PBMC extraits de patients infectés. Néanmoins, l'induction d'IFN-I par le VR est difficile à montrer puisque l'infection n'est cliniquement reconnue qu'au moment où la réponse adaptative est initiée avec clairance virale, soit environ deux semaines après le début de l'infection. En effet, l'infection de PBMC humains *ex vivo* induit une régulation positive de la voie IFN, plus particulièrement d'IRF7, à des temps précoces (48h post-infection) (143). Ainsi, il est difficile d'étudier *in vivo* chez l'homme les réponses IFN-I induites après infection par le VR. Concernant les réponses au VacR, une étude de 1965 soulignait la présence d'IFN-I circulant chez les sujets vaccinés (144), mais cette étude ancienne ne tenait pas compte de la présence ou non de DI-RNA dans le stock viral. La difficulté aujourd'hui réside dans le sujet d'étude, puisque ce sont les nourrissons de 9 mois à 1 an qui sont vaccinés. Une étude clinique à cet âge est relativement difficile à mettre en place, en particulier du fait des volumes sanguins limités qui pourraient être prélevés.

*In vivo* chez le macaque, l'IFN-I ne semble pas induit par le VR (145, 146). La première étude (145) a analysé plusieurs tissus de macaques infectés par différentes souches de virus sauvages ou atténués 7 à 11 jours post-infection. Si quelques différences ont pu être observées en RT-qPCR, aucune production d'IFN biologiquement active n'a pu être détectée. La deuxième étude (146) a pu montrer

l'induction d'IFN $\alpha$  chez quelques macaques à 7 jours post-infection par un virus sauvage exprimant la protéine H de la souche vaccinale Edmonston.

*Ex vivo*, de nombreuses études se sont intéressées à l'interrelation entre interféron et souches VR ou VacR. Cependant, la plupart d'entre elles se basait sur une seule souche de VR ou VacR, et la présence de DI-RNAs n'était pas systématiquement recherchée. Enfin, en 2011, une étude complète (138) a permis de comparer l'induction d'IFN en culture cellulaire par plus de 20 souches sauvages et vaccinales, tout en prenant en compte la présence de DI-RNAs pour l'interprétation des données. Les résultats montrent que les souches vaccinales induisent effectivement de l'IFN, même en l'absence de DI-RNAs. Inversement, les souches sauvages n'activent l'IFN qu'en présence de DI-RNAs. Ainsi, le VR contourne efficacement la voie d'activation IFN-I grâce à plusieurs mécanismes d'échappement. Cependant, la protéine H des souches vaccinales et surtout la présence de DI-RNAs dans les stocks viraux semblent jouer des rôles majeurs pour permettre à l'hôte de dépasser les capacités d'échappement du virus.

## D. Les génomes défectifs interférents

Longtemps considérés comme des artefacts de culture cellulaire, les génomes défectifs relancent l'intérêt de la communauté scientifique ces dernières années avec leur mise en évidence au cours d'infections chez l'homme. Tout particulièrement, la génération de génomes défectifs au cours du pic de réplication viral apparaît comme critique pour l'initiation d'une réponse immunitaire adaptée et la résolution de l'infection (147, 148).

### 1. Définition

Les DI-RNAs (*Defective Interfering RNAs*) sont des formes tronquées du génome viral produits par de nombreux virus au cours de la réplication. Ils comportent les éléments minimum essentiels à la réplication : un site d'initiation compétent en 3', la séquence complémentaire en 5' et une structure et/ou séquence requise pour l'encapsidation au sein de la nucléocapside virale (149-151). Cependant, les DI-RNAs ne sont pas capables de se répliquer de façon autonome, et ont besoin de la présence d'un génome viral complet pour apporter les éléments manquants nécessaires à la réplication. Ils comportent les signaux d'encapsidation nécessaires leur permettant d'être présents dans les particules virales pour se transmettre d'une cellule à une autre, ou d'un hôte à l'autre (152). Ainsi, ils font partie intégrante de la population virale qui se propage *in vitro* et *in vivo*.

#### a) *Différents types de DI-RNAs*

Il existe 4 grands types de DI-RNAs identifiés historiquement à partir du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) (Figure 15). Le premier type de DI-RNA présente une ou plusieurs délétions plus ou moins importantes du génome tout en conservant les extrémités 3' et 5' du génome dont ils sont issus (Figure 14, « *simple deletion* »). Ces DI-RNAs sont fréquemment isolés au cours d'infections cellulaires par les virus influenza ou le virus de la rage. Le second type correspond aux « *copy-back* » DI-RNAs (Figure 14, « *panhandle* »), classiquement retrouvés dans les stocks de *Mononegavirales*, plus particulièrement du VR, du virus Sendai (SeV) ou de VSV. Ces DI-RNAs ont une forme de tige-boucle dont l'extrémité est complémentaire. Si la production d'un 3' *copy-back* de virus rabique a été possible artificiellement (153), seuls des 5' *copy-back* DI-RNAs ont été isolés en contexte infectieux à ce jour. En



effet, il existe chez les *Mononegavirales* une différence d'efficacité entre promoteur génomique et antigénomique, nécessaire à la balance entre transcription et réplication. Il semblerait que la présence de deux versions du promoteur antigénomique offre un avantage répliatif aux 5' copy back DI-RNA (153). Le troisième type de DI-RNA est très proche du deuxième mais présente une structure uniquement en épingle double brin, sans boucle simple brin (Figure 14, « *snap back* »). Ces « *snap-back* » DI-RNAs ont été identifiés dans les stocks de virus VSV. Enfin, le quatrième type, très peu décrit et étudié, correspond aux DI-RNAs dits « mosaïques » (Figure 14, « *compound* »), où différents segments du génome sont associés avec des sens inversés. Ces DI-RNAs, plus difficiles à explorer et à confirmer sont peu connus et peu décrits.

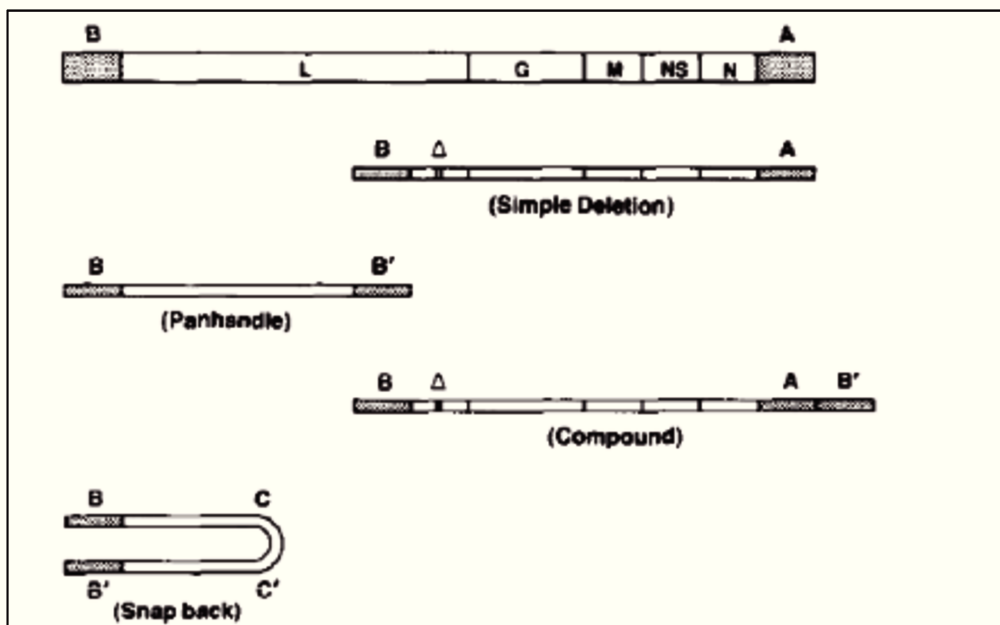


Figure 15 : identification de 4 types de DI-RNAs à partir de l'ADN génomique du virus de la stomatite vésiculaire (149).

### b) Notion d'interférence

Isolés pour la première fois à partir de cultures de virus grippal par Von Magnus dans les années 1940s (154), les DI-RNAs ont par la suite été identifiés pour de nombreux virus passés en culture cellulaire à forte multiplicité d'infection (155). Ils portent le nom de génomes défectifs interférents de par leur capacité, *in vitro*, à

rentrer en compétition avec la réplication du virus lui-même, et à stimuler l'expression d'IFN-I (156-158). Les études réalisées dans les années 70/80s s'intéressaient essentiellement au VSV (159, 160) et au SeV (161, 162), avant de s'étendre à d'autres virus dont le VR. La multiplicité d'infection (MOI pour « *multiplicity of infection* ») du virus est un élément crucial observé *in vitro* pour la génération de DI-RNAs et l'induction d'interférence. Ainsi, de faibles MOI de virus influenza induisent des titres élevés de virus infectieux, alors que de fortes MOI produisent des taux élevés de DI-RNAs, jusqu'à même éteindre l'infection (163, 164). Le même phénomène a été observé avec le SeV (162) et le VR (165). Des facteurs cellulaires semblent entrer en jeu puisque l'infection de certaines lignées cellulaires n'induit pas la production de DI-RNAs, même après 200 passages cellulaires à forte MOI : c'est le cas de sous-lignées de cellules HeLa pour le virus Semliki forest (166) ou de cellules pulmonaires embryonnaires de poulet pour le SeV (167). Enfin, pour les virus à ARN de polarité positive, des mutations de la polymérase sont capables d'augmenter la génération de DI-RNAs *in vitro* (168).

Le phénomène d'interférence peut s'expliquer par : (i) une réplication favorisée des DI-RNAs par rapport au génome parental du fait de leur petite taille et de la présence de deux promoteurs antigénomiques pour les 5' *copy-back* et 5' *snap-back* DI-RNAs (153) ; (ii) un effet de compétition au moment de l'encapsidation et de l'empaquetage au sein des particules virales (169) ; (iii) la reconnaissance par les récepteurs de l'immunité innée qui induit la synthèse d'interféron à l'origine d'un état antiviral de la cellule infectée et des cellules avoisinantes (164).

### c) *Pertinence clinique*

Les DI-RNAs ont été considérés comme des artefacts de réplication virale en culture cellulaire pendant de nombreuses années. Cependant, l'évolution des technologies a permis plus récemment l'identification de DI-RNAs *in vivo* au cours de différentes infections chez l'homme : grippe (170), dengue (171), hépatite C (172), ou infection par le VRS (173). De plus, il semblerait que les stocks de virus de la dengue porteurs de DI-RNAs aient un potentiel plus élevé de transmission que les stocks n'en comportant pas (152), avec la capacité de transmettre les DI-RNAs de personne à personne. De façon fort intéressante, au cours de l'infection humaine par le VRS, la présence de DI-RNAs a pu être corrélée avec la qualité de la réponse antivirale.

En effet, une accumulation précoce de DI-RNAs était de bon pronostic pour la clairance virale et la guérison, et l'apparition de ces derniers corrélait avec le pic de réplication virale (147). Des observations similaires ont été réalisées au cours d'infection grippale, la présence des DI-RNAs étant corrélée avec une moindre gravité de l'infection (148). Ces résultats relancent fortement l'intérêt de la communauté scientifique quant au rôle fonctionnel biologique des DI-RNAs.

## 2. Paramyxovirus et 5' copy-back DI-RNAs

Les Paramyxovirus, auxquels appartiennent le SeV et le VR, produisent des 5' copy-back DI-RNAs, dont la structure en font d'excellents PAMPs : un ARN en forme de boucle avec une tige double brin et une extrémité 5' triphosphate. Différents 5' copy-back DI-RNAs de SeV ont été identifiés dans des stocks viraux, et tout particulièrement le stock SeV Cantell de Charles Rivers Laboratory qui a été largement étudié pour ses capacités immunostimulatrices. Ce stock comporte un DI-RNAs de 546 nucléotides avec une extrémité complémentaire de 93 nucléotides (157).

Les mécanismes de formation de ces ARN ne sont pas réellement connus. L'hypothèse en cours suggère que la polymérase virale, pour une raison inconnue à ce jour, se détache du brin matrice pour se rattacher au brin naissant et copier l'extrémité 5' complémentaire (Figure 16). Les séquences respectent la « règle de six » nécessaire à l'encapsidation virale des *Paramyxoviridae* (67). Il est donc impossible de savoir si la génération de DI-RNAs respecte naturellement cette règle de 6, ou si seuls les DI-RNAs respectant cette règle peuvent être efficacement encapsidés et donc transmis, amplifiés et détectés.

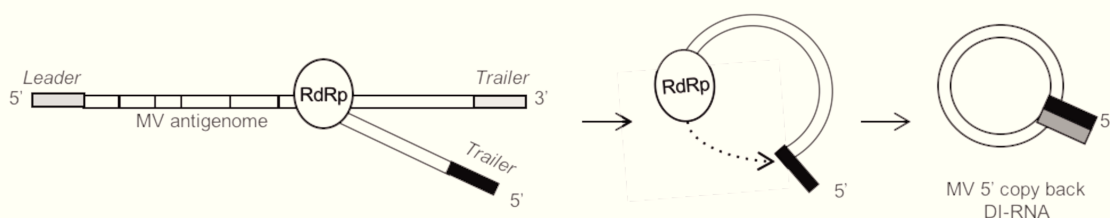


Figure 16 : hypothèse de génération des 5'copy-back DI-RNAs (RdRp : RNA dependant RNA polymerase complex).

#### a) *DI-RNAs produits par les virus rougeole*

Plusieurs études ont montré la présence de 5' *copy-back* DI-RNAs dans les stocks viraux de VR ou de VacR (138, 165). Concernant les virus rougeole recombinants, des 5' *copy-back* DI-RNAs ont été identifiés et caractérisés au cours de l'infection par des VR et VacR n'exprimant pas la protéine C (rMV- $\Delta$ C) (40, 174). Dans ce modèle, la génération des DI-RNAs a été démontrée comme un phénomène précoce après le « *rescue* » viral, définissant l'ensemble de DI-RNAs du stock viral considéré. Plusieurs DI-RNAs étaient alors fréquemment retrouvés dans un même stock viral de rMV- $\Delta$ C. Au sein de notre laboratoire, la présence de DI-RNAs a pu être détectée au cours de l'infection par un virus exprimant une copie supplémentaire de la nucléoprotéine (rMV-N) (74) : une population unique de 5' *copy-back* DI-RNAs d'une longueur de 1212 nucléotides avec une extrémité complémentaire double brin de 98 nucléotides. Egalement, l'analyse de données de séquençage de nouvelle génération (NGS) d'ARNs isolés sur le récepteur RIG-I de cellules infectées par un virus n'exprimant pas la protéine V du VacR (rMV- $\Delta$ V) (115) a mis en évidence la présence d'un 5' *copy-back* DI-RNA dans le stock viral se liant spécifiquement au récepteur RIG-I. De façon surprenante, la séquence de ce DI-RNA inclut l'insertion d'un nucléotide A supplémentaire entre les séquences en amont du site de détachement de la polymérase et en aval du site de réinitiation, ce qui lui permet de respecter la règle de six.

Aucun DI-RNA n'a été documenté à ce jour au cours de l'infection naturelle par le VR, ni au cours de la vaccination par le VacR (138). Néanmoins, leur identification au sein de stocks vaccinaux questionne sur leur rôle fonctionnel, et plus particulièrement leur activité immunostimulatrice.

#### b) *Rôle immunostimulateur*

L'activité immunostimulatrice semble reposer à la fois sur l'extrémité 5' triphosphate (147, 175, 176), sur la tige d'ARN double brin, et sur des structures secondaires de la molécule d'ARN de la boucle (158, 177). La synthèse d'ARN étant couplée à l'encapsidation par la nucléoprotéine, les DI-RNAs ne devraient pas, en théorie, se retrouver « nus » dans les cellules et former des structures secondaires. Néanmoins, de l'ARN double brin a pu être détecté dans des cellules infectées par le VacR déficient en protéine C au sein des sites de réplication virale (174). A ce jour,

les 5' *copy-back* DI-RNAs du VR sont décrits comme PAMPs reconnus par les récepteurs cytosoliques RIG-I like (RLRs) de l'immunité innée : RIG-I (115, 178) et MDA5 (116). Aucune donnée n'est par contre disponible sur l'interaction des DI-RNAs avec LGP2, le troisième RLR. De plus, les DI-RNAs du VR lient également la protéine PACT (*IFN-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase activator A*), qui accroît la réponse IFN dépendante de RIG-I (175), et PKR (*double-stranded RNA-dependent protein kinase*), qui génère une réponse cellulaire de stress avec arrêt de la traduction et formation de granules de stress (40) La reconnaissance par les RLR induit la sécrétion d'IFN-I *via* la voie IRF3 mais stimule également l'expression d'un large panel de cytokines capables de stimuler l'activation de la réponse adaptative. Deux études portant sur les *copy-back* DI-RNAs de SeV ont montré l'implication de ces génomes défectifs dans la maturation, l'activation des cellules dendritiques et dans leur capacité à stimuler des cellules T en système de coculture (158, 179). Des résultats sensiblement identiques ont été obtenus sur l'activation et la maturation de cellules dendritiques myéloïdes infectés avec un VacR (Edmonston-Zaghreb) (139). Ainsi, la capacité des DI-RNAs à activer la réponse immunitaire est largement démontrée.

Pour résumer le rôle des DI-RNAs dans le développement d'une réponse antivirale IFN-I efficace lors de l'infection par les paramyxovirus, Carolina B. Lopez a proposé le modèle suivant pour le SeV (Figure 17) (151) : (A) en l'absence de DI-RNAs, le virus est reconnu par RIG-I/MDA5 mais la présence des protéines antagonistes V/P/C permet un échappement de la réponse IFN-I ; (B) en présence de DI-RNAs, le niveau de signaux de danger dépasse les capacités d'échappement par les protéines antagonistes et la réponse IFN-I n'est plus réprimée.

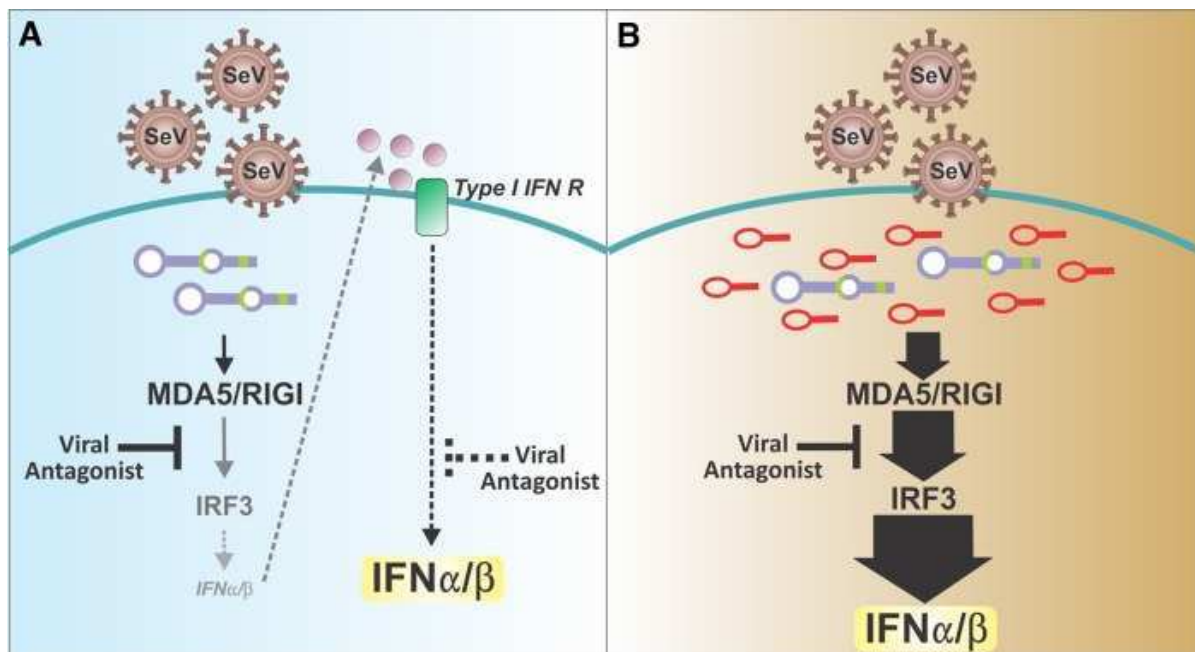


Figure 17 : Modèle de balance entre reconnaissance et échappement viral : rôle des DI-RNAs (151).

### 3. Intérêt thérapeutique et prophylactique

De par leur capacité d'interférence avec la réplication du virus dont ils sont issus, les DI-RNAs présentent un potentiel antiviral assez largement étudié sur les virus VSV, Semliki forest et influenza (150). *In vitro*, des passages cellulaires à forte MOI contribuent à générer des DI-RNAs qui vont petit à petit éteindre l'infectiosité virale. *In vivo*, sur modèle murin, l'injection intracérébrale de particules de DI-RNAs de VSV purifiées et de faibles doses de particules virales infectieuses protège les souris des formes létales (180). Cette protection est dépendante de la dose de virus infectieux, de la quantité de particules défectives associées (181) et du délai entre les deux injections. Dans ce modèle, l'injection des particules défectives est protectrice jusqu'à 10 jours avant l'épreuve infectieuse. Dans les études portant sur le virus Semliki forest, l'inoculation intranasale de virus produit par passages cellulaires à forte MOI et comportant donc de nombreux DI-RNAs est également protectrice sur modèle murin (182). Dans les études portant sur le virus influenza A, l'inoculation intranasale d'un stock viral contenant des DI-RNAs évite l'évolution vers une pneumonie (183), et injecté directement dans le cerveau protège de l'encéphalite (184). Un DI-RNA de virus influenza A appelé DI-244 protège les souris contre une dose létale du virus sauvage lorsqu'il est inoculé par voie nasale le jour de l'infection

jusqu'à 2 jours après. Au-delà, il n'est plus possible d'induire une activité protectrice (150). De plus, ce DI-RNA est capable d'induire une protection non spécifique contre des virus à tropisme respiratoire responsable de pneumonies sévères chez la souris. Cependant, il doit être administré un jour avant l'infection pour obtenir une efficacité optimale. Il semblerait que la protection homologue et hétérologue ne suivent pas les mêmes mécanismes d'interférence : la protection homologue fait intervenir une compétition de réplication entre génome complet et génome défectif, alors que la protection hétérologue est portée uniquement par la stimulation de la voie IFN-I.

L'interférence de la réplication virale par compétition induit une protection forcément limitée dans la durée. Par contre, la stimulation de la voie interféron, en plus d'induire une protection virale à large spectre de courte durée pourrait aisément être mise à profit pour induire une réponse immunogène contre un candidat vaccinal. Ainsi, un ARN synthétisé *in vitro* dérivé d'un DI-RNA de SeV a prouvé son efficacité sur modèle murin comme adjuvant d'un vaccin influenza A/Puerto Rico/8/34, de façon identique à l'utilisation d'autres molécules adjuvantes comme le polyIC (185). De façon similaire, M8 est une molécule d'ARN développée à partir de la structure d'un DI-RNA de VSV qui a montré des capacités à protéger des souris d'un challenge létal par un virus influenza H1N1, et à être utilisé comme adjuvant dans une composition vaccinale de VLP de virus influenza exprimant l'hémagglutinine et la neuraminidase (186). Ainsi, les molécules d'ARN issues des DI-RNAs mais synthétisée *in vitro* portent une activité immunostimulatrice sensiblement identique aux ARN immunostimulateurs classiques (polyIC). Leur utilisation comme adjuvant vaccinal isolé impose donc les mêmes contraintes de production et de conservation. La possibilité d'utiliser des particules virales contenant des DI-RNAs pour obtenir le même effet est difficile à envisager pour deux raisons majeures : les difficultés de séparation des particules contenant un génome complet et défectif pour la plupart des virus, dont les *Paramyxoviridae*, et la possibilité qu'une même particule contienne un ou plusieurs génomes complets et défectifs.

#### 4. Questions ouvertes

Il existe encore un grand nombre de questions sans réponse concernant la génération des DI-RNAs et leur activité immunostimulatrice.

Tout d'abord, le mécanisme moléculaire de leur formation est toujours inconnu. Aucun argument ne permet aujourd'hui de basculer en faveur de l'une des trois hypothèses majeures : (i) une polymérase virale autorisant des erreurs nécessaires à la génération d'une « quasi-espèce » virale, (ii) l'interaction de facteurs cellulaires déstabilisant le complexe de réplication, ou enfin (iii) une stratégie de survie favorisant la détection par l'hôte cellulaire au pic de réplication viral. Cette troisième hypothèse souligne également l'absence de réponse actuelle à la question du rôle biologique des DI-RNAs dans la pathogenèse virale. De plus, les motifs secondaires de l'ARN reconnus par les récepteurs restent peu compris.

Ensuite, le rôle antiviral des DI-RNAs est aujourd'hui irréfutable, mais il reste à déterminer dans quelle mesure (délai et efficacité) ce rôle antiviral (à visée thérapeutique) ou prophylactique est spécifique d'un virus, ou plus largement exploitable sur différents pathogènes.

Enfin, si les vaccins vivants atténués produisent des DI-RNAs, il est essentiel de pouvoir les caractériser pour mieux comprendre leur importance et leur impact sur l'efficacité vaccinale, et le cas échéant homogénéiser les lots vaccinaux. Dans le cadre du développement de la plateforme vaccinale rougeole, il semble ainsi évident et nécessaire d'effectuer un travail de recherche et de caractérisation des DI-RNAs produits par la réplication des virus modifiés, objet de la première partie de mon travail expérimental de thèse (pp. 72-74).



## E. Modèle d'application vaccinale : le paludisme

L'efficacité chez l'homme du candidat vaccinal antipaludique le plus avancé RTS,S/AS01 n'est que relative avec une protection partielle et de courte durée, justifiant le développement de candidats vaccinaux de deuxième génération. Du fait des contraintes de production des approches utilisant l'organisme entier atténué, la voie des vaccins sous-unitaires reste toujours à exploiter. Les vecteurs viraux sont à ce titre particulièrement intéressants par leur capacité à stimuler efficacement les réponses cellulaires. La plateforme vaccinale rougeole offre un vecteur vaccinal sûr et efficace, pouvant être facilement produit et implémenté sur le terrain.

Après avoir brièvement présenté l'agent causal du paludisme et dressé le portrait épidémiologique du paludisme dans le monde et au sein des Forces armées françaises, nous présenterons la biologie du paludisme et la réponse immune naturelle chez l'hôte. Nous détaillerons enfin les candidats vaccinaux les plus avancés et l'état des recherches dans ce domaine.

### 1. Agent causal du paludisme

L'hématozoaire responsable du paludisme a été découvert en Algérie en 1880 par Alphonse Laveran (187). *Plasmodium* spp. est un protozoaire unicellulaire de l'embranchement des *Apicomplexa*. Cet embranchement compte d'autres pathogènes intracellulaires humains tels que *Toxoplasma* ou *Cryptosporidium*. Il est caractérisé par la présence d'un organite intra-cellulaire « *chloroplast-like* » appelé apicoplaste, ainsi que d'un complexe apical polarisé où se situent des vésicules de sécrétion, rhoptries et micronème. La famille des *Plasmodii* est large, avec plus de 250 membres différents infectant différentes espèces eucaryotes (mammifères, reptiles, oiseaux). Cinq espèces plasmodiales peuvent infecter l'homme. (i) *Plasmodium falciparum* est habituellement considéré comme l'espèce la plus importante en terme de morbi-mortalité, et la plus étudiée. Cependant, (ii) *P. vivax* est aujourd'hui une cause majeure de morbidité dans le monde dont les formes graves semblent avoir été sous-estimées jusqu'à ce jour (188). (iii) *P. ovale* et (iv) *P. malariae* sont également responsables de cas humains, avec un impact plus modéré. *P. vivax* et *P. ovale* partagent la particularité de produire des formes hépatiques dormantes, les hypnozoïtes, responsables d'accès de reviviscence, plusieurs semaines ou mois après la primo-infection. Enfin, (v) *P. knowlesi* est un parasite simien qui a émergé chez l'homme de façon localisée en Asie du Sud-Est

(189). La restriction d'hôte des *Plasmodii* induit des difficultés quant aux modèles animaux d'étude du paludisme. Les modèles d'étude murins utilisent ainsi les parasites murins *P. yoelii*, *P. berghei* ou *P. chabaudi* ; et le modèle PNH chez le macaque avec *P. cynomolgi*.

## 2. Problématique de santé publique, dans le monde et pour les forces françaises

La morbidité et la mortalité liées au paludisme dans le monde ont considérablement baissé depuis 2000. Cependant, le rapport sur le paludisme dans le monde établi par l'OMS dénombrait encore 216 millions de cas en 2016 et près de 445 000 décès. La plupart de ces cas et des décès associés étaient estimés dans la région Afrique (90%), loin devant l'Asie du Sud-est (7%). Les enfants de moins de 5 ans en Afrique sub-saharienne sont les plus touchés mais le paludisme ne représente plus aujourd'hui leur cause majeure de mortalité. Entre les années 2000 et 2015, la morbidité a baissé de 37% et la mortalité de 60%, en accord avec la cible 6C des Objectifs du Millénaire pour le Développement (190) : « avoir maîtrisé le paludisme et commencé à inverser la tendance actuelle ». Ces progrès reflètent l'efficacité des interventions de santé publique : distributions de moustiquaires imprégnées d'insecticides, programmes de pulvérisation d'insecticide à effet rémanent à l'intérieur des habitations, accès à un diagnostic rapide, disponibilité des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine et thérapie préventive intermittente pendant la grossesse et chez les enfants dans les zones à transmission saisonnière.

Cependant, malgré ces succès, de nombreux défis persistent. Le paludisme se concentre dans les pays où le système de santé est défaillant et le revenu national faible. L'arrêt des programmes de lutte s'associe rapidement à une recrudescence des cas. L'efficacité de la lutte anti-vectorielle basée sur les insecticides est menacée par le développement de résistances des moustiques aux insecticides utilisés pour les moustiquaires imprégnées et la pulvérisation intradomiciliaire. La résistance aux antipaludiques est préoccupante, tout particulièrement l'observation en Asie du Sud-Est de résistance aux dérivés de l'artémisinine (191).

Le paludisme est également un problème toujours d'actualité pour les forces françaises. En effet, la projection en zone d'endémie se fait dans des contextes particuliers (guerre, désorganisation des systèmes de santé, clandestinité, déplacement de populations) qui exposent les militaires à des niveaux de transmission élevés. De 2000 à 2015, 6 468 cas de paludisme ont été déclarés à la surveillance épidémiologique des armées, dont 62,4% en zone d'endémie et 37,6% au retour en métropole (192). Les accès simples (fièvre, sueurs, frisson, douleurs diffuses, troubles digestifs) représentaient 94,4% des cas, contre 2,1% d'accès sévères (troubles de conscience, défaillance d'organes), dont 8 décès. Outre le risque individuel de morbi-mortalité, l'impact opérationnel est important en termes d'indisponibilité opérationnelle et de saturation des moyens d'évacuation sanitaires et des structures de santé (193). La figure 18 représente l'incidence du paludisme dans les armées. Les trois pics d'incidence observés correspondent au déclenchement de missions opérationnelles particulièrement à risque : 2003 opération Licorne en République de Côte d'Ivoire, 2008 opération Harpie de lutte contre l'orpaillage clandestin en Guyane, 2014 opération Sangaris en République Centre-Africaine.

La répartition des espèces plasmodiales dépend des zones d'endémie où les militaires sont projetés : *P. vivax* en Guyane et *P. falciparum* en Afrique. Ce dernier reste l'espèce la plus préoccupante du fait de sa gravité potentielle. Ceci, d'autant qu'un cas de résistance suspectée à la doxycycline, chimioprophylaxie utilisée par les forces, a pu être documenté chez un militaire décédé du paludisme en 2014 (194). Les investigations des principales épidémies ont mis en évidence les mêmes facteurs favorisants : une augmentation de l'exposition durant les activités opérationnelles nocturnes dans des zones de forte endémie et des défauts d'application des mesures prophylactiques à trois moments critiques (ouverture d'un théâtre d'opération, situations de crise en cours d'opération, retour en métropole).

Les difficultés d'application des moyens de lutte anti-vectorielle en opération et les résistances croissantes des parasites aux traitements/chimioprophylaxies et des anophèles vecteurs aux insecticides imposent de réévaluer et d'adapter en permanence les moyens de protection des militaires.

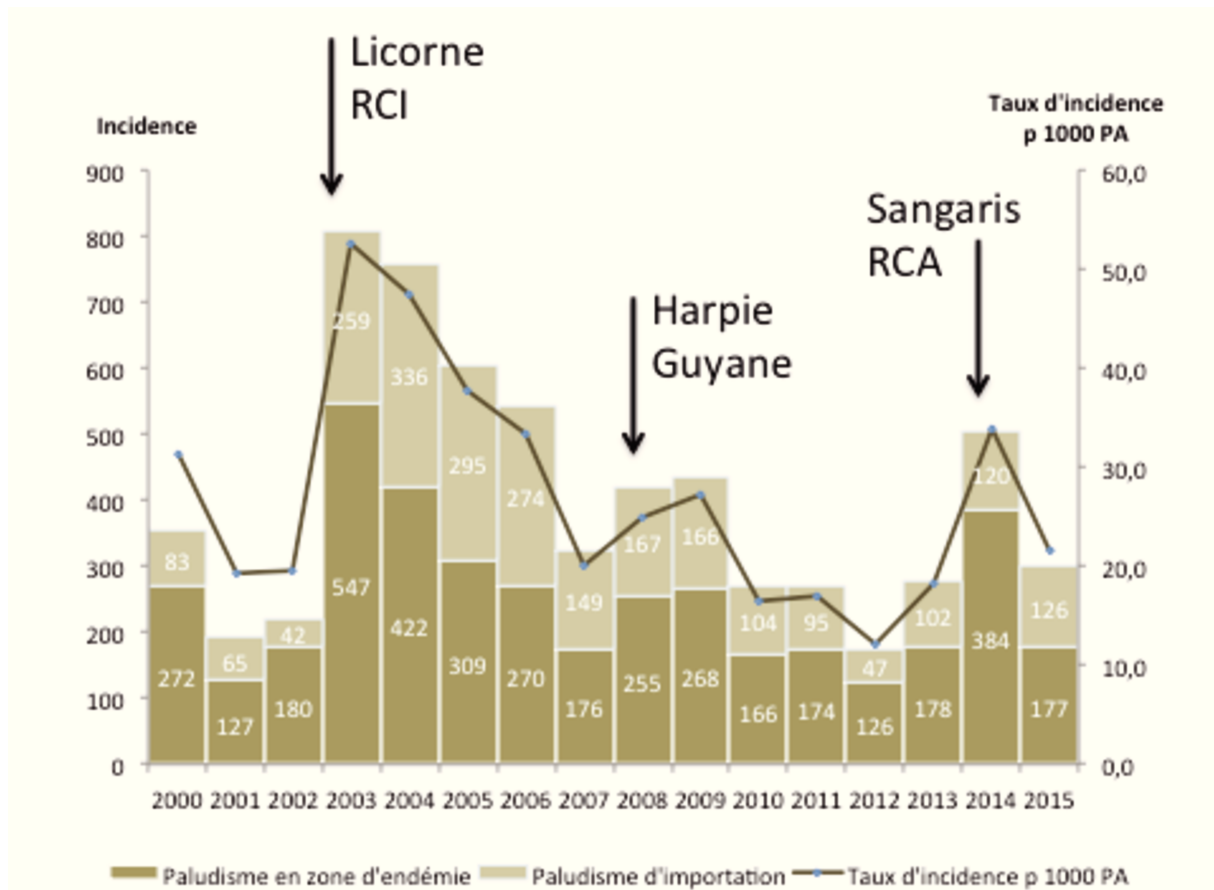


Figure 18 : incidence et taux d'incidence du paludisme dans les armées de 2000 à 2015 (192).

### 3. Biologie du paludisme

Le cycle de développement des plasmodies est complexe et implique deux hôtes : la femelle moustique *Anopheles* où a lieu le cycle sporogonique sexué, et un hôte vertébré où a lieu le cycle schizogonique asexué (Figure 19).

Chez l'hôte vertébré, le cycle est initié par l'injection d'une dizaine à une centaine de sporozoïtes dans le derme lors du repas sanguin d'un anophèle femelle. Ces sporozoïtes possèdent, grâce à un moteur d'actine-myosine et l'expression de protéines d'adhésion, une mobilité par glissement (195) qui leur permet de rejoindre les vaisseaux sanguins ou les vaisseaux lymphatiques, et le foie où un premier **cycle pré-érythrocytaire** est initié au sein des hépatocytes (Figure 19B). Parmi les protéines impliquées dans l'invasion des hépatocytes sont impliquées les protéines CS (circumsporozoïte protein), TRAP (thrombospondin-related anonymous protein) et AMA-1 (apical membrane antigen-1).

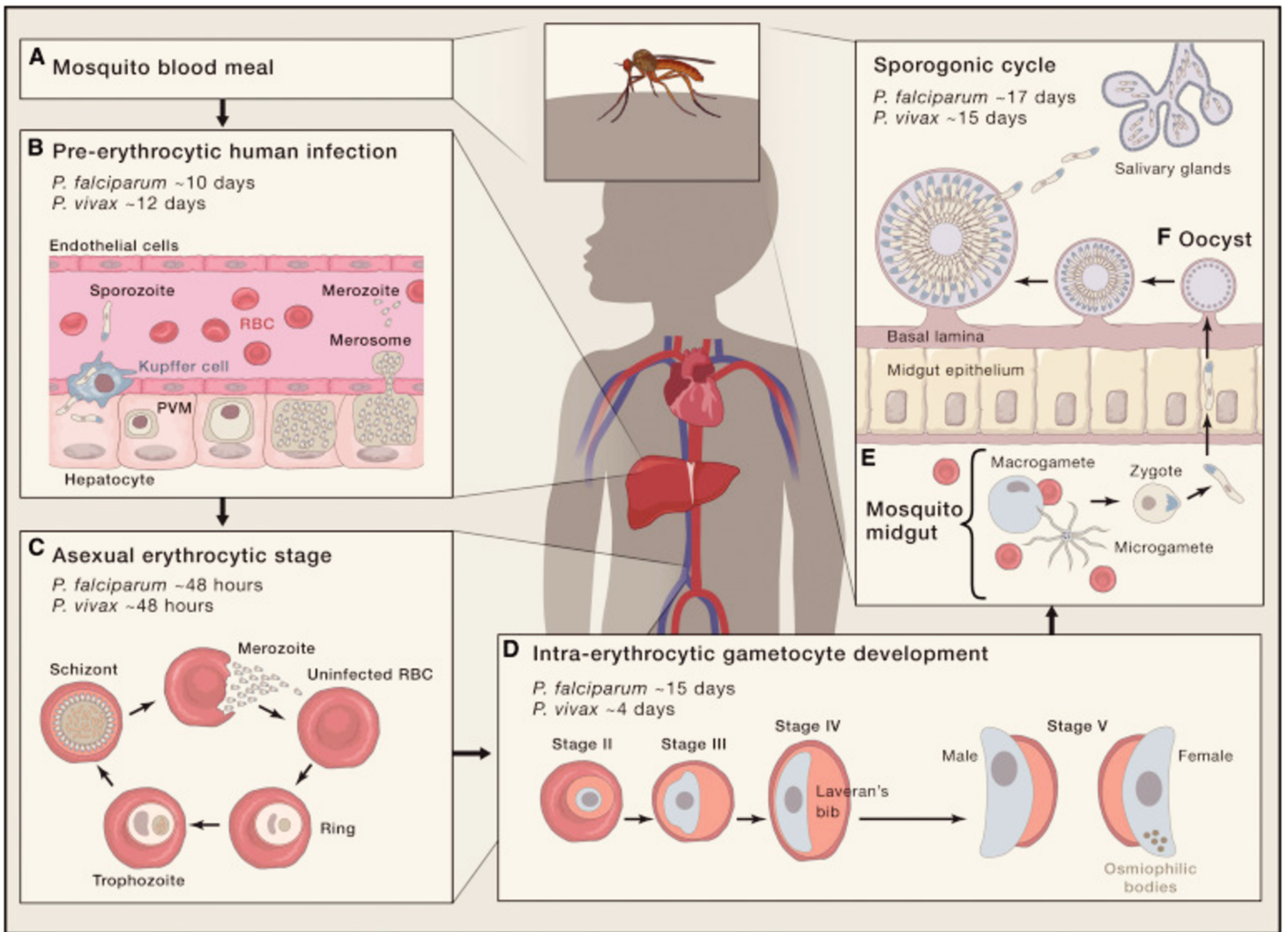


Figure 19 : cycles de développement des plasmodies au sein des deux hôtes, mammifère (ici l'homme) et insecte vecteur (moustique du genre Anopheles) (196).

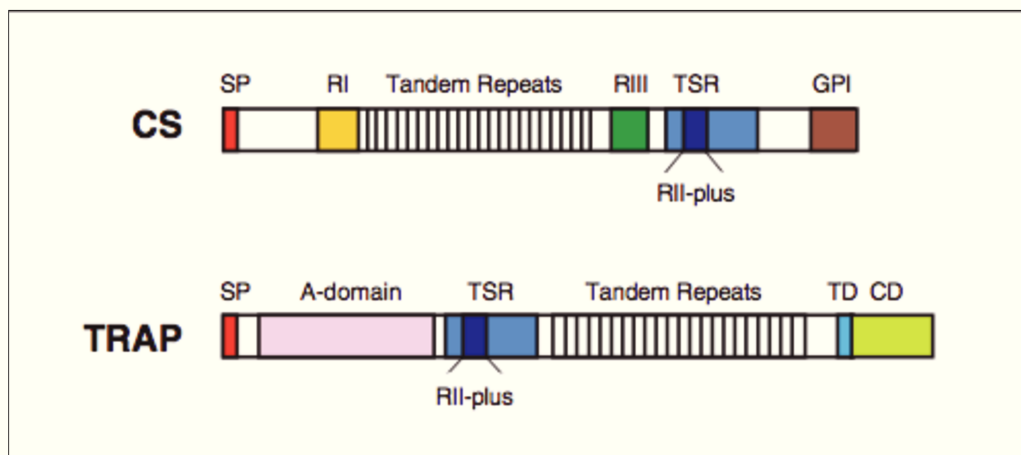


Figure 20 : domaines fonctionnels des protéines CS et TRAP.

La **protéine CS** recouvre l'entière surface des sporozoïtes (197). Elle comporte un peptide signal, trois séquences conservées RI, RII-plus et RIII, un domaine central composé d'une répétition d'acides aminés et une séquence hydrophobe en C-terminal (Figure 20). Le motif RI est un pentapeptide conservé KLKQP impliqué dans l'attachement du sporozoïte à différentes cellules. Le motif RII-plus contient un motif TSR (*thrombospondin repeat*) responsable de l'adhésion aux protéoglycanes héparanes sulfates (HSPGs) des sinusoides du foie. La **protéine TRAP** est une protéine transmembranaire de type I. Elle possède, en plus du motif TSR et d'un domaine de répétitions en tandem, un domaine A qui correspond au domaine I des intégrines. Elle est directement impliquée dans la motilité des sporozoïtes en servant de lien entre les récepteurs de l'hôte et le moteur d'actine-myosine. Après invasion des hépatocytes, plusieurs cycles de réplication aboutissent à la libération en 2 à 10 jours dans le sang de 40 000 **mérozoïtes** par hépatocyte par le bourgeonnement de vésicules remplies de parasites appelées mérosomes (198). Pour certaines espèces de plasmodies, comme *P. vivax* et *P. ovale*, une partie des sporozoïtes persiste sous une forme latente intra-hépatique, appelée **hypnozoïtes**. Ces formes dormantes sont à l'origine de « rechutes » dans les semaines et mois suivant l'infection initiale. L'hypothèse évolutive suggérée par NJ White (199) est celle d'un mécanisme d'échappement à la pression de sélection imposée par les espèces plus virulentes telle que *P. falciparum*, et permettant ainsi d'accroître les opportunités de transmission à l'hôte secondaire.

Les mérozoïtes libérés dans le sang sont ensuite à l'origine du **cycle érythrocytaire** (Figure 19C) par un phénomène d'invasion dynamique des érythrocytes en plusieurs étapes (pré-invasion, invasion active et échinocytose), phénomène rapide dont la durée moyenne est de 2 minutes (200). Le stade de pré-invasion (Figure 21) se définit par l'interaction forte entre le mérozoïte et l'érythrocyte, impliquant deux familles de protéines pour *P. falciparum*, espèce la plus étudiée : PfRhs (*P. falciparum reticulocyte-binding protein homologs*) et EBLs (*erythrocyte binding-like proteins*). Puis, l'interaction entre le complexe formé par PfRh5 - PfRipr (*Rh5-interacting protein*) – CyRPA (*cysteine-rich protective antigen*) et la basigine à la surface du globule rouge permet une réorientation apicale du mérozoïte (201-203). Enfin, l'attachement devient irréversible par la formation de jonctions serrées, impliquant AMA1 et le complexe RON (204). L'invasion est guidée par le moteur d'actine-myosine. A la phase d'échinocytose, l'érythrocyte infecté est

caractérisé par une déformation en épi de sa membrane, due à des influx calciques (200). Au sein de l'érythrocyte, le parasite prend la forme d'un anneau entouré d'une vacuole ou parasitophore, et entame une division cellulaire appelée schizogonie pour former des schizontes en une trentaine d'heures. Ces derniers vont libérer, après destruction de l'érythrocyte, de 16 à 32 mérozoïtes qui vont à leur tour pouvoir infecter de nouveaux érythrocytes. Durant les cycles de schizogonie, une partie des parasites va initier un développement sexuel pour former des gamétocytes mâles et femelles (Figure 19D). Des facteurs environnementaux, comme une parasitémie élevée ou l'exposition aux antipaludiques comme la chloroquine, sont associés à une augmentation de la production des gamétocytes. La régulation épigénétique semble avoir un rôle majeur dans la différenciation sexuelle, impliquant le facteur de transcription AP2-G (205). Cependant les événements moléculaires sous-jacents restent encore peu décrits. Le stade érythrocytaire est responsable des manifestations cliniques de l'infection.

Au sein de l'hôte vecteur, les femelles du genre *Anopheles*, le parasite entame un **cycle sporogonique** sexué (Figure 19E). Le moustique ingère les gamétocytes mâles et femelles lors d'un repas sanguin sur l'hôte vertébré. Dans l'intestin, la fusion des gamètes forme un zygote qui se différencie en une forme mobile, l'ookinète. Celui-ci migre en 24 heures à travers l'épithélium intestinal où il s'enkyste et forme un oocyste qui entre en méiose pour produire des sporozoïtes qui vont rejoindre les glandes salivaires du moustique. Ce sont ces sporozoïtes qui seront injectés à l'hôte vertébré lors d'un nouveau repas sanguin (Figure 19E). Le cycle sporogonique de *P. falciparum* a une durée de 10 à 20 jours chez le moustique.

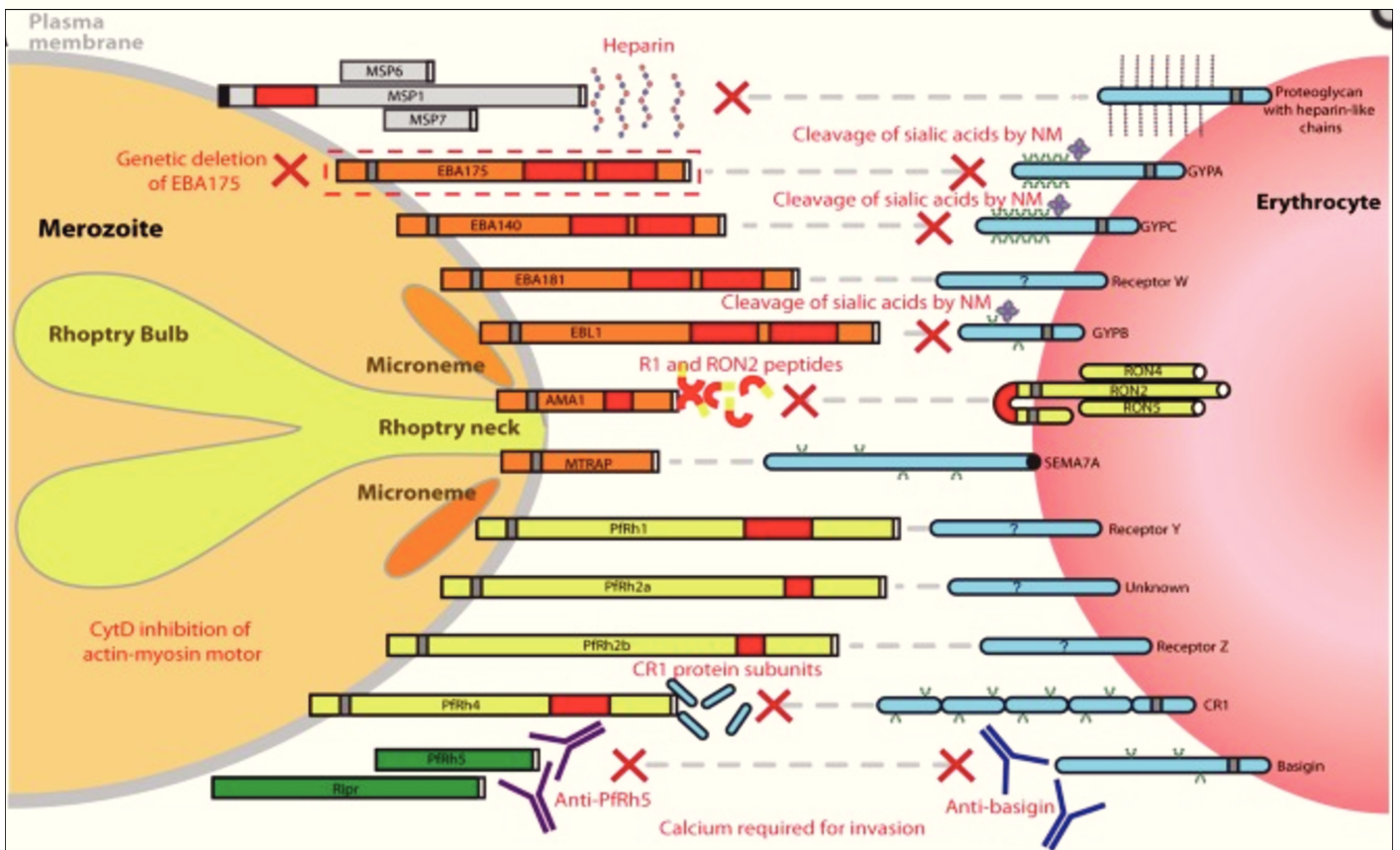
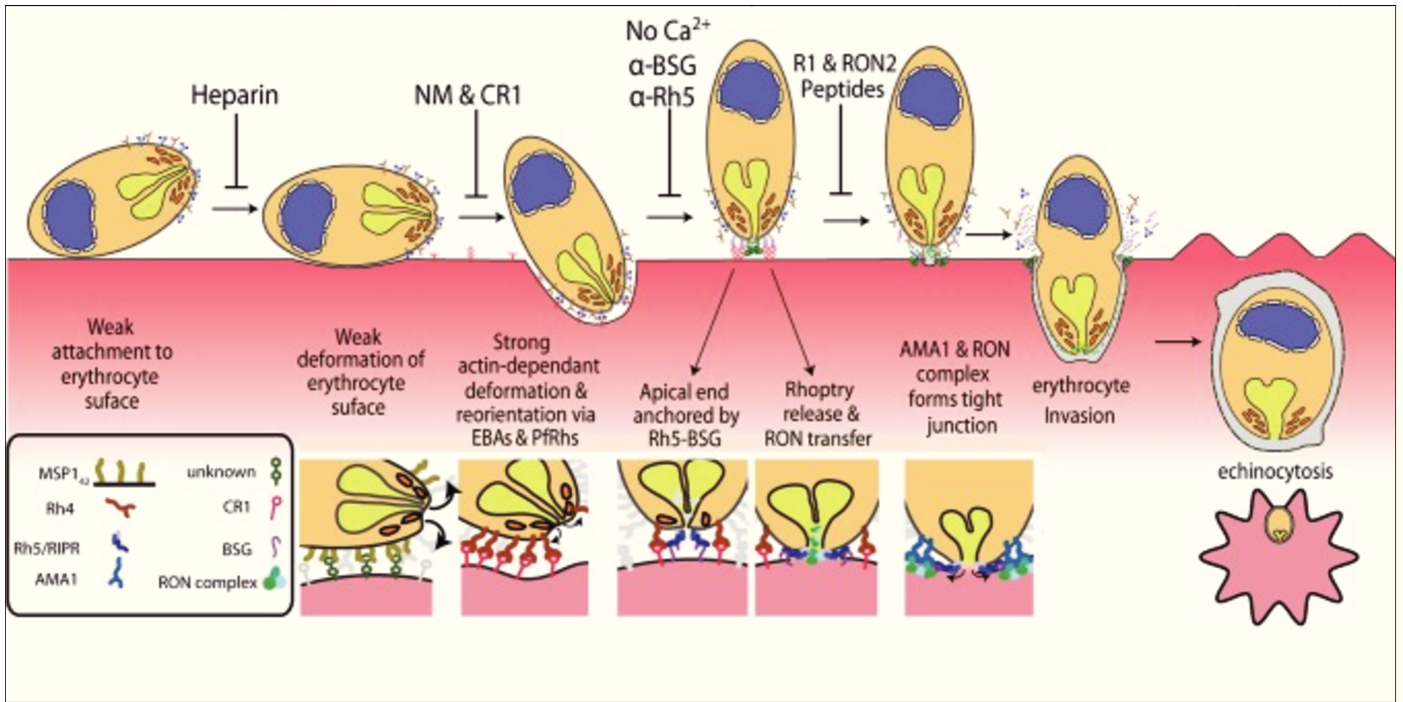


Figure 21 : phénomène d'invasion des érythrocytes et protéines impliquées à la surface des mérozoïtes et des érythrocytes (200).



#### 4. Réponse immunitaire

L'acquisition naturelle d'une immunité antipaludique est un processus lent et influencé par de nombreux facteurs dont un majeur qui est la nécessité d'une exposition continue au parasite. Elle n'est donc retrouvée qu'en zone d'endémie et s'acquiert au cours des années (Figure 22). Ceci explique pourquoi les jeunes enfants paient le plus lourd tribut de la maladie en Afrique sub-saharienne. De plus, cette immunité, dite de « prémunition », est imparfaite, non stérile, et diminue rapidement dès que l'exposition disparaît (six mois). Sa spécificité dépend de l'espèce plasmodiale, de la souche et des variants rencontrés. La présentation par le parasite d'un large répertoire antigénique ainsi que sa capacité à moduler les réponses immunitaires de l'hôte empêchent la construction d'une immunité efficace et durable.

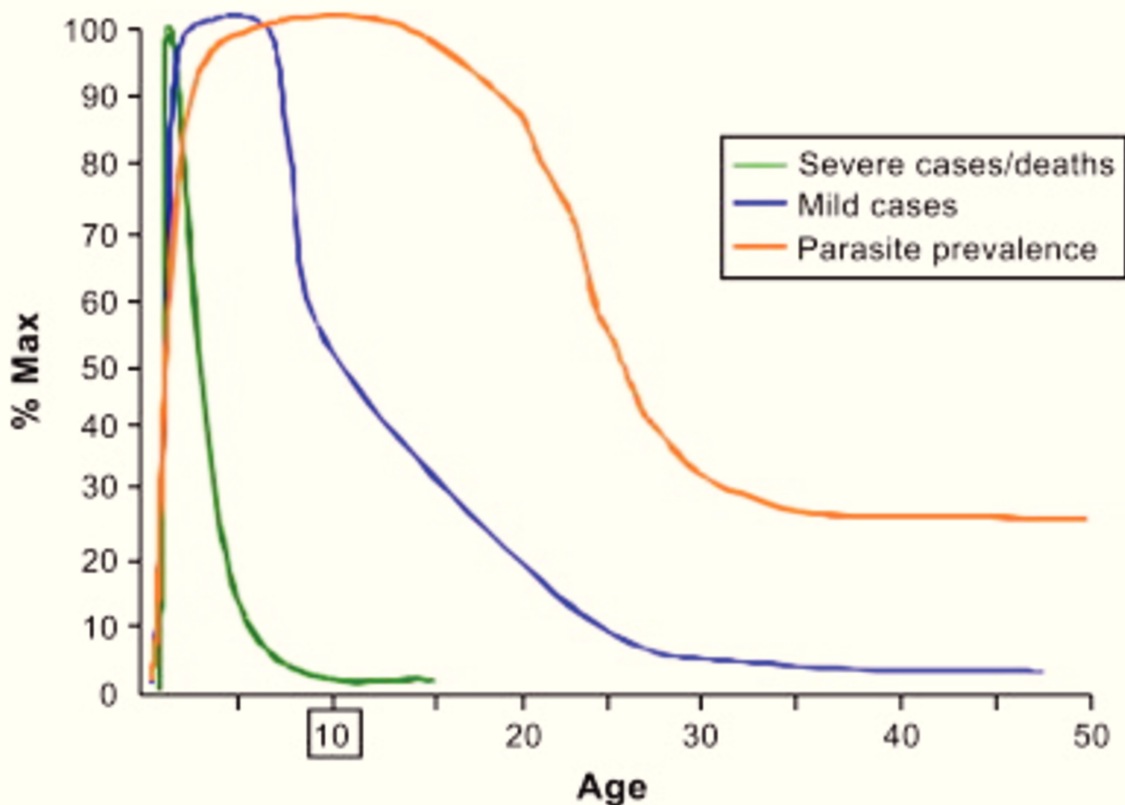


Figure 22 : étapes d'acquisition de l'immunité de prémunition au cours du temps (206).

### a) *Immunité innée*

Bien que seul le stade érythrocytaire soit responsable des signes cliniques de la maladie, la réponse immunitaire innée est initiée dès le stade pré-érythrocytaire (207). L'ARN plasmodial serait ainsi reconnu très tôt par MDA5 au sein des hépatocytes infectés pour aboutir à la synthèse d'IFN-I (208), afin d'induire l'inhibition de la croissance des formes parasitaires exoérythrocytaires (209). Au stade érythrocytaire, les PRRs impliqués dans la reconnaissance plasmodiale appartiennent à la famille des TLRs (210). Les trois PAMPs plasmodiaux majeurs décrits sont : les ancras GPI, l'hémozoïne, et les motifs d'acides nucléiques immunostimulateurs (211). TLR9 reconnaît l'ADN plasmodial présenté par l'hémozoïne (212). TLR4 est activé par l'hémozoïne liée au fibrinogène de l'hôte (213). TLR7 a démontré son importance pour la production d'IFN-I au cours du paludisme (214) et son ligand hypothétique serait l'ARN parasite. Enfin, TLR2 reconnaît les ancras GPI des protéines parasitaires (215). L'activation de ces PRRs aboutit, *via* Myd88, à la translocation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP1 (*activator protein 1*).

D'autres voies d'activation pro-inflammatoires sont décrites (216) incluant notamment les récepteurs NLR, l'acide urique et le système du complément. Les plaquettes, et plus particulièrement le facteur PF4, ont également un rôle antiparasitaire direct en induisant la lyse de la vacuole parasitophore (217). La réponse inflammatoire résultant de la reconnaissance du parasite par les récepteurs de l'immunité innée va dans un second temps activer les cellules NK qui contribuent à la fois à la protection et la pathogénicité (218). Les macrophages jouent également un rôle important en phagocytant les érythrocytes infectés (219) et en activant les cellules NK. Néanmoins, leur activation excessive conduit à une décharge cytokinique majeure impliquée dans la physiopathologie des formes sévères (220). Les pDCs produisant de l'IFN-I au stade érythrocytaire sont actuellement considérés comme les chefs d'orchestre du réseau immunorégulateur, conduisant à l'expansion des cellules T régulatrices de type 1 (Tr1) et restreignant l'immunité humorale (221).

### b) *Immunité adaptative humorale*

Les anticorps (Ac) contribuent à la protection en ciblant diverses étapes de développement du parasite. Au stade pré-érythrocytaire, les Ac anti-CSP neutralisent les sporozoïtes et préviennent ainsi l'infection des hépatocytes (222). La présence de

ces Ac est corrélée avec la protection induite par les vaccins basés sur l'Ag CS dans les modèles pré-cliniques et au cours des essais cliniques (223, 224). Au stade érythrocytaire, les globules rouges infectés (iRBC) expriment à leur surface une variété de protéines parasitaires polymorphiques appelées VSA (Variant Surface Antigen). Les Ac dirigés contre ces protéines sont étroitement liés à la protection et la réduction de la morbidité, que ce soit sur modèle animal ou au cours des études épidémiologiques menées en zone d'endémie (225). Enfin, au stade gamétocytaire, les Ac jouent un rôle majeur en liant les gamétocytes pour prévenir leur développement au sein du moustique (226).

Les sous-types d'IgG jouent un rôle important. Les IgG1 et IgG3 chez l'homme, et les IgG2a chez la souris, ont démontré leur efficacité pour la liaison et l'élimination des parasites (227, 228), ainsi que pour l'activation du mécanisme d'inhibition de la croissance parasitaire dépendante des monocytes (ADCI) (229). A l'inverse, certains Ac peuvent promouvoir le développement parasitaire, d'où l'importance de tester l'activité fonctionnelle en plus du titre des Ac. Enfin, l'exposition répétée à l'infection joue un rôle majeur dans l'acquisition de l'immunité de prémunition. Le répertoire d'Ac s'élargit à chaque exposition et favorise la transition entre paludisme-maladie et statut de porteur asymptomatique du parasite (230).

### c) *Immunité adaptative cellulaire*

La cible principale des cellules T anti-plasmodiales, principalement étudiée sur modèle animal, est le stade hépatique. Selon le modèle murin utilisé, l'immunité protectrice est dépendante des T CD4<sup>+</sup> ou des T CD8<sup>+</sup>. L'IL12 et l'IFN- $\gamma$  jouent un rôle majeur.

#### Lymphocytes T CD8<sup>+</sup>

La protection induite chez l'animal vacciné par de multiples doses de sporozoïtes irradiés est médiée par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sécrétant de l'IFN- $\gamma$  (231). Chez l'homme, le rôle d'un HLA spécifique (HLA-B53) a été mis en avant pour la protection des enfants vis-à-vis des formes graves en Gambie (232), soulignant le rôle des CD8<sup>+</sup> dans la protection. Les réponses CD8<sup>+</sup> sont sans effet sur le stade érythrocytaire, les globules rouges n'étant pas porteurs de molécules MHC de classe I. Elles sont par contre indispensables au stade hépatique. De plus, il semblerait que

le premier site de la réponse CD8<sup>+</sup> soit déclenché par les ganglions lymphatiques au niveau cutané (233), avant même que les parasites n'aient rejoint le foie.

#### Lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

De nombreux arguments soulignent l'importance des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> pour la régulation de la parasitémie ou l'élimination des parasites. Ils interviennent dans la différenciation et la survie des T CD8<sup>+</sup> (234), ainsi que dans l'induction d'une réponse anticorps T-dépendante faisant intervenir les cellules T folliculaires au sein des centres germinatifs. La différenciation en cellules Tr1 sous l'induction de l'IFN- $\gamma$ , produit de l'IL10, qui va inhiber la réponse pro-inflammatoire (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17 et IL-6) et atténuer la sévérité de l'immunopathologie du paludisme (235). En zone d'endémie, le phénotype FOXP3<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> des lymphocytes T était associé avec une moindre pathogénicité lors des formes sévères de paludisme (236). Ce phénotype était retrouvé sous la dépendance des cytokines IL10, TGF- $\beta$  et IL-2 (237).

#### *d) Stratégies d'échappement immunitaire*

Les plasmodies ont développé, au cours de la longue coévolution avec leur hôte, un ensemble impressionnant de stratégies d'évasion pour interférer avec à la fois l'immunité innée et l'immunité adaptative. Ces éléments rendent compte de l'impossibilité pour le système immunitaire de l'hôte à induire une protection stérilisante, et des difficultés à mettre au point un vaccin à forte efficacité.

#### Camouflage

Au niveau cellulaire, le mécanisme le plus basique d'échappement repose sur un cycle de développement principalement intracellulaire, durant lequel le parasite est invisible aux cellules du système immunitaire. Ceci est particulièrement vrai pour les érythrocytes qui ne présentent pas de molécules MHC de classe I à leur surface et ne sont donc pas « scannés » en permanence par les cellules T circulantes. De plus, la formation de rosettes par la liaison d'érythrocytes « sains » aux érythrocytes infectés participe également au camouflage des cellules infectées, en prévenant l'opsonisation et la phagocytose (238). Le tissu hépatique est également connu pour être un milieu peu enclin aux réactions immunes, et les hypnozoïtes peuvent

persister pendant plusieurs semaines/mois au sein des hépatocytes. Au sein du cytosol, le parasite intrahépatique est à l'abri des PRRs et de la voie de présentation CMH-I en se développant au sein d'une vacuole parasitophore. Lorsque les parasites quittent la cellule hépatique hôte, ils restent entourés d'une partie de la membrane cellulaire pour former les mérosomes, échappant ainsi à la détection par les cellules de Küpffer (198).

Au niveau protéique, les plasmodies séquestrent les domaines ayant des fonctions essentielles à son développement. Ainsi, les domaines nécessaires à l'invasion des hépatocytes présents sur la protéine CS sont situés à l'intérieur de la structure protéique tridimensionnelle (239). Au stade érythrocytaire, les protéines impliquées dans l'invasion des érythrocytes, comme la protéine RH5, sont séquestrées au sein des rhoptries et sécrétées au dernier moment lors du processus d'invasion érythrocytaire (240).

#### Polymorphisme antigénique

Le changement de tropisme cellulaire des différents stades de développement du parasite s'associe à une variété antigénique importante limitant l'efficacité de la réponse immune antigène-spécifique. De plus, par un processus continu de mutations et recombinaisons, incluant un biais de mutation aboutissant à un excès de nucléotides AT, les plasmodies présentent un polymorphisme majeur des protéines exposées à la surface. A titre d'exemple, les gènes *Var* et *Rif* se présentent respectivement avec plus de 50 et 150 copies différentes du gène (241, 242). L'étude des variants protéiques p253 a montré que chaque noyau des parasites intra-érythrocytaires transcrit son propre ADN. Lorsque la cellule hôte éclate, chaque mérozoïte est potentiellement différent dans ses capacités d'invasion, multipliant les chances de propagation en échappant aux cellules de l'immunité (243).

#### Motifs moléculaires répétés

De nombreuses protéines de *Plasmodium* présentent une ou plusieurs régions contenant des motifs moléculaires répétés. Ces régions sont très immunogéniques et attirent vers elles, par un phénomène d'immunodominance, des réponses adaptatives spécifiques inefficaces en faisant un « écran opaque » à la reconnaissance des autres régions susceptibles d'être reconnues par les cellules de l'immunité (244). De plus, l'activation des lymphocytes B par des motifs répétés

conduit à une réponse T-indépendante, caractérisée par une moindre maturation d'affinité, l'absence de bascule d'isotype et d'induction de mémoire (245).

### Tolérance

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans l'induction de tolérance. D'une part, les protéines parasitaires portent des séquences homologues aux protéines de l'hôte, qui les rendent peu immunogènes (245). D'autre part, le pigment malarique, ou hémozoïne, produit par les parasites intra-érythrocytaires après digestion de l'hémoglobine, est un puissant inhibiteur de l'activité phagocytaire cellulaire (246). Il induit ainsi une tolérance par les macrophages et cellules dendritiques. Enfin, la signalisation TLR-9 et TLR-7 induit l'activation des lymphocytes T régulateurs avec une balance favorable vers l'IL10 et l'induction de tolérance.

### Epuisement lymphocytaire

L'épuisement fonctionnel des lymphocytes est caractérisé par l'expression de PD-1 (CD279). Il correspond à un état d'anergie à une stimulation antigénique et/ou à une régulation négative des facteurs de survie cellulaire, conduisant à l'apoptose. C'est un phénomène communément observé sur des PBMC de sujets vivant en zone d'endémie palustre. Il touche à la fois les cellules B, T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (247).

### Absence de mémoire à long terme

La mémoire immunologique au paludisme est de courte durée, et requiert de fréquentes réinfections, dans le cas de l'immunité naturelle, et probablement de fréquents rappels dans le cadre de la vaccination (248). Cette immunité de prémunition est perdue dans les six mois en l'absence de circulation parasitaire. L'ensemble des phénomènes d'échappement immunitaire est impliqué dans l'activation suboptimale de la mémoire immunitaire.

Ainsi, l'adaptation du parasite à son hôte a favorisé le maintien de multiples voies de contournement des réponses immunes de l'hôte. Les défis de la vaccination sont nombreux : faire mieux que Nature en induisant une immunité stérilisante avec une mémoire à long terme ? Ou plus modestement, réduire la parasitémie dans l'objectif de réduire la morbi-mortalité et la transmission ? Les stratégies vaccinales

développées à ce jour sont multiples et diverses, avec des résultats modérés mais encourageants.

## 5. Candidats vaccins

Malgré la réussite des programmes de santé publique instaurés ces 15 dernières années, le poids du paludisme dans le monde reste important. L'extrême plasticité génomique du parasite rend inévitable l'apparition de résistances aux antipaludiques, instaurant une course permanente entre la découverte de nouvelles molécules et l'apparition des résistances. La résistance des moustiques aux insecticides augmente également. Il est donc nécessaire de pouvoir disposer de stratégies complémentaires pour réduire la morbi-mortalité liée au paludisme.

Les défis de la vaccination doivent prendre en compte, en plus des éléments vus dans le chapitre précédent, qu'aucun corrélat de protection n'a été clairement identifié à ce jour. Il est évident que les composants humoraux et cellulaires sont importants (Figure 23) et nous verrons pour les deux principaux candidats vaccinaux les composants de la réponse immune qui ont pu être associés à une protection des individus.

### a) *Les candidats vaccins les plus avancés*

Nous concentrerons volontairement notre propos sur les candidats vaccins ciblant *P. falciparum*. En effet, cette espèce plasmodiale est responsable de la plus forte morbi-mortalité liée au paludisme dans le monde et le développement vaccinal s'est concentré majoritairement sur cette cible. Néanmoins, la présence de formes sévères de *P. vivax*, l'impact des rechutes liées aux formes latentes, et la répartition géographique touchant des pays au développement émergent conduisent de plus en plus d'équipes de recherche à mettre au point des candidats vaccinaux contre *P. vivax*.

Malgré plus d'un siècle consacré à la recherche vaccinale contre le paludisme, un seul candidat, le vaccin protéique recombinant purifié RTS,S/AS01, a obtenu un avis positif de l'Agence européenne des médicaments et de l'Organisation mondiale de la santé pour la mise en place de programmes pilotes au Ghana, au Kenya et au Malawi avec un plan de pharmacovigilance renforcé (249). Nous verrons néanmoins que son efficacité est toute relative. La deuxième stratégie de vaccination, la plus efficace à ce jour, est le vaccin entier atténué comportant des sporozoïtes irradiés.

Ce vaccin présente de nombreuses difficultés logistiques de production et de conservation, ce qui a largement freiné son développement. Nous allons présenter successivement les deux approches vaccinales.

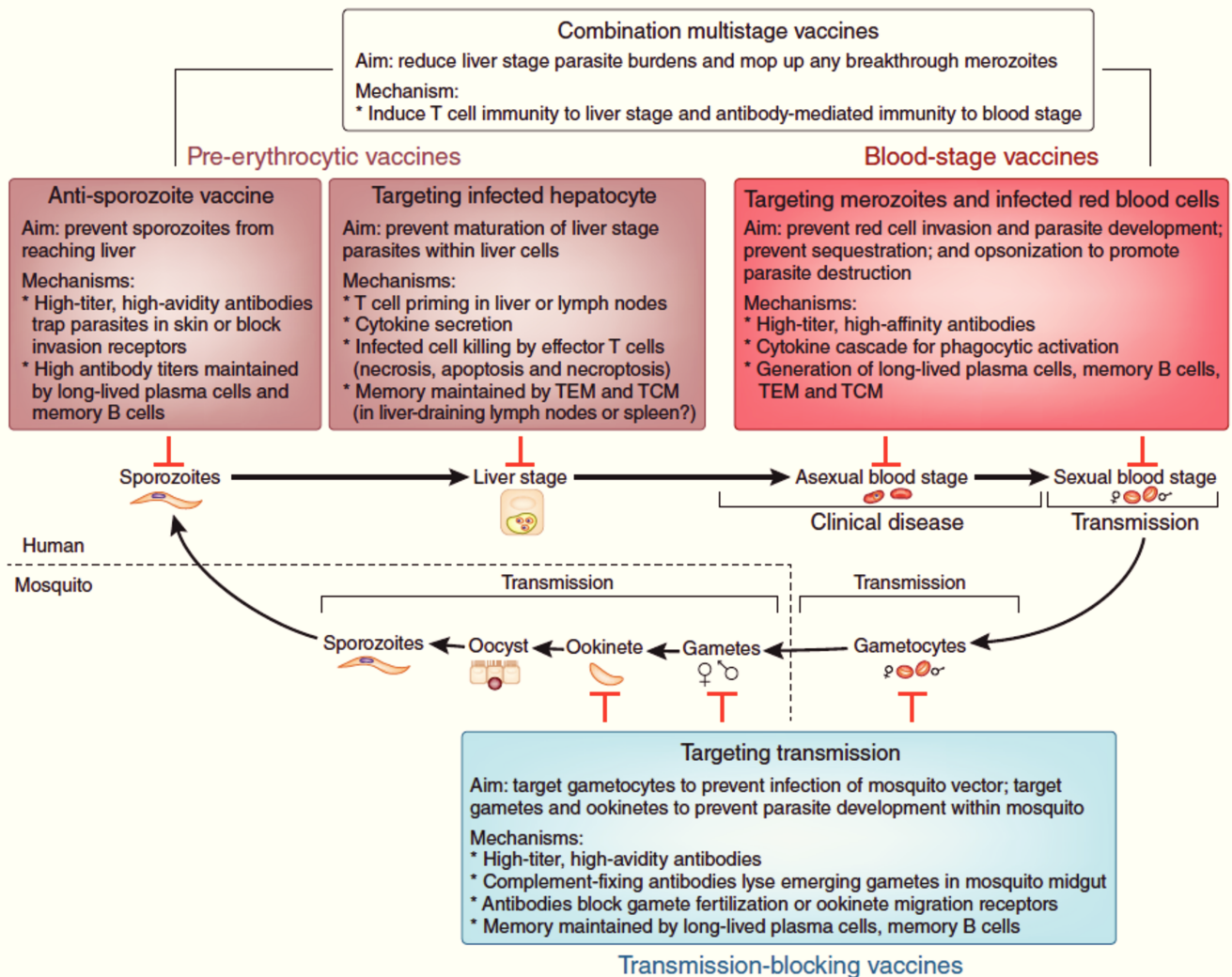


Figure 23 : Réponses vaccinales associées à la protection en fonction du stade de développement parasitaire (250).

### Vaccin protéique recombinant purifié, RTS,S/AS01

Le vaccin RTS,S/AS01 développé par le *Walter Reed Army Institute of Research* (WRAIR) et l'industriel GSK, consiste en une protéine recombinante s'auto-assemblant en « *virus-like particles* » (VLP). La protéine comporte 19 répétitions du motif NPNA et la portion C-terminale de la protéine CS du clone 3D7 de *P.*



*falci-parum*, fusionnées à l'Ag de surface du virus de l'hépatite B (HBsAg). AS01 est un adjuvant à base de liposome, comportant le 3-O-desacyl-4'-monophosphoryl lipide A (MPL) qui est un ligand TLR4, et une saponine (QS-21) extraite d'un bois de Panama (*Quillaja saponaria*). A ce jour, ce vaccin a démontré sa sécurité et son profil d'immunogénicité au cours d'infections contrôlées chez l'homme (CHMI) et par des études de terrain en zone d'endémie (251-253). Les essais cliniques de phase IIb conduits en Afrique ont démontré une protection partielle chez les adultes et les enfants. Ces résultats ont été confirmés lors de l'essai clinique de phase III (254) réalisé dans 11 centres à travers 7 pays endémiques présentant des profils de transmission différents, avec un protocole de 3 doses espacées d'un mois, suivi d'un rappel éventuel à 20 mois. L'efficacité globale contre les formes cliniques à 14 mois après la première vaccination était de 50,4% chez les enfants vaccinés à plus de 5 mois. Elle n'était que de 30% chez les nourrissons de 6 à 12 semaines. A 38 mois de suivi, l'efficacité globale tombait à 18% sans rappel vaccinal et 26% avec un rappel à 20 mois. Aucune protection contre les formes sévères de paludisme n'a été démontrée.

Pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents l'efficacité vaccinale et appréhender les corrélats de protection, une approche en analyse systémique a été réalisée (255). Le titre d'Ac corrélait positivement avec la protection au cours des essais de phase II avec CHMI réalisés aux USA (*Walter Reed Army Institute of Research*), ainsi que des signatures moléculaires lymphocytaires B et plasmocytaires. Cette étude a comparé une stratégie de *prime-boost* utilisant un vecteur adénoviral (Ad35-CSP) pour le *prime* et le vaccin RTS,S/AS01 pour les deux injections suivantes. Cette stratégie améliorait la réponse cellulaire associée à la protection (polyfonctionnalité des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>), sans pour autant modifier la protection. Enfin, la signature moléculaire NK corrélait négativement avec la protection. Il semblerait que les NK régulent négativement la formation des centres germinatifs ainsi que la réponse T folliculaire, avec un impact non négligeable sur la génération de la mémoire B (256).

#### Vaccin entier par sporozoïtes irradiés (SPZ)

L'efficacité de l'approche « organisme entier » sur modèle murin est connue depuis les années 1960 (257) par irradiation aux rayons X de sporozoïtes (SPZ) isolés des glandes salivaires des anophèles. Les études sur modèle animal ont montré que la protection repose essentiellement sur l'induction des cellules T CD8<sup>+</sup>

ciblant les antigènes exprimés au stade pré-érythrocytaire (258). Les SPZ de *P. falciparum* ont ensuite été développés pour vacciner l'homme, avec une bonne efficacité contre l'épreuve infectieuse par des souches homo- ou hétérologues (259-261). L'effet dose-réponse impacte à la fois la réponse humorale et cellulaire. Des doses de l'ordre de  $10^5$  sont néanmoins nécessaires pour induire une protection de 100% des sujets lors des CHMI, ce qui entraîne de réelles difficultés logistiques de production, conservation et reproductibilité. La compagnie Sanaria a développé une plateforme permettant actuellement de délivrer une forme injectable (voie veineuse) de sporozoïtes irradiés (PfSPZ) aseptiques, purifiés et cryopréservés. Un plan de développement clinique est actuellement implémenté par un consortium international visant à démontrer : (i) la reproductibilité de la tolérance/sécurité/immunogénicité ; (ii) une durée de protection d'au moins 6 mois ; (iii) une protection contre des souches hétérologues ; (iv) l'induction d'immunogénicité et de protection au sein d'une population pré-exposée ; (v) la validation d'un test biologique prédisant la protection ; (vi) la faisabilité opérationnelle d'une administration de masse (262).

L'analyse de la réponse immune chez les sujets protégés a permis de mettre en avant un rôle important des lymphocytes T  $\gamma\delta$  (263).

D'autres approches d'atténuation sont également développées : injection de sporozoïtes sous chimio prophylaxie (PfSPZ-CVac, Sanaria®) ou atténuation génétique par mutations (PfSPZ-GA1, Sanaria®). Des essais cliniques sont en cours pour tester ces deux alternatives.

#### *b) Les autres stratégies développées*

De nombreux candidats vaccins visant les stades pré-érythrocytaires, érythrocytaires, ou les gamétocytes, ont été développés avec succès sur modèle animal mais ont échoué lors du transfert chez l'homme (264).

Les diverses stratégies vaccinales pré-érythrocytaires testées à ce jour ont utilisé des plateformes vaccinales ayant pour but d'induire une réponse  $CD8^+$  : ADN nu, vecteurs viraux non réplicatifs (Adénovirus, Poxvirus type MVA), bactéries recombinantes (*Listeria*). Cependant, les résultats chez l'homme sont décevants, à moins d'associer plusieurs approches dans des stratégies de *prime/boost* (262).

L'approche érythrocytaire, jusqu'à présent uniquement sous-unitaire, cherchait essentiellement à induire une réponse anticorps. Cependant, ces candidats vaccins

n'ont pu montrer qu'une réduction de la parasitémie en réponse à l'épreuve infectieuse homologe chez l'homme (265). Récemment, une forme atténuée du stade érythrocytaire a montré une excellente protection sur modèle murin (266). Cette approche innovante ouvre de nouvelles perspectives vaccinales, mais reste à confirmer chez l'homme.

Enfin, les vaccins visant à bloquer la transmission en se liant aux formes sexuées du parasite n'ont pour le moment pas réussi à induire des taux suffisants d'anticorps (267).

L'OMS tient à jour un tableau résumant les données pré-cliniques et cliniques de chaque candidat vaccin (rainbow table, OMS). Les principaux projets en cours sont représentés dans la figure 24.

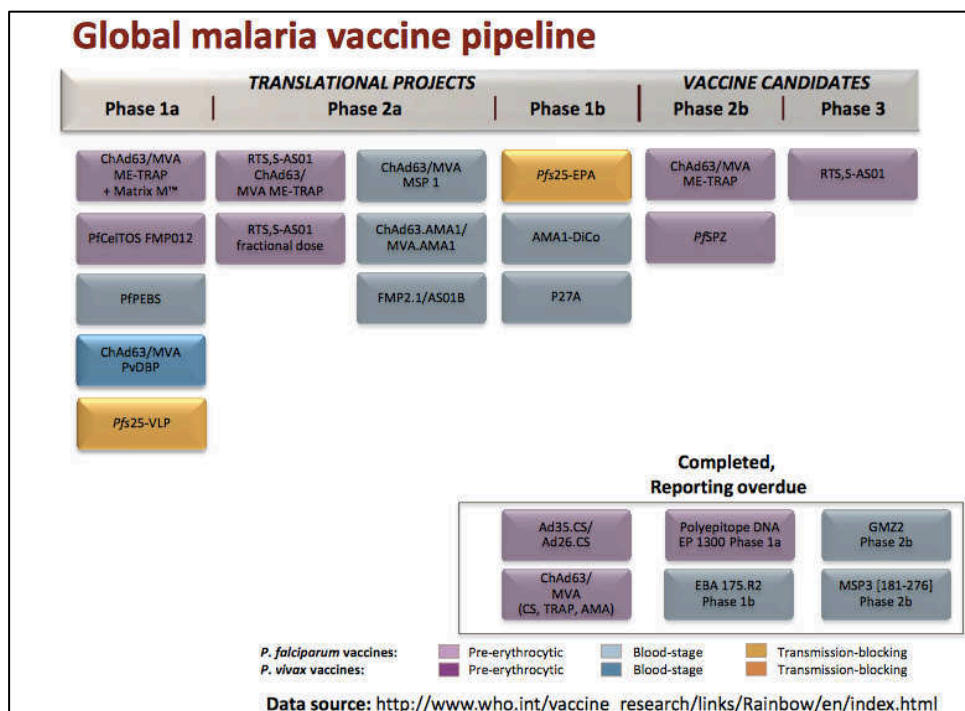


Figure 24 : Malaria rainbow table, OMS.

### c) Les antigènes d'intérêt

L'efficacité du vaccin RTS,S/AS01, bien que partielle, justifie largement d'inclure l'Ag **CS** dans les nouveaux candidats vaccins, et de l'utiliser pour comparer différentes plateformes vaccinales. La pertinence de cet antigène comme candidat vaccinal a été rapportée la première fois dans les années 1980s (268). La majorité de la protection induite par les vaccins entiers inactivés (SPZ irradiés ou

génétiqnement atténués) est également médiée par la réponse humorale anti-CS (269). La structure protéique, ainsi que les aspects biochimiques et moléculaires sont conservés entre les différentes souches de *Plasmodium*. Au cours du cycle pré-érythrocytaire, la liaison du SPZ aux chaînes de glycosaminoglycanes des hépatocytes fait intervenir la région II de la protéine CS (270). De plus, la protéine CS est impliquée dans l'échappement immunitaire en bloquant la translocation de p65 dans le noyau, et ainsi évitant l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (271). D'autres antigènes du stade pré-érythrocytaire ont montré un intérêt au cours d'essai cliniques de phase IIb (TRAP, CeITOS), mais avec une moindre efficacité comparée à la protéine CS.

Au stade érythrocytaire, les antigènes exprimés à la surface du parasite sont extrêmement polymorphiques en réponse à la pression immunitaire humorale. Du fait de l'absence de molécules de CMH-I à la surface des érythrocytes, un candidat vaccinal idéal devra induire des titres élevés d'Ac de haute affinité pour bloquer l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes en ciblant autant que possible une protéine conservée. A ce titre, la protéine **RH5** est étonnamment conservée entre les différentes souches de *P. falciparum*. Par contre, elle est peu immunogène chez l'homme, où l'on ne retrouve que des taux très bas d'anticorps en comparaison aux autres antigènes du mérozoïte. Néanmoins, ces anticorps présentent une activité fonctionnelle d'inhibition de l'invasion des globules rouges (272) les rendant particulièrement intéressants. La protéine RH5 forme un complexe avec les protéines CyRPA (*Cysteine-rich protective antigen*) et Ripr (*RH5-interacting protein*) qui a pour rôle de former un pore entre le mérozoïte et le globule rouge conduisant à un flux calcique dans la cellule hôte avec des modifications du cytosquelette pour permettre l'invasion du parasite. Les résultats du premier essai clinique de phase I ont été publiés en 2017 (273), utilisant un vecteur adénoviral de chimpanzé (ChAd63) et un vecteur viral d'*orthopoxvirus* modifié (MVA) dans une stratégie de *prime-boost*. Cet essai a montré une bonne induction d'IgG. De plus, une concentration moindre d'anticorps que celle obtenue pour les antigènes MSP1 et AMA1 permettait d'induire une inhibition de croissance *in vitro*, encourageant l'utilisation de cet antigène malgré sa faible immunogénicité naturelle.

**Pfs25** est le candidat antigénique *leader* des formes sexuées dans le but d'induire des anticorps ayant pour fonction de bloquer la transmission du parasite (267). C'est une protéine de 25 kDa, fixée à la membrane par une ancre GPI. Elle jouerait un rôle

dans l'adhésion des ookinètes, puis dans l'invasion cellulaire au niveau du tube digestif du moustique. Néanmoins, les essais cliniques réalisés ne sont pas encore convaincants pour l'inclure dans un candidat vaccin multi-stade.

#### d) *Rationnel d'utilisation du vecteur rougeole*

Le vecteur rougeole présente plusieurs avantages soulignant son potentiel comme vecteur viral délivrant des antigènes du paludisme. (i) Tout d'abord, le VacR est un des vaccins les plus efficaces et les plus sûrs induisant une réponse protectrice de longue durée après une seule injection. Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre de l'introduction, l'induction d'une mémoire à long terme contre le transgène n'a été montrée que sur modèle murin et reste encore à démontrer chez l'homme. (ii) La production du VacR est facile à grande échelle et à bas coût, deux points importants pour les pays endémiques du paludisme. (iii) L'immunité cellulaire induite par la rougeole repose majoritairement sur les lymphocytes T CD4, mais une bonne induction des lymphocytes T CD8 contre le transgène a déjà été démontrée (83, 84). Or les deux réponses cellulaires semblent requises pour une bonne efficacité vaccinale au stade pré-érythrocytaire. (iv) Le génome du VacR peut intégrer jusqu'à six kilobases de séquences supplémentaires insérées dans les unités additionnelles de transcription, ce qui autorise l'expression de plusieurs antigènes plasmodiaux dans une formulation vaccinale multi-stade. (v) Contrairement aux vecteurs viraux non réplicatifs, le vecteur rougeole n'est pas impacté par la présence d'une pré-immunité induite par le VR ou le VacR. (vi) Enfin, près de 85% des enfants dans le monde ont reçu en 2016 une dose de vaccin rougeole avant leur premier anniversaire. Un vaccin recombinant rougeole-paludisme pourrait donc aisément s'intégrer dans les différents programmes de vaccination des pays endémiques pour le paludisme, soit dans une stratégie de *prime-boost*, soit comme vaccin unique si son immunogénicité est suffisante. Le développement de schémas vaccinaux courts est également primordial pour la vaccination des militaires avant leur projection en zone d'endémie.

# OBJECTIFS

# OBJECTIFS DE LA THESE

L'objectif premier de mon travail de thèse était de rechercher et caractériser les génomes défectifs interférents (DI-RNAs) produits par les différents virus recombinants de la plateforme vaccinale rougeole, et d'évaluer leurs fonctions immunostimulatrices intrinsèques comme adjuvant naturellement produit par les virus rougeole recombinants. Le second objectif de ce travail était de valider l'utilisation du vecteur rougeole pour le développement de vaccins antipaludiques multi-stade.

- I. Dans une première partie, j'ai recherché, identifié et caractérisé la structure et les fonctions immunostimulatrices des 5' *copy-back* DI-RNAs produits par les différents virus recombinants vectorisés par la rougeole en m'appuyant sur les données connues dans la littérature et identifiées par le laboratoire sur les virus rMV-N (74), rMV- $\Delta$ C (174) et rMV- $\Delta$ V (115).
- II. Dans une seconde partie, j'ai comparé la réplication virale et l'immunogénicité du VacR sur 4 différents modèles murins dans l'objectif d'identifier un modèle pour l'étude du rôle immunostimulateur des DI-RNAs produits par les virus recombinants de rougeole. Ce travail s'est appuyé sur les notions jusqu'ici communément admises de tropisme cellulaire hCD46 et de réponse interféron de type I dans la barrière d'espèce du VacR.
- III. Enfin, la troisième partie de ce travail a été dédiée au développement d'un candidat vaccinal antipaludique vectorisé par la rougeole : (i) une preuve de concept de l'utilisation du vecteur rougeole exprimant l'antigène paludique « *gold standard* » CS sur modèle murin *P. berghei*, puis la CS de *P. falciparum* ; (ii) la vectorisation de deux antigènes, CS du stade pré-érythrocytaire et RH5 du stade érythrocytaire ; (iii) le développement d'une stratégie pour délivrer plusieurs antigènes en se basant sur les résultats obtenus dans la première partie de ce travail.

# RESULTATS



# RESULTATS

## A. Caractérisation des génomes défectifs de la plateforme vaccinale rougeole

### 1. Article 1: les 5' copy-back DI-RNAs produits par les virus rougeole recombinants sont reconnus sous leur forme non-encapsidée par RIG-I et LGP2, mais pas MDA5

*Nonencapsidated 5' Copy-Back Defective Interfering Genomes Produced by Recombinant Measles Viruses Are Recognized by RIG-I and LGP2 but Not MDA5.*

**Marie Mura**, Chantal Combredet, Valérie Najburg, Raul Y. Sanchez David, Frédéric Tangy et Anastassia V. Komarova.

Publié dans JOURNAL OF VIROLOGY, Sept. 2017, 91 (20)

Dans cette étude, nous avons recherché de façon systématique les 5' copy-back DI-RNAs produits par les virus recombinants de la plateforme vaccinale rougeole par une méthode de RT-PCR à partir d'ARN total extrait des lysats cellulaires de cellules Véro, 293T, A549 ou Hela infectées à une MOI de 1. Nous avons tout d'abord analysé les séquences en utilisant divers outils de bioinformatique, puis quantifié les DI-RNAs par RT-qPCR dans le but de mieux les caractériser. Nous avons ensuite étudié les capacités immunostimulatrices des DI-RNAs naturellement présents dans les stocks viraux ou artificiellement synthétisés *in vitro* en analysant leur impact sur la réponse IFN-I. Nous avons pu montrer qu'ils sont de puissants inducteurs d'IFN-I mais que ces propriétés immunostimulatrices sont perdues lorsque l'ARN est encapsidé par la nucléoprotéine. Enfin, en utilisant les lignées cellulaires ST-RLR produites au sein de notre laboratoire (115), qui sont des lignées de cellules HEK293 surexprimant un des trois récepteurs RLRs avec un STrEP-Tag, nous avons pu montrer la liaison spécifique des DI-RNAs avec les récepteurs RIG-I et LGP2, mais pas MDA5.

Ce travail apporte un recueil exhaustif des DI-RNAs produits par la plateforme vaccinale rougeole et leurs caractéristiques principales. Il suggère que les DI-RNAs

jouent le rôle d'adjuvant intrinsèque *via* la reconnaissance spécifique par les récepteurs cytosoliques de l'immunité innée et la stimulation de la voie IFN-I. A l'issue de ce travail, la confirmation du rôle d'adjuvant des DI-RNAs est à démontrer *in vivo*.



# Nonencapsidated 5' Copy-Back Defective Interfering Genomes Produced by Recombinant Measles Viruses Are Recognized by RIG-I and LGP2 but Not MDA5

Marie Mura,<sup>a,b</sup> Chantal Combredet,<sup>a</sup> Valérie Najburg,<sup>a</sup> Raul Y. Sanchez David,<sup>a</sup> Frédéric Tangy,<sup>a</sup>  Anastassia V. Komarova<sup>a</sup>

Unité de Génomique Virale et Vaccination, Institut Pasteur, CNRS UMR-3569, Paris, France<sup>a</sup>; Unité des Biothérapies Anti-Infectieuses et Immunologie, Institut de Recherche Biomédicale des Armées BP73, Brétigny-sur-Orge, France<sup>b</sup>

**ABSTRACT** Attenuated measles virus (MV) is one of the most effective and safe vaccines available, making it an attractive candidate vector for preventing other infectious diseases. Yet the great capacity of this vaccine still needs to be understood at the molecular level. MV vaccine strains have different type I interferon (IFN)-inducing abilities that partially depend on the presence of 5' copy-back defective interfering genomes (DI-RNAs). DI-RNAs are pathogen-associated molecular patterns recognized by RIG-I-like receptors (RLRs) (RIG-I, MDA5, and LGP2) that activate innate immune signaling and shape the adaptive immune response. In this study, we characterized the DI-RNAs produced by various modified recombinant MVs (rMVs), including vaccine candidates, as well as wild-type MV. All tested rMVs produced 5' copy-back DI-RNAs that were different in length and nucleotide sequence but still respected the so-called "rule of six." We correlated the presence of DI-RNAs with a larger stimulation of the IFN- $\beta$  pathway and compared their immunostimulatory potentials. Importantly, we revealed that encapsidation of DI-RNA molecules within the MV nucleocapsid abolished their immunoactive properties. Furthermore, we identified specific interactions of DI-RNAs with both RIG-I and LGP2 but not MDA5. Our results suggest that DI-RNAs produced by rMV vaccine candidates may indeed strengthen their efficiency by triggering RLR signaling.

**IMPORTANCE** Having been administered to hundreds of millions of children, the live attenuated measles virus (MV) vaccine is the safest and most widely used human vaccine, providing high protection with long-term memory. Additionally, recombinant MVs carrying heterologous antigens are promising vectors for new vaccines. The great capacity of this vaccine still needs to be elucidated at the molecular level. Here we document that recombinant MVs produce defective interfering genomes that have high immunostimulatory properties via their binding to RIG-I and LGP2 proteins, both of which are cytosolic nonself RNA sensors of innate immunity. Defective interfering genome production during viral replication should be considered of great importance due to the immunostimulatory properties of these genomes as intrinsic adjuvants produced by the vector that increase recognition by the innate immune system.

**KEYWORDS** measles virus, defective interfering RNA, type I interferon, RIG-I-like receptors, innate immunity

Received 21 April 2017 Accepted 24 July 2017

Accepted manuscript posted online 2 August 2017

**Citation** Mura M, Combredet C, Najburg V, Sanchez David RY, Tangy F, Komarova AV. 2017. Nonencapsidated 5' copy-back defective interfering genomes produced by recombinant measles viruses are recognized by RIG-I and LGP2 but not MDA5. *J Virol* 91:e00643-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00643-17>.

**Editor** Adolfo García-Sastre, Icahn School of Medicine at Mount Sinai

**Copyright** © 2017 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

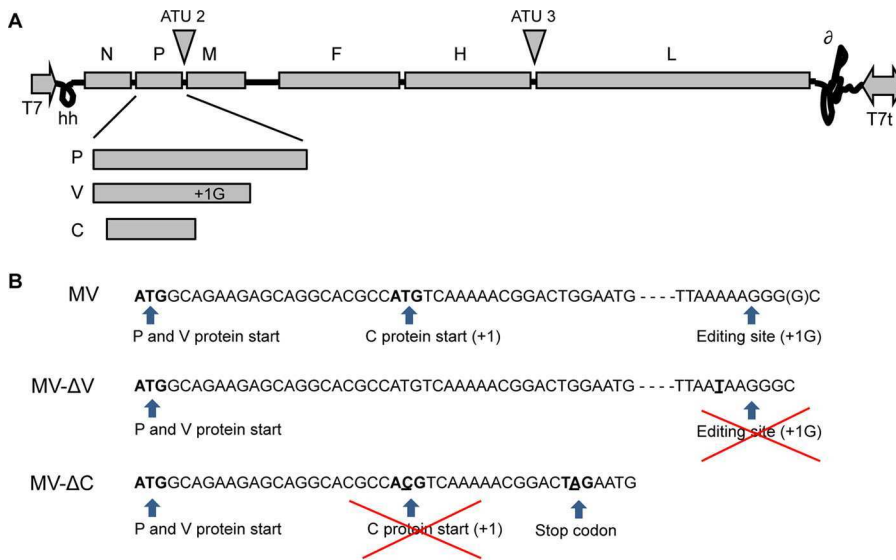
Address correspondence to Frédéric Tangy, frederic.tangy@pasteur.fr, or Anastassia V. Komarova, stasy@pasteur.fr.

Defective interfering (DI) genomes are truncated forms of the viral genome generated by most viruses during viral replication. DI and viral genomes share the minimum essential characteristics for replication: a competent initiation site at the 3' end, its complementary sequence at the 5' end, and a structure or sequence required for encapsidation into a nucleocapsid (1). However, DI genomes are defective for replication in the absence of a complete functional virus genome that provides the missing functions. DI genomes, and more precisely the 5' copy-back DI genomes (DI-RNAs), are well described for paramyxoviruses. Specific DI-RNAs are produced when the viral polymerase, due to a yet unknown mechanism, detaches from the template and reattaches itself to copy back the 5' end of the genome (reviewed in references 1 to 3).

Paramyxoviruses, like other members of the order *Mononegavirales*, possess non-segmented single-stranded negative-sense RNA genomes, with virus replication set in the cytoplasm. The RNA genomes of viruses of the *Paramyxoviridae* encode six structural proteins. The hemagglutinin (H) and fusion (F) proteins are transmembrane glycoproteins that are part of the viral envelope. The nucleoprotein (N), the phosphoprotein (P), and the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp, or L) assemble into ribonucleoprotein complexes (RNPs) that ensure viral genome transcription and replication in the cytoplasm of infected cells. Replication of these viruses is coupled to encapsidation so that full-length antigenomes and genomes are found only inside assembled nucleocapsids (4). The nonglycosylated matrix protein (M) forms the inner layer of the viral envelope, recruiting assembled RNPs underneath the cellular membrane, and is involved in the budding of viral particles. In addition to the structural proteins, the P genes of paramyxoviruses encode nonstructural, genus-specific virulence factors. For measles virus (MV), these are the C and V proteins (Fig. 1A), whose expression is achieved by site-specific editing of the P mRNA by the viral RdRp to produce V protein and by the initiation of translation from the overlapping open reading frame (ORF) on the P mRNA to produce the C protein (5, 6).

5' copy-back DI-RNAs of paramyxoviruses have been shown to induce type I interferon (IFN-I) signaling due to their structural characteristics, i.e., a double-stranded stem with perfectly complementary blunt ends and a 5' triphosphate extremity (7–10). These RNA molecules activate innate signaling through cytosolic RIG-I-like receptors (RLRs). Thus far, 5' copy-back DI genomes have been described as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) for RIG-I (11–13) and MDA5 (12). Whether LGP2, which is the third known RLR, can also specifically interact with 5' copy-back DI genomes is not known. Furthermore, RIG-I-dependent IFN- $\beta$  signaling mediated by 5' copy-back DI genomes is enhanced in the presence of IFN-inducible double-stranded RNA (dsRNA)-dependent protein kinase activator A (PACT), which also binds the DI-RNA (14). Additionally, accumulation of DI-RNAs triggers double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) activation, which generates a cellular stress response resulting in translational arrest and formation of stress granules (15). However, the underlying mechanisms for how 5' copy-back DI genomes provide their dsRNA the potential to activate type I IFN signaling remain to be elucidated, since their synthesis is coupled to their assembly into nucleocapsids.

DI genomes have also been identified in human infections with influenza virus (16), dengue virus (17), hepatitis C virus (18), and (more recently) respiratory syncytial virus (RSV), another paramyxovirus (19). Interestingly, the rate of accumulation of DI genomes during infection with RSV has been correlated with the quality of the antiviral response. Indeed, early accumulation of DI genomes is a good prognostic for viral clearance and full disease recovery (19). For MV, 5' copy-back DI genomes have not yet been documented *in vivo* during natural infection (20). It is well known that viral stocks of standard live attenuated vaccines are variable producers of DI genomes (8, 20–22). Measles vaccine strains have shown different abilities to induce type I IFN, depending on the presence of 5' copy-back DI-RNAs (8). The mechanism of viral attenuation and the resultant efficacy of live attenuated vaccines are not yet fully understood, but it is now clear that a robust adaptive immunity is induced by triggering innate immune



**FIG 1** Representation of rMV-ΔV and rMV-ΔC cloning. (A) Schematic diagram of the MV genome and gene order showing that the P gene encodes the P, V, and C proteins. Sites used for insertion of additional transcription units (ATUs) within the MV genome are represented. (B) Portion of the nucleotide sequence of the P gene from MV (Schwarz strain; GenBank accession no. AF266291.1). For MV-ΔV construction, the editing site was mutated by replacing the adenine at position 2493 of the MV genome with uracil. For MV-ΔC, the start codon was mutated by replacing the uracil at position 1830 with cytosine, and a stop codon was introduced by replacing the guanine at position 1845 with adenine (the introduced nucleotides are underlined).

system signaling (23). The attenuated MV-Schwarz vaccine strain that is routinely used is a poor producer of DI genomes. In cell cultures, production of DI-RNAs depends on the multiplicity of infection (MOI) and the number of cell passages (8, 10, 24). However, several modifications of the MV genome lead to efficient DI-RNA production by modified strains, giving a recombinant MV (rMV) expressing an additional copy of MV-N (rMV-N) (10), as well as rMV-ΔC (24) and rMV-ΔV (13), lacking the expression of two virulence factors, i.e., the C and V proteins, respectively (Fig. 1B).

Recombinant MV is a promising vaccine vector for delivery of heterologous antigens (25). Indeed, a recent human trial of an rMV-chikungunya vaccine candidate demonstrated that measles preimmunity in volunteers did not interfere with acquisition of strong functional antibodies to the chikungunya virus heterologous pathogen (26). It now needs to be evaluated if such a capacity of rMV to provide strong functional immunity might be explained by an increased production of DI-RNAs compared to that of the backbone MV-Schwarz strain. This would suggest an additional intrinsic immunostimulatory advantage for rMV-based vaccines. In this study, we characterized the 5' copy-back DI-RNAs produced by recombinant MV strains, including rMV-based vaccines, and by wild-type MV (wt-MV), and we compared the production efficiencies of these DI-RNAs in different cell types. For the first time, the specific binding of 5' copy-back DI-RNAs to RIG-I, MDA5, and LGP2 was assessed and linked to type I IFN signaling of encapsidated or nonencapsidated DI genomes.

**RESULTS**

**Various 5' copy-back DI-RNAs are produced by modified recombinant MVs.** Production of 5' copy-back DI genomes has previously been shown in separate independent studies for three modified rMVs: rMV-N (10), rMV-ΔV (13), and rMV-ΔC (24). To investigate the differential composition of 5' copy-back DI-RNAs produced by rMV-N, rMV-ΔV, and rMV-ΔC in parallel under the same experimental conditions, we applied a unique reverse transcription-PCR (RT-PCR) protocol to molecularly characterize these RNAs in four different cell types. rMVs were generated using the same reverse genetics system as that used for MV-Schwarz, from which rMVs are derived (27). DI

genomes were detected by RT-PCR by use of two primers, both of negative polarity in accordance with the full-length MV genome, so that only 5' copy-back DI-RNAs could be amplified (Fig. 2A; Table 1). The presence of DI genomes was assessed in the total RNAs purified at 24 h postinfection for Vero, A549, 293T, and HeLa cells infected at an MOI of 1. As expected, we observed that various DI-RNAs were produced upon infection with modified rMVs but not with the control MV-Schwarz strain (Fig. 2B). Nevertheless, after several passages (P) on Vero cells at an MOI of 0.1, we observed an amplified production of DI-RNAs starting from P5 (Fig. 2C). Importantly, no mutation was detected after sequencing of the full-length viral genome of the MV-Schwarz P8 viral stock.

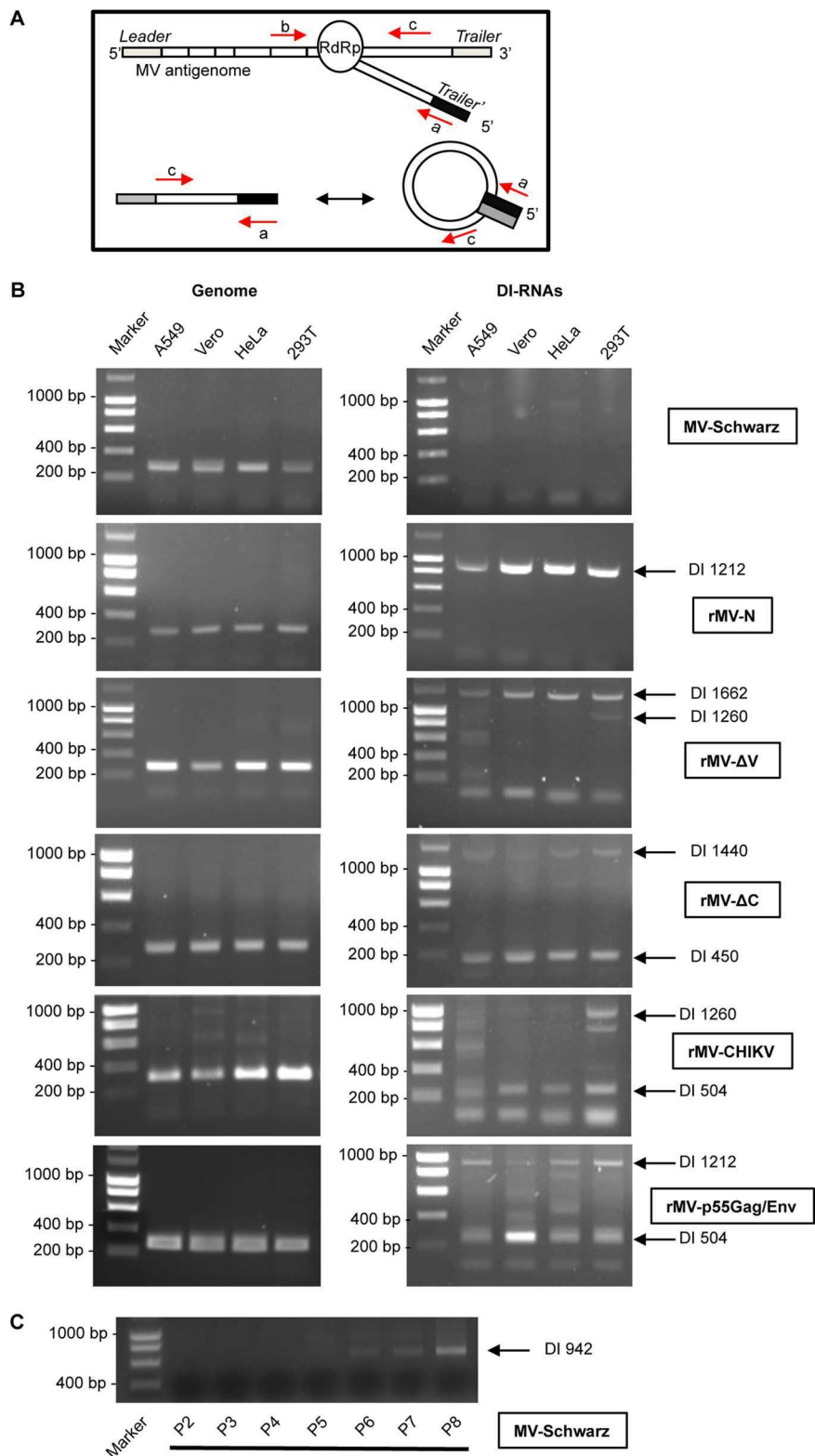
We further performed molecular characterization of various 5' copy-back DI-RNAs produced upon infection with rMV-N, rMV- $\Delta$ V, and rMV- $\Delta$ C. The cDNA molecules encompassing the corresponding DI genome fragments were extracted from agarose gels, cloned, amplified, and sequenced, and the sequences were aligned with the MV-Schwarz sequence. The known structure of 5' copy-back DI genomes allowed deduction of the entire sequence of the DI-RNA from the amplified cDNA. Table 2 summarizes important points that define each 5' copy-back DI-RNA: the breakpoint site corresponds to the last nucleotide incorporated by the RdRp before it leaves the template antigenome strand, and the reinitiation site corresponds to the first nucleotide where the polymerase begins the synthesis of a cRNA strand of opposite polarity. We validated that rMV-N produced a single population of 1,212-nucleotide (nt) DI-RNAs (10). rMV- $\Delta$ V produced two DI-RNAs, of 1,662 and 1,260 nt, and rMV- $\Delta$ C also produced two DI-RNAs, of 450 and 1,440 nt. We observed that all rMVs produced a predominant DI-RNA that was found in the four different cell types (Fig. 2B) but could also produce other minor DI-RNAs depending on the cell type (for instance, a 1,260-nt DI-RNA in 293T cells for rMV- $\Delta$ V).

All identified 5' copy-back DI-RNAs produced by the different tested rMVs differed in size for both the loop and stem, but they all respected the so-called "rule of six" postulating that, for the paramyxovirus subfamily *Paramyxovirinae*, only hexameric-length genomes are replicated efficiently (28).

**Recombinant MVs expressing heterologous antigens are efficient producers of 5' copy-back DI-RNAs.** We investigated whether addition of genetic material into the MV genome has an impact on the production of DI genomes. In a previous study, rMVs expressing the green fluorescent protein (GFP) gene from an additional transcription unit in the viral genome were poor producers of DI genomes and behaved similarly to the parental virus (15). In contrast, we demonstrated that our viral stocks of rMV-GFP and rMV-CH (expressing Cherry red fluorescent protein) contained DI-RNAs of 402 and 978 nt, respectively (Table 2).

We further examined whether rMVs expressing heterologous antigens could produce DI genomes in different cell lines. A549, Vero, HeLa, and 293T cells were infected with either rMV-CHIKV, expressing the structural proteins of chikungunya virus (E1, E2, E3, C, and 6K) (29), or rMV-p55Gag/Env, expressing the HIV-1 p55Gag polyprotein and Env $\Delta$ V1V2 envelope glycoprotein (30). Total RNAs were extracted, and DI-RNAs were detected by RT-PCR using two DI genome-specific primers (Table 1). The production of 5' copy-back DI genomes was observed in cells infected by both recombinant viruses (Fig. 2B). We then performed molecular characterization of their DI genomes. While rMV-CHIKV produced two different 5' copy-back DI genomes, of 1,260 and 504 nt, rMV-p55Gag/Env produced two different DI-RNAs, of 1,212 and 504 nt (Table 2; Fig. 2B). Interestingly, the 1,212-nt DI-RNA produced by rMV-p55Gag/Env corresponded perfectly to the unique DI-RNA detected in cells infected with rMV-N, whereas the 504-nt DI genome made by the same virus differed in sequence from the 504-nt DI-RNAs of rMV-CHIKV.

Therefore, we identified that all tested rMVs expressing heterologous genes produced various 5' copy-back DI-RNAs. All these DI-RNAs respected the "rule of six" (Table 2).



**FIG 2** Detection of DI-RNAs produced by rMVs. (A) Schematic representation of 5' copy-back DI-RNA generation by the viral polymerase (RdRp). Primers used for PCR are represented for the genome (primers a and b) and DI-RNAs (primers a and c). (B) Total RNAs were extracted 24 h after infection with MV-Schwarz, rMV-N, rMV-ΔV, rMV-ΔC, rMV-CHIKV, and rMVp55Gag/Env at an MOI of 1. DI-RNAs and genomes in four different cell types (A549, Vero, HeLa, and 293T) were detected by RT-PCR. (C) DI-RNAs were detected by RT-PCR on total RNAs extracted 24 h after infection with MV-Schwarz strains that were obtained after 2 to 8 passages on Vero cells at an MOI of 0.1.

**TABLE 1** Primers and probes used in this study

Primer or probe	Targeted RNA	Sequence (5'–3') <sup>a</sup>	Reference
RT-PCR primers			
A2 (a)		AAAGCTGGGAATAGAACTTCG	15
JM 402 (b)		TTTATCCAGAATCTCAATCCGG	8
JM 403 (c)		CGAAGATATTCTGGTGAAGTCTAGTA	8
RT-qPCR primers and probes			
Forward primer	Measles virus genome	TCAGGCATACCCACTAGTGTGAA	
Reverse primer		TGACAGATAGCGAGTCCATAACG	
TaqMan probe (reporter dye)		CATCAGAATTAAGAAAAACGTAG (VIC)	
Forward primer	$\beta$ -Actin	ACCGAGCGCGGTACAG	
Reverse primer		CCTAATGTCACGCACGATTTC	
TaqMan probe (reporter dye)		CACCACCACGGCCGA (FAM)	
Forward primer	504-nt DI-RNA	CGGAGTTCACCAATTAGTCCTTAA	
Reverse primer		TGTGCCCCCAGAATTTGC	
TaqMan probe (reporter dye)		CAGGCACTATCTAGG (FAM)	
Forward primer	1,212-nt DI-RNA	TTGCAAATAATGCCTAACACCTA	
Reverse primer		ACACTGCCTACCCACGTGACT	
TaqMan probe (reporter dye)		CAGGATTAGGGTCCGGG (FAM)	
Forward primer	1,662-nt DI-RNA	TTACCTTAAAAACCCACTCAGTGT	
Reverse primer		AGATTGCCCCCTGAAATGG	
TaqMan probe (reporter dye)		AACACAAGCAAGCACA (FAM)	
Forward primer	450-nt DI-RNA	TTATCAACTTTTTGTTCCCGGAGTA	
Reverse primer		ACCACCTAGGGCAGGATTAGG	
TaqMan probe (reporter dye)		AGATAATTGGTTGAACTCCGGAA (FAM)	
Forward primer	942-nt DI-RNA	GAGATGAAGTTGCTGTATCTAGGG	
Reverse primer		AATGCCTAACCCACTAGGGCAGG	
TaqMan probe (reporter dye)		TGAACTCCGGAACCC (FAM)	

<sup>a</sup>VIC, 4,7,2'-trichloro-7-phenyl-6-carboxyfluorescein; FAM, 6-carboxyfluorescein.

### Production of various DI genomes is an intrinsic feature of MV infection. To

investigate whether the difference in DI genome composition depends on the type of genetic modification introduced into the viral genome or on the rescue itself, we characterized DI genomes produced by different stocks of rMV- $\Delta$ C, rMV-N, and rMV-CHIKV viruses obtained from different rescues. We observed that the sequence pattern

**TABLE 2** Characterization of DI-RNAs produced by different rMVs

Virus	Rescue	DI-RNA length (nt)	Breakpoint site <sup>a</sup>	Reinitiation site <sup>a</sup>	ssRNA loop length (nt)	dsRNA stem length (nt)	Insertion/deletion	Mutation	Rule of six
MV-Schwarz	a								
MV-Schwarz P8 <sup>b</sup>	a	942	15,065	15,783	718	112			157 × 6
rMV-N	a	1,212	14,781	15,797	1,016	98			202 × 6
	b	1,140	14,895	15,755	860	140			190 × 6
rMV- $\Delta$ V	a	1,662	14,428	15,696	1,264	199			277 × 6
	a	1,260	14,793	15,737	938	161			210 × 6
	b (13)	1,236	14,861	15,694	834	201	+1 (A)		206 × 6
rMV- $\Delta$ C	a	1,440	14,648	15,702	1,054	193			240 × 6
	a	450	15,557	15,783	226	112			75 × 6
	b	2,094	13,948	15,748	1,800	147			349 × 6
	b	1,032	15,046	15,712	666	183		A → G (36/286 A's [in loop])	172 × 6
	b	696	15,302	15,792	490	103			116 × 6
	c	1,218	14,839	15,733	894	162			203 × 6
	c	636	15,351	15,803	452	92			106 × 6
rMV-GFP	a	402	15,591	15,797	206	98			67 × 6
rMV-CH	a	978	15,062	15,750	688	145			163 × 6
rMV-CHIKV	a	504	15,521	15,765	244	130			84 × 6
	a	1,260	14,793	15,737	938	161			210 × 6
	b	462	15,530	15,798	268	97			77 × 6
rMV-p55Gag/Env	a	504	15,542	15,744	202	151			84 × 6
	a	1,212	14,781	15,797	1,016	98			202 × 6
Wild type		1,212	14,781	15,797	1,016	98			202 × 6

<sup>a</sup>Nucleotide positions of breakpoints and reinitiation sites are aligned to the reference sequence for the Schwarz vaccine virus (GenBank accession no. AF266291.1).

<sup>b</sup>MV-Schwarz P8 was obtained after 8 passages on Vero cells at an MOI of 0.1.



of DI genomes was different for each rescue (rescues a, b, and c) (Table 2). Indeed, previous studies showed that DI-RNAs were produced very early after the rescue and that this initial sequence pattern defined the DI genome pattern of each viral stock (24). To ensure that these DI-RNAs were not generated by the rescue system, we amplified a wt-MV isolate from a patient sample on Vero/hSLAM cells permissive to wt-MV. We next infected Vero/hSLAM cells with wt-MV at an MOI of 1 and assessed the presence of 5' copy-back DI genomes by RT-PCR. As a result, we identified a 1,212-nt DI-RNA with the same breakpoint and reinitiation sites as those of DI-RNAs produced by rMV-N and rMV-dbp55Gag/Env but containing differences in nucleotide sequence corresponding to the wt-MV sequence (Table 2) (see Materials and Methods).

These results validate that DI genome production is an intrinsic feature of MV infection and that viruses with exactly the same genomic sequence but obtained from different rescues can produce distinct 5' copy-back DI genomes.

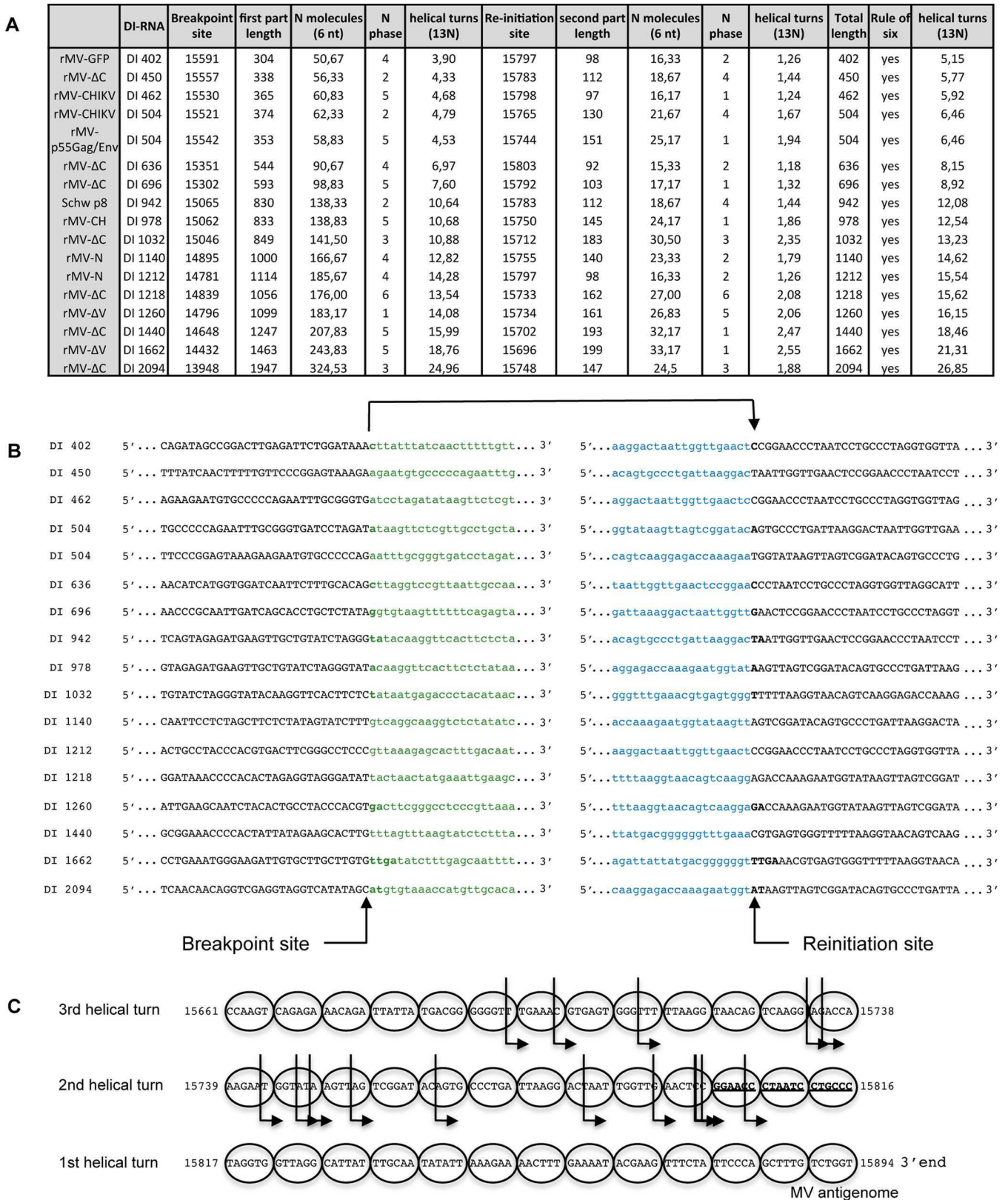
**RNP and RNA structure analysis of DI-RNA- and DI genome-forming regions.** To understand how DI genomes are generated by the viral polymerase, we determined the positions of breakpoint/reinitiation sites within the MV RNP, the primary and secondary RNA structures within these regions, and their GC compositions.

Within the MV RNP, each nucleoprotein encapsidates exactly 6 nucleotides, and each helical turn encompasses 13 nucleoproteins. We observed that all DI genomes found in this study respected the rule of six necessary for efficient encapsidation (Table 2). First, we analyzed the positions of breakpoint and reinitiation sites in accordance with the phase of N encapsidation or the phase of the RNP helical turn (Fig. 3). The breakpoint and reinitiation sites were observed in the six different positions of nucleotides covered by nucleoprotein encapsidation (Fig. 3A, N phase). No similarities for the positioning of breakpoint and reinitiation sites within the viral RNP complex were observed (Fig. 3A to C, helical turns).

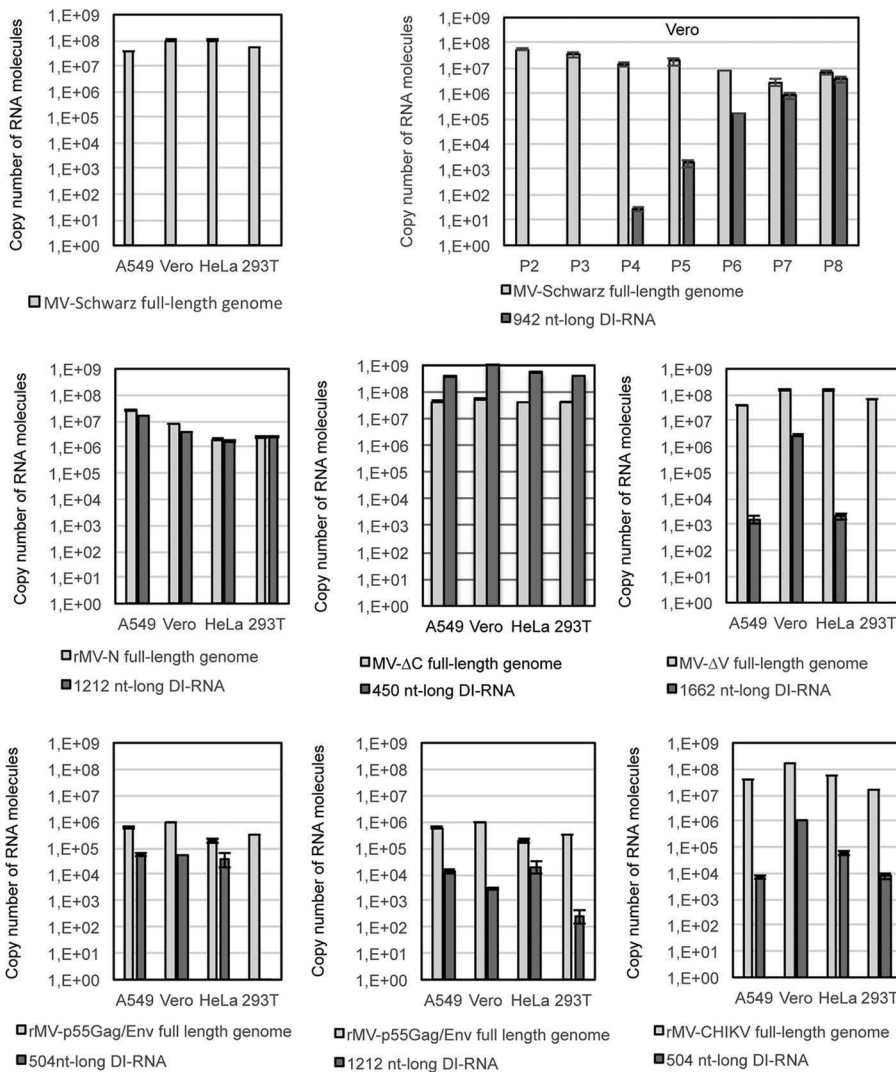
By applying different bioinformatics tools, we studied RNA sequence motifs that could explain DI genome generation by the viral polymerase. We used weblogo and MUSCLE (multiple-sequence comparison by log expectation) software for multiple-sequence alignment analysis of 50-nt RNA fragments encompassing RNA sequences before or after breakpoint and reinitiation sites. However, we failed to find any conserved sequence or repeated motifs (data not shown). Further, using the mFold algorithm (mFold Web server), we performed *in silico* analysis of the potential to form RNA secondary structures within 50-nt RNA fragments corresponding to the sequences before and after breakpoint and reinitiation sites. In some DI genomes (402-, 504-, 1,140-, and 1,212-nt DI-RNAs), we found hairpin structures just after the breakpoint sites, but this was not observed for all DI-RNAs under study (data not shown). The measles virus GC ratio was also analyzed to see if a high GC content could slow down the polymerase and favor its detachment. However, we observed no significant and conserved change of GC content at breakpoint sites.

Thus, neither RNP folding nor specific RNA motifs or secondary structure within the breakpoint and reinitiation sites could explain DI genome generation by the viral polymerase.

**Efficiency of DI genome production varies for different rMVs.** DI genomes are designated "defective interfering" because they interfere with infectious virus replication (31). To assess the interference capacity of the DI genomes, we compared the numbers of full-length and DI genomes produced by five recombinant viruses, namely, rMV-N, rMV-ΔV, rMV-ΔC, rMV-CHIKV, and rMV-dbp55Gag/Env, by using quantitative RT-PCR (RT-qPCR). A549, Vero, HeLa, and HEK-293T cells were infected at an MOI of 1, and total RNA was purified from infected cells at 24 h postinfection. Absolute quantification was performed using serial dilutions of *in vitro*-transcribed (IVT) specific DI-RNAs or an MV full-length genomic RNA fragment. MV-Schwarz was used as an "empty of DI-RNA MV" control. The absolute quantification of MV-Schwarz full-length genomes in the four different cell lines reached the same level, about  $1 \times 10^8$  copies of RNA molecules, thus providing a "gold standard" for MV replication efficiency (Fig. 4).



**FIG 3** Analysis of DI-RNA sequences. (A) Characteristics of breakpoint sites and reinitiation sites for each DI-RNA. (B) Sequences encompassing breakpoint sites and reinitiation sites. (C) Graphic representation of reinitiation sites. Each nucleoprotein encapsidates 6 nucleotides and is represented by a circle. Each row corresponds to a helical turn encompassing 13 nucleoproteins. The B box sequence is represented in bold and underlined. The different reinitiation sites are represented by arrows. Reinitiation sites that are represented more than once are shown in bold.



**FIG 4** Absolute quantification of genomes and DI-RNAs for MV-Schwarz, rMV-N, rMV-ΔC, rMV-ΔV, rMV-p55Gag/Env, and rMV-CHIKV in four different cell lines and for MV-Schwarz after 2 to 8 passages on Vero cells (P2 to P8). Total RNAs (400 ng) purified from the different cell types (A549, Vero, HeLa, and 293T) at 24 h postinfection were analyzed by RT-qPCR. Absolute quantification was performed using serial dilutions of *in vitro*-transcribed MV DI-RNAs or an MV genome RNA fragment. Results are indicated in copy numbers of RNA molecules. Samples were tested in triplicate, and data represent means and standard deviations (SD).

Interestingly, we observed that the level of full-length genomes produced by MV-Schwarz along 8 passages on Vero cells decreased with the amplification of the 942-nt DI-RNAs (Fig. 4). The ratio of DI genomes to full-length viral genomes varied greatly for each rMV (Fig. 4). We observed the following four situations: (i) there was a lack of detectable DI genome production (MV-Schwarz), (ii) DI genome production was as efficient as that of the full-length genome (rMV-N), (iii) DI genome production was more efficient than that of the full-length genome (rMV-ΔC), and (iv) DI genome production was less efficient than that of the full-length genome (rMV-ΔV, rMV-dbp55Gag/Env, and rMV-CHIKV). Furthermore, the level of DI genomes also differed in different cell types. In most cases, Vero cells, which are interferon deficient (32), were more permissive for DI-RNA production (Fig. 4). However, we failed to quantify some minor DI genomes by RT-qPCR (1,260-nt DI-RNAs of rMV-ΔV and rMV-CHIKV), probably due to their low levels of production. Only rMV-p55Gag/Env produced fewer full-length genomes than all other recombinant viruses and the “gold standard” MV-Schwarz strain.

Thus, the high levels of DI genomes produced by the different rMVs did not necessarily interfere with full-length genome replication.

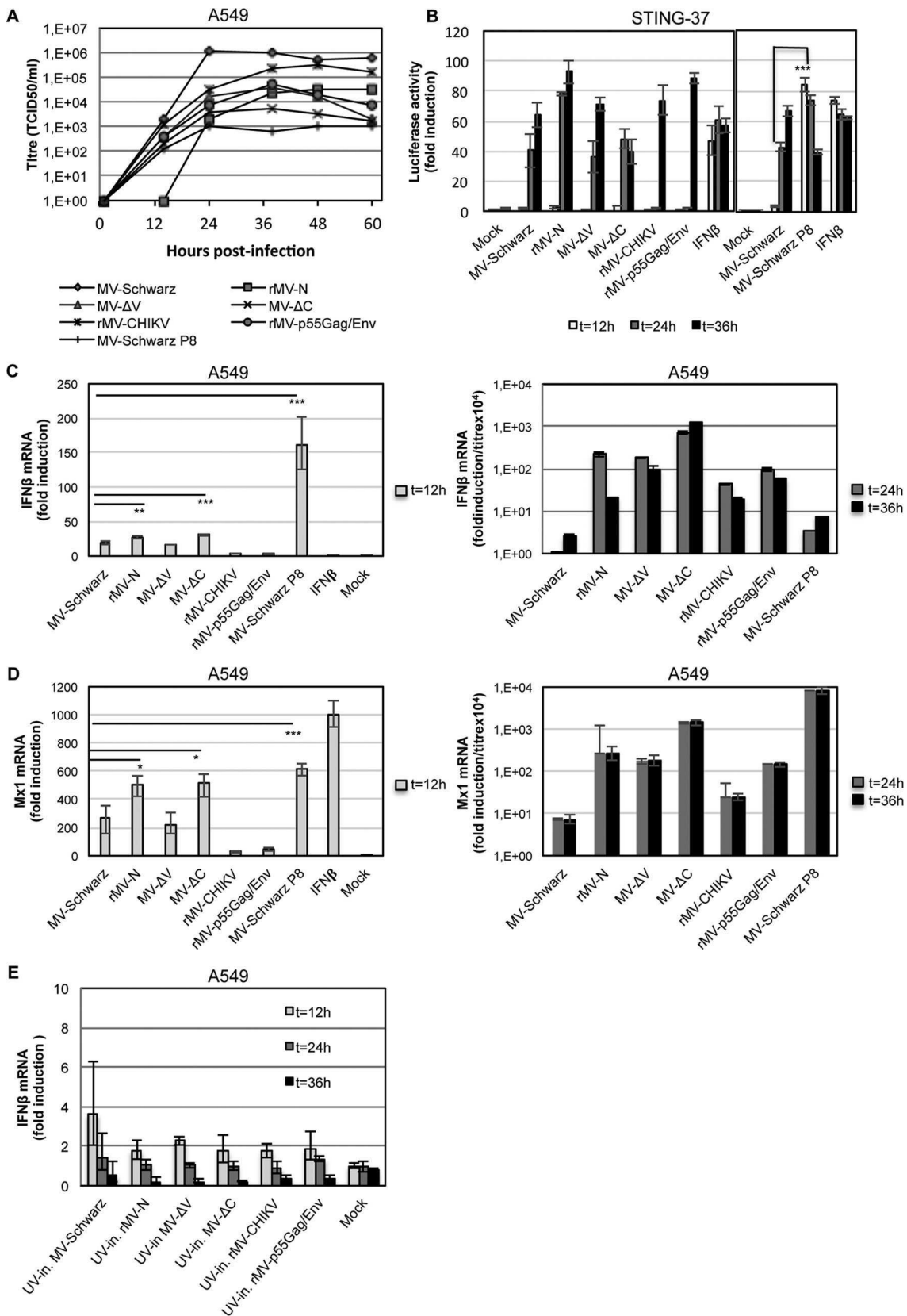
**rMVs are strong inducers of the type I IFN signaling pathway.** We evaluated the ability of rMVs to induce type I IFN signaling in comparison to that of the parental MV-Schwarz strain under the same experimental conditions. First, we assessed the growth kinetics of MV-Schwarz, rMV-N, rMV- $\Delta$ V, rMV- $\Delta$ C, rMV-CHIKV, rMV-p55Gag/Env, and MV-Schwarz P8. A549 cells were infected with the five rMVs and the MV-Schwarz control strain at an MOI of 1, and titration was performed at six different time points. We observed that all rMVs and MV-Schwarz P8 grew more slowly than the parental MV-Schwarz strain, with final viral titers varying from  $1 \times 10^3$  to  $1 \times 10^6$  50% tissue culture infective doses (TCID<sub>50</sub>)/ml (Fig. 5A). Then, to assess the immunostimulatory activity induced by rMVs, we used two different approaches: (i) measuring the type I IFN-stimulatory activity of rMVs at the protein level by using STING-37 cells, which stably express the luciferase gene under the control of a promoter sequence containing five IFN-stimulated response elements (ISRE) (33); and (ii) determining the transcription of IFN- $\beta$  and Mx1, an interferon-stimulated gene (ISG).

STING-37 cells were infected with the different rMVs and then lysed at 12, 24, and 36 h postinfection. All rMVs, including the parental MV-Schwarz strain, appeared to be strong IFN inducers starting from 24 h postinfection (Fig. 5B). Only MV-Schwarz P8 induced a fast and high ISRE response at 12 h postinfection (*t* test;  $P < 0.001$ ). Interestingly, for rMV-CHIKV and rMV-p55Gag/Env, which are vaccine candidates, even if the ISRE activation by IFN- $\beta$  was observed at a later time point of infection, it was almost as strong as that of rMV-N and rMV- $\Delta$ V.

To measure the potential to induce a type I IFN response, A549 cells were infected with the different rMVs and lysed at 12, 24, and 36 h postinfection, and total RNA was extracted. IFN- $\beta$  and Mx1 mRNA levels were analyzed by RT-qPCR (Fig. 5C and D). We observed similar profiles for the IFN- $\beta$  and Mx1 responses: (i) MV-Schwarz P8 (*t* test;  $P < 0.001$  for IFN- $\beta$  and Mx1), rMV-N (*t* test;  $P < 0.01$  for IFN- $\beta$  and  $P < 0.05$  for Mx1), and rMV- $\Delta$ C (*t* test;  $P < 0.001$  for IFN- $\beta$  and  $P < 0.05$  for Mx1), which produced high levels of DI-RNAs, induced early increases of IFN- $\beta$  and Mx1 mRNA production at 12 h postinfection (Fig. 5C and D, left panels); and (ii) at 24 and 36 h postinfection, all infected cells produced high levels of IFN- $\beta$  and Mx1 mRNAs compared to those in noninfected cells. To compare the immunostimulatory properties of the different viruses at 24 and 36 h postinfection, we normalized the results to the viral titers and demonstrated that all rMVs induced more production of IFN- $\beta$  mRNA than that of the parental Schwarz virus (Fig. 5C and D, right panels). In parallel, the same protocol was applied to UV-inactivated viruses. UV treatment abrogates virus replication, preventing the accumulation of DI genomes within the cytoplasm of infected cells. As a result, we observed no induction of IFN- $\beta$  mRNA production upon infection with UV-irradiated recombinant viruses (Fig. 5E).

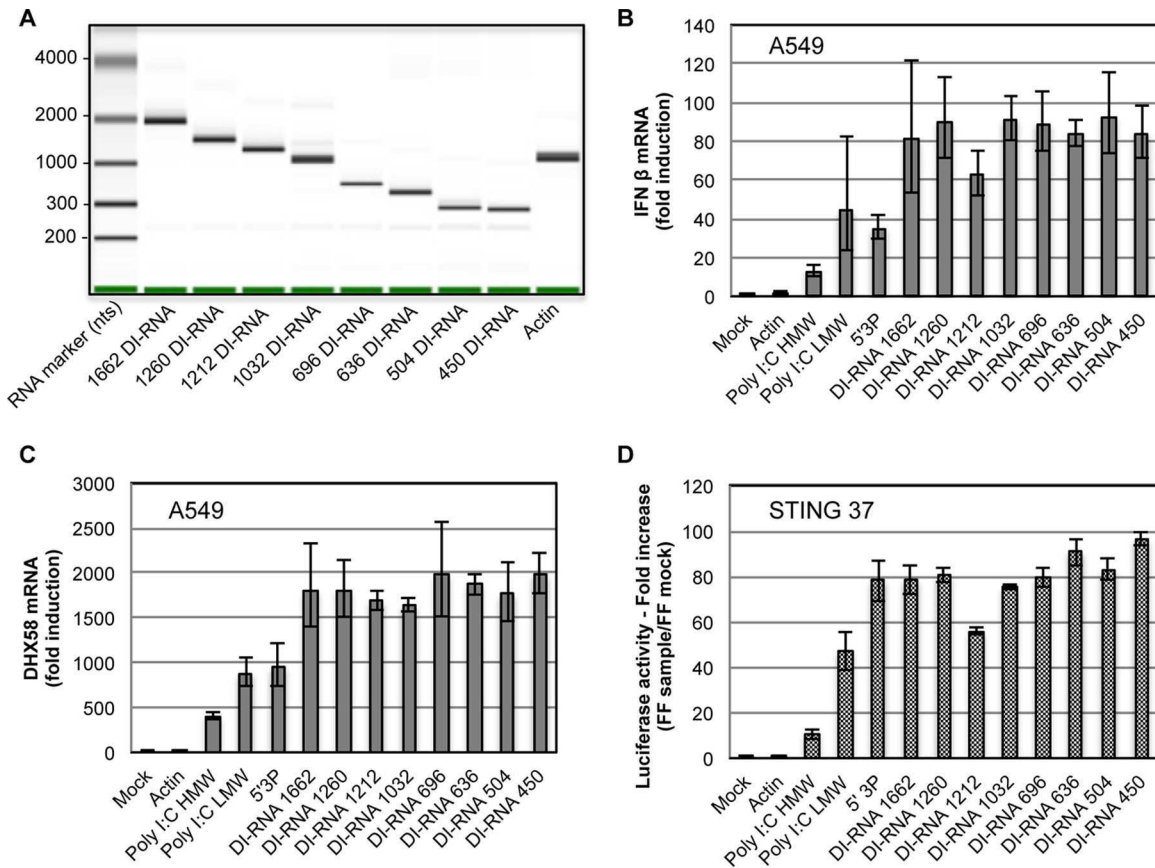
Altogether, these results show that DI-RNAs produced by MV during replication have a strong capacity to stimulate the type I IFN signaling pathway and at least partly reduce viral growth.

**Efficient type I IFN signaling is independent of DI-RNA size or sequence but is lost upon DI-RNA encapsidation into MV nucleocapsids.** To compare levels of type I IFN activation by the different DI-RNAs identified in this study (Table 2), DI-RNAs were synthesized by *in vitro* transcription and transfected into STING-37 or A549 cells. We analyzed eight IVT DI-RNAs that were different in size and sequence, i.e., 1,662-, 1,260-, 1,212-, 1,032-, 696-, 636-, 504-, and 450-nt DI-RNAs (Fig. 6A; Table 2).  $\beta$ -Actin RNA was used as a negative control, and three classical RLR PAMPs were used as positive controls, namely, poly(I:C) of high molecular weight (HMW) or low molecular weight (LMW) and 5' triphosphate RNA (5'3P). IFN transcription efficiency in A549 cells was assessed by RT-qPCR analysis of IFN- $\beta$  mRNA (Fig. 6B) and DHX58 mRNA, a human ISG (Fig. 6C). In parallel, the efficiency of type I IFN signaling was assessed using an ISRE-luciferase reporter assay (Fig. 6D). We observed that all eight IVT DI-RNAs effi-



**FIG 5** Evaluation of type I IFN response to rMVs. (A) Growth curves for MV-Schwarz, rMV-N, rMV-ΔV, rMV-ΔC, rMV-CHIKV, rMV-p55Gag/Env, and MV-Schwarz P8 for 60 h after infection of A549 cells at an MOI of 1. Titers are indicated in TCID<sub>50</sub> per milliliter. (B) Luciferase reporter activities at 12, 24, and 36 h postinfection for STING-37 cells (33) infected with various rMVs at an MOI of 1. IFN-β at 300 IU/ml was used as a positive control, and noninfected cells (mock) were used as a negative control. Fold induction of IFN-β mRNA (C) and

(Continued on next page)



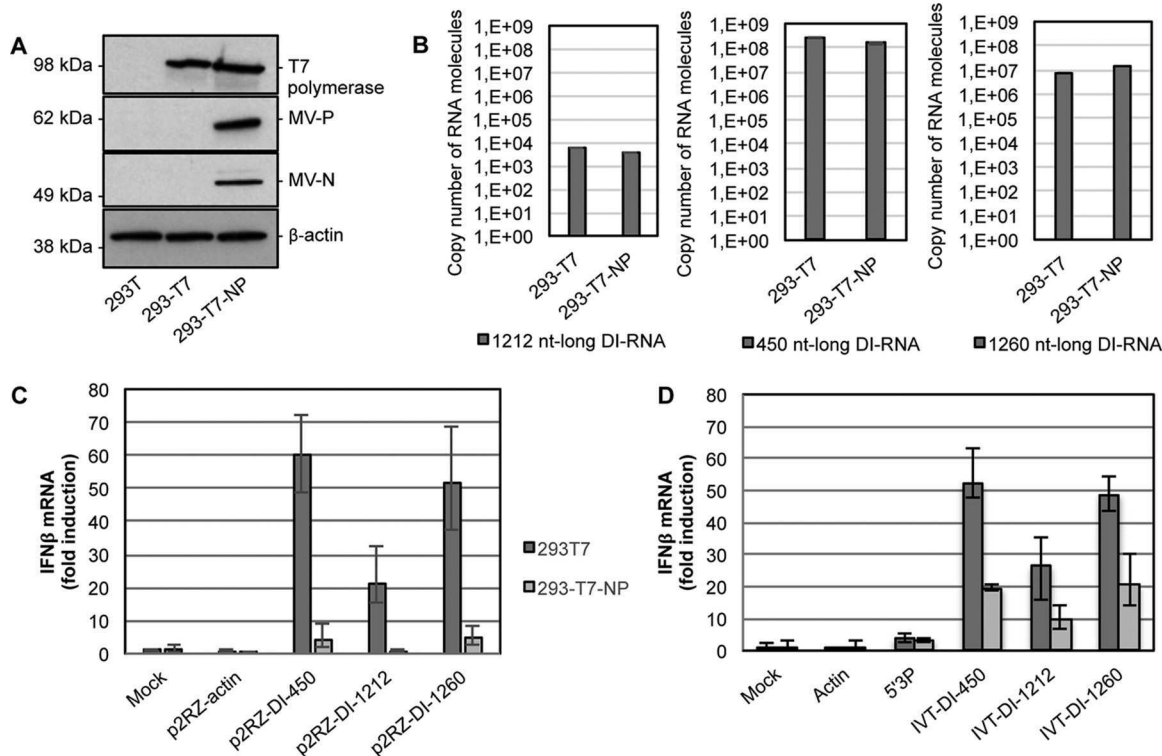
**FIG 6** Type I IFN response to DI-RNAs. (A) Results of IVT DI-RNA and actin RNA analysis on an Agilent bioanalyzer. (B to D) STING-37 and A549 cells were transfected with 10 ng of one of eight IVT DI-RNAs of different lengths, actin RNA, HMW poly(I:C), LMW poly(I:C), or 5'3P and lysed at 24 h posttransfection. The graphs show IFN- $\beta$  mRNA (B) and DHX58 mRNA (C) expression profiles in A549 cells and luciferase reporter activities in STING-37 cells (D). Data were normalized to GAPDH and compared to those for mock-transfected cells. Experiments were performed two times, and the upper and lower 95% confidence intervals are shown as error bars for technical triplicates of the most representative experiment. FF, firefly luciferase activity.

ciently activated the type I IFN pathway, with few differences between them, independently of their size or sequence.

To investigate whether DI-RNAs encapsidated within MV nucleocapsids were as efficient at stimulating type I IFN as nonencapsidated DI-RNAs, we used the HEK293-T7 and HEK293-T7-NP cell lines, both of which stably expressed T7 RNA polymerase (Fig. 7A), but only HEK293-T7-NP cells also produced the MV N and P proteins. HEK293-T7 and HEK293-T7-NP cells were transfected with p2RZ vectors expressing the 1,212-nt DI-RNA (p2RZ-DI1212), the 450-nt DI-RNA (p2RZ-DI450), the 1,260-nt DI-RNA (p2RZ-DI1260), or a 1,212-nt fragment of actin mRNA (p2RZ-actin). The p2RZ plasmid allows the production of RNA transcripts under the control of the T7 polymerase promoter sequence and possesses a 3'-end *cis*-acting ribozyme of hepatitis delta virus (HDV) for direct transcriptional processing to precisely define the RNA transcript 3' end. Upon transfection with the p2RZ-DI1212, p2RZ-DI450, and p2RZ-DI1260 vectors, both cell lines produced similar quantities of DI-RNAs (Fig. 7B). However, only HEK293-T7 cells

#### FIG 5 Legend (Continued)

Mx1 mRNA (D) was determined 12, 24, and 36 h after infection of A549 cells at an MOI of 1. Quantification of mRNA was done using GAPDH as the reference gene and the relative qPCR gene expression protocol. *t* test results are represented as follows: \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; and \*\*\*,  $P < 0.001$ . Data obtained at 24 and 36 h postinfection were normalized to the viral titer, and results are presented as fold induction/(titer  $\times 10^6$ ). (E) Fold induction of IFN- $\beta$  mRNA 12, 24, and 36 h after A549 cells were infected by UV-inactivated (UV-in.) rMVs at an MOI of 1. Experiments were performed two times, and data represent the upper and lower 95% confidence intervals for technical triplicates of the most representative experiment.

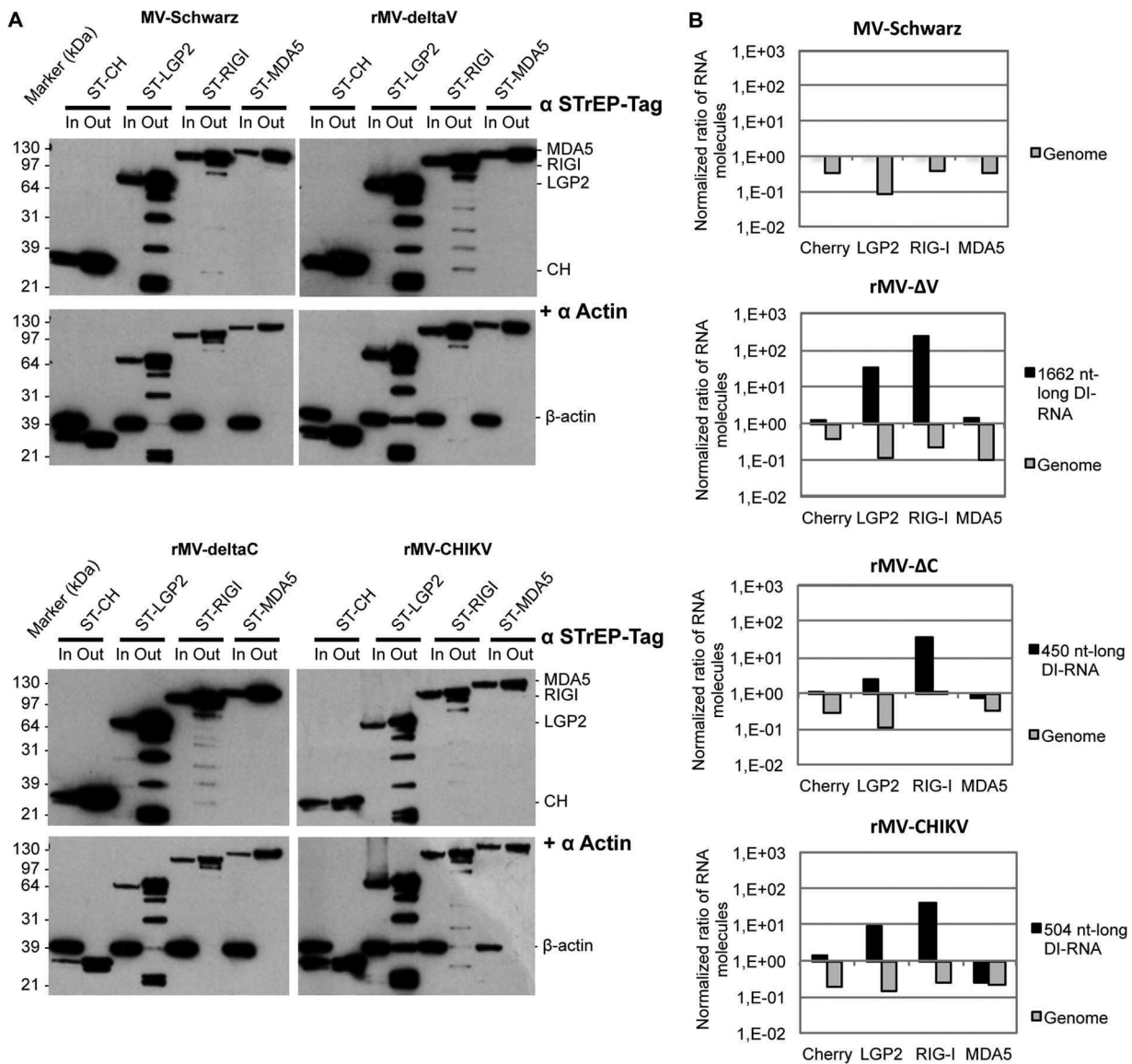


**FIG 7** Variation in type I IFN response activation by DI-RNAs in the presence of the MV N and P proteins. (A) Western blot analysis of T7 polymerase, MV-N, MV-P, and  $\beta$ -actin in HEK293-T7 and HEK293-T7-NP cells. A total of  $1 \times 10^6$  cells were plated, and lysis was performed 12 h later. (B) Absolute quantification of 1,212-, 450-, and 1,260-nt DI-RNAs produced by HEK293-T7 and HEK293-T7-NP cells transfected with the p2RZ-DI1212, p2RZ-DI450, and p2RZ-DI1260 vectors. Total RNA (400 ng) purified from cells at 24 h posttransfection was treated with RQ1 RNase-free DNase, and 100 ng was analyzed by RT-qPCR. Absolute quantification was performed using serial dilutions of *in vitro*-transcribed MV DI-RNAs and normalized with actin. Results are expressed in copy numbers of RNA molecules. Experiments were performed two times, and samples were tested in triplicate. (C and D) HEK293-T7 and HEK293-T7-NP cells were transfected with p2RZ vectors encompassing DI-RNAs or an actin sequence (C) or with *in vitro*-transcribed RNAs (actin, 5'3P, or 3 different IVT DI-RNAs) (D). Relative IFN- $\beta$  mRNA expression levels were measured at 24 h posttransfection, normalized to GAPDH, and compared to those of mock-transfected cells. Experiments were performed two times, and the upper and lower 95% confidence intervals are shown as error bars for technical triplicates of the most representative experiment.

showed a significantly increased level of IFN- $\beta$  production, while HEK293-T7-NP cells did not (Fig. 7C). As expected, no type I IFN signaling activation was observed in both cell lines upon transfection with the negative-control p2RZ-actin vector. Furthermore, we analyzed the potential of DI-RNAs to stimulate type I IFN by transfecting the IVT DI-RNAs into HEK293-T7 and HEK293-T7-NP cells (Fig. 7D). As before, HEK293-T7 cells presented a higher type I IFN activation potential than that of HEK293-T7-NP cells upon transfection of the IVT DI-RNAs, whereas control stimulation levels by 5'3P RNA were identical in the two cell lines. The presence of MV N and P in HEK293-T7-NP cells decreased type I IFN activation by DI genomes but did not abrogate it. Importantly, we observed similar type I IFN activation levels by plasmid-derived and IVT DI-RNAs in HEK293-T7 cells, whereas in HEK293-T7-NP cells the plasmid-derived DI genomes were less potent. Therefore, the rapid encapsidation immediately after synthesis from p2RZ-DI-RNA vectors in HEK293-T7-NP cells hid the viral RNA and abolished its recognition and downstream activation of type I IFN signaling. By simultaneous transfection of a viral polymerase-encoding plasmid, we validated that type I IFN signaling upon DI-RNA encapsidation into MV nucleocapsids was independent of the presence of the MV L protein (data not shown).

These results show that nonencapsidated DI-RNAs efficiently activated type I IFN signaling independently of their size or sequence and that their encapsidation abolished type I IFN stimulation.

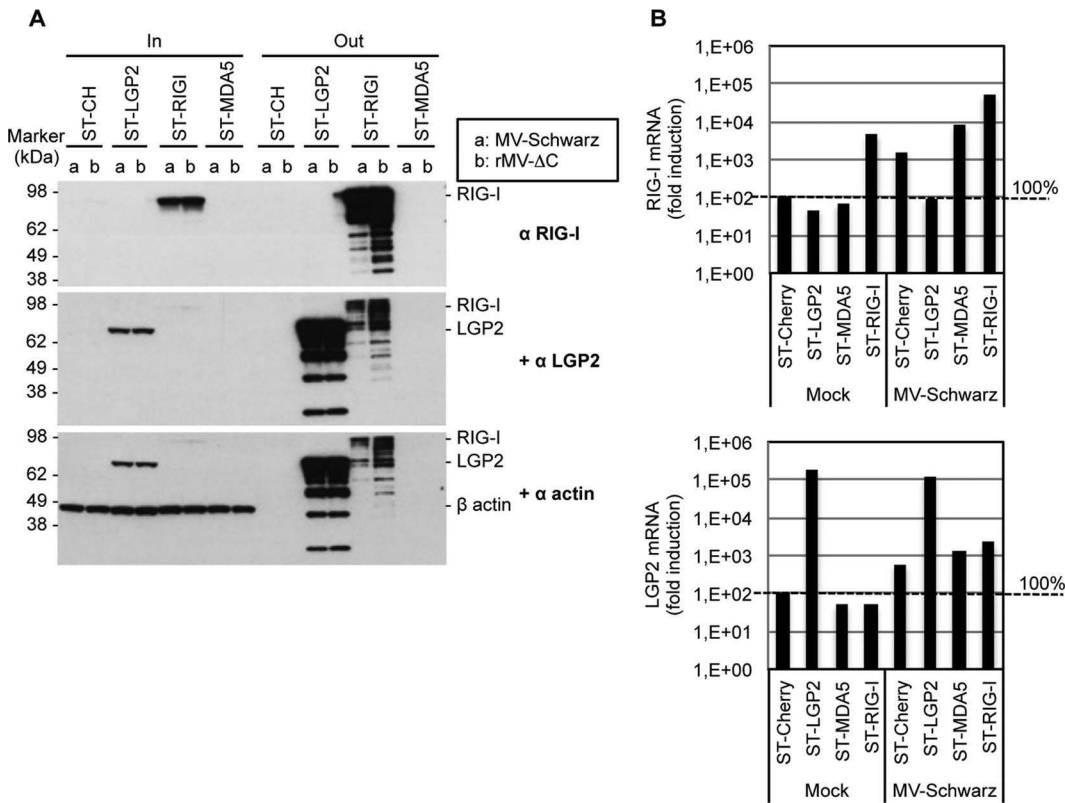
**MV 5' copy-back DI-RNAs are specific agonists of RIG-I and LGP2 but not MDAS.** To determine which of the three RLRs are involved in DI genome sensing, we



**FIG 8** 5' copy-back DI-RNA-specific binding to RLRs. (A) Western blot of infected ST-RLR cells before (input [In]) and after (output [Out]) One-StrEP tag affinity purification. Western blot analysis of  $\beta$ -actin served as a control for nonspecific binding. (B) Ratios of genomes and DI-RNA molecules after to before One-StrEP tag affinity purification of ST-RLR cell lines. Ten nanograms of either total RNA or RNA obtained after affinity chromatography of STREP-tagged Cherry (negative control), LGP2, RIG-I, or MDA5 was analyzed by RT-qPCR. Absolute quantification was performed as described in the legend to Fig. 4 and normalized with  $\beta$ -actin mRNA (nonspecific binding). Samples were analyzed in triplicate, and two biological replicates were performed.

compared LGP2, MDA5, and RIG-I binding efficiencies with various 5' copy-back DI genomes produced during infection. To this end, we used human HEK293 cell lines stably expressing tagged LGP2, MDA5, and RIG-I proteins (ST-RLR cells). We previously showed that these cells constitute an effective tool for purifying viral agonists of RLRs (13). ST-RLR cells were infected with MV-Schwarz, rMV- $\Delta$ V, rMV- $\Delta$ C, and rMV-CHIKV for 24 h at an MOI of 1. RLR-specific RNA ligands were purified as previously described (13). In addition, a stable cell line (ST-CH) expressing the Cherry protein instead of tagged RLRs was used as a negative control to allow subtraction of nonspecific RNA binding (13). The efficacy of purification was assessed by Western blotting to confirm the enrichment of RLRs and the absence of nonspecific binding (Fig. 8A). Absolute quantification of DI-RNAs, genomes, and  $\beta$ -actin mRNA was done using RT-qPCR. Ratios of full-length genomes to  $\beta$ -actin and of DI-RNAs to  $\beta$ -actin indicated that DI-RNAs were always enriched on RIG-I and, to a lesser extent, on LGP2 but never on MDA5 (Fig. 8B).





**FIG 9** Endogenous RIG-I is absent from the LGP2-specific protein complex. (A) Western blot analysis of infected ST-RLR cells before (total lysate [In]) and after (beads [Out]) One-StrEPTag affinity purification. Cells were infected with MV-Schwarz (a) or rMV-ΔC (b) at an MOI of 1. The presence of RIG-I and LGP2 was assessed, and β-actin served as a control for nonspecific binding. (B) Relative quantification of RIG-I and LGP2 mRNAs in mock- and MV-Schwarz-infected ST-RLR cell lines by qRT-PCR, normalized with GAPDH mRNA.

Full-length genomes were equally depleted on the three RLRs for MV-Schwarz and any of the rMV infections.

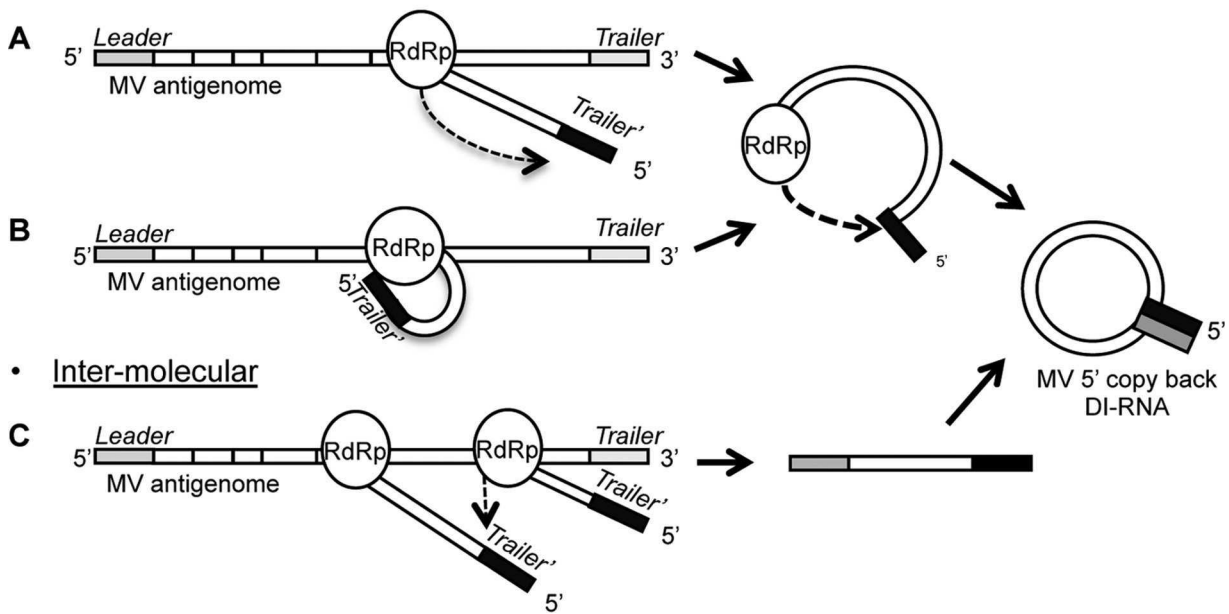
To ensure that the enrichment of DI-RNAs on LGP2 was not due to a RIG-I–LGP2 protein-protein interaction (34), we performed Western blotting to confirm that endogenous RIG-I proteins were missing in the LGP2-specific protein complexes purified from MV-infected cells (Fig. 9A). The results were similar to previously published data in which RIG-I failed to be coprecipitated with LGP2 (35). Additionally, we quantified RIG-I and LGP2 mRNA levels in total RNA extracted from ST-RLR cells infected or not with MV-Schwarz. While endogenous RIG-I was not induced in the MV-infected ST-LGP2 cell line, these cells expressed 3 log more LGP2 transcripts due to overexpression (Fig. 9B). Thus, the bias for the presence of specific RNA partners on LGP2 due to the presence of endogenous RIG-I in our ST-LGP2 cells should be minimal, if present at all.

Thus, we validated that various DI-RNAs specifically interact with RIG-I and observed, for the first time, their specific binding to LGP2.

**DISCUSSION**

DI-RNAs are known to be produced by modified MVs (rMV-N [10], rMV-ΔV [13], and rMV-ΔC [24]) or by measles vaccine strains after cell passages at a high MOI (8, 20, 22). By comparing different stocks of rMVs that had different genetic modifications but were identically produced using the reverse genetics approach, we observed that any modification of the MV genome increased its capacity to produce DI-RNAs. Indeed, all rMVs tested in this study significantly produced one or more distinct DI-RNAs, while the parental MV-Schwarz stock did not, unless it was passaged at least five times in cell culture (Table 2; Fig. 2B and C). The genome modifications included an addition of genetic material (rMV-GFP, rMV-CH, rMV-N, rMV-CHIKV, and rMvp55Gag/Env) or a

- Intra-molecular



**FIG 10** Hypotheses on DI genome generation by the viral polymerase. (A and B) The intramolecular model suggests that the nascent genome is a template (black) for the polymerase (RdRp) to synthesize the complementary ending (gray) of the DI-RNA after a polymerase “jump” (A) or by spatial proximity due to a temporal interaction of the 5' end of the nascent genome with the RdRp (B). (C) The intermolecular model suggests that another nascent genome is a template (black) for the RdRp due to spatial proximity.

deletion of the MV C or V virulence factor (rMV- $\Delta$ C and rMV- $\Delta$ V) (Fig. 1). The MV C and V proteins are multifunctional proteins. One of their functions is to regulate viral RNA synthesis. Indeed, the C protein is described as an important factor that stabilizes the RNP-polymerase complex, as a lack of C protein results in more frequent chain termination occurring during both transcription and replication (15). The V protein helps to maintain the ratio of genome to antigenome synthesis during replication (36).

We observed that the production of DI genomes is an intrinsic quality of MV infection, not a side effect of the reverse genetics protocol, since DI-RNAs were also detected during infection with wt-MV isolated from a patient sample (Table 2). However, the exact mechanism by which the polymerase stops replicating and starts copying back remains unknown. We suggest two hypotheses for DI genome generation (Fig. 10). The first is an intramolecular model in which the nascent genome is the template for the polymerase to copy back the complementary ending. This could happen with a polymerase “jump” (Fig. 10A) or, more likely, by spatial proximity due to a temporal interaction of the 5' end of the nascent genome with the polymerase during the replication process (Fig. 10B). The second hypothesis is an intermolecular model in which another nascent genome is a template for the polymerase due to spatial proximity (Fig. 10C). We found a different sequencing pattern of DI-RNAs for each viral stock and identified multiple breakpoint and reinitiation sites, especially for DI-RNAs of rMV- $\Delta$ C. This pattern was defined early after rescue, as shown by Pfaller et al. (24). Nevertheless, we found DI genomes of 1,212 nt with identical breakpoint and reinitiation sites in three different viral stocks (rMV-N, rMV-P55Gag/Env, and wt-MV), suggesting that some conserved motifs were involved. However, whatever the mechanism of DI genome generation, we could not find any correlation with specific RNA motifs, RNA secondary structure, or RNP folding (Fig. 3).

DI-RNA lengths ranged from 402 nt to 2,094 bp. The loop and stem sizes varied from one DI-RNA to another, but all identified sequences respected the “rule of six” necessary for efficient encapsidation (21, 24, 28). The minimal size of the double-stranded stem region, 93 nt, included the B' box of the trailer sequence (37). This is also the minimal size observed by Pfaller et al. (24) and is comparable to the minimal length of 96 nt

observed in copy-back DI-RNAs of Sendai virus (SeV), another member of the paramyxovirus subfamily *Paramyxovirinae* (38). This minimal sequence is necessary for genome encapsidation by N and P proteins (39, 40). The MV genome is known to be encapsidated immediately after the beginning of replication (4), and the “rule of six” necessary for encapsidation may have advantaged replication, transmission of DI-RNAs from cell to cell, and stability within the cytoplasm. However, DI-RNAs with lengths that do not respect the “rule of six” have also been described (14, 24).

Defective viral genomes are named defective “interfering” RNA because DI-RNA particles were postulated to interfere with the replication of the infectious virus by competing for viral proteins in the infected cell (41). In our study, all rMVs had decreased growth compared to that of MV-Schwarz, meaning that the genetic modifications decreased the viral fitness (Fig. 5A). The lowest growth rates were observed for MV-Schwarz P8, rMV-N, and rMV- $\Delta$ C, which produced large amounts of DI-RNAs at levels similar to those of full-length genomes (Fig. 4). These DI-RNAs may indeed decrease viral growth not only by interfering directly with viral replication but also by enhancing the host response due to their detection as PAMPs by the innate immune system. Interestingly, for rMV- $\Delta$ C, we quantified as many full-length genomes as those of MV-Schwarz by RT-qPCR, whereas the viral titer was a hundred times lower (Fig. 4 and 5A). This could be explained by reduced virus protein translation being responsible for fewer complete viral particles. Indeed, the translation inhibition observed in A549 cells infected by rMV- $\Delta$ C has been correlated with phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation inhibition factor 2 (eIF2 $\alpha$ ) (42).

5' copy-back DI-RNAs are known to be PAMPs to intracellular RLRs, specifically to RIG-I (11, 13) and also MDA5 (12). Here we demonstrated a direct interaction between DI-RNAs and the RIG-I and LGP2 receptors by infecting ST-RLR cell lines (Fig. 8B). These cells enabled isolation of RLR-specific interactors by chromatographic affinity purification (13). DI-RNAs were amplified among RNAs associated with RIG-I and LGP2 receptors but not MDA5. We described here, for the first time, an interaction between LGP2 and DI-RNA. LGP2 differs from RIG-I and MDA5 in the absence of a CARD domain necessary to activate the final IFN signaling cascade via MAVS activation (43). The role of LGP2 as a regulator of MDA5 and RIG-I responses is controversial and not well defined. It acts mainly as a negative regulator of RIG-I (34, 44) and a positive regulator of MDA5 (45). Common ligands between MDA5 and LGP2 have been suggested (13, 46, 47), and MDA5 may play a role in the induction of an antiviral state in cells infected by the measles vaccine by recognizing MV PAMPs other than DI-RNA (13, 48). Here we described the 5' copy-back DI-RNA molecule as a common ligand between RIG-I and LGP2. Although rMVs shared high immunostimulatory properties for IFN and ISG expression (Fig. 5 and 6), both regulatory functions of LGP2, i.e., (i) an enhancement of the MDA5 response and (ii) a downregulation via RIG-I to regulate the activation and avoid exacerbation of the innate immune response, may still be involved.

DI-RNA sequences were highly preserved, with no mutations observed for all DI-RNAs except the 1,032-nt DI-RNA. This DI-RNA, produced by rMV- $\Delta$ C, accumulated clusters of A-to-G transitions (Table 2). This pattern was already observed by Pfaller et al. (24) for DI-RNAs produced by the Moraten vaccine strain and the wild-type IC-B strain lacking expression of the MV C protein. ADAR1 editing has been hypothesized to destabilize free DI-RNA molecules that have dsRNA structures (24). However, in our case, the A-to-G transitions, observed for 36 of 286 A nucleotides (12.7%), were located only in the loop sequence. These mutations did not affect the immunostimulatory properties, as the general structure was conserved. Indeed, cells transfected with eight *in vitro*-transcribed DI-RNAs differing in size and sequence showed similar high levels of IFN- $\beta$  and ISG expression in STING-37 and A549 cells (Fig. 6). These experiments confirmed that the PAMPs recognized by RIG-I and LGP2 are structure dependent and do not rely on the sequence or the size of the single-stranded RNA (ssRNA) loop. Moreover, Ho et al. (14) recently confirmed that the 5'3P DI-RNA extremity plays a major role in RIG-I recognition.

MV vaccine strains are stronger inducers of the IFN pathway than wt-MV (20), even

in the absence of DI-RNA. In this study, we showed that MV-Schwarz P8 and all tested rMVs possessed higher immunostimulatory properties than that of the parental strain MV-Schwarz due to the higher levels of DI-RNAs (Fig. 5). Viral replication is necessary for these immunostimulatory properties, as UV-inactivated virus did not induce type I IFN production even when the viral stock contained DI-RNAs (Fig. 5E). More importantly, we showed that nonencapsidated DI-RNAs induced a strong type I IFN response, whereas encapsidated DI-RNAs did not. These results seem to contradict an immediate encapsidation of each new strand of RNA. We suggest that modifications of the MV genome via gene deletion or insertion induce replication disturbances that might decrease efficient replication/encapsidation coupling. This allows a population of DI-RNAs to remain nonencapsidated in the cytoplasm by exceeding the capacity of MV-N encapsidation. Indeed, SeV DI-RNAs in extracts of infected cells, analyzed by use of a CsCl density gradient, were found to be mostly encapsidated, but a small amount (<5%) remained naked (7). Pfaller et al. also found more naked dsRNA in cells infected by rMV- $\Delta$ C (15). Because the C protein stabilizes the MV RdRp complex, its absence might enhance more production of DI-RNAs that cannot be encapsidated due to the inhibition of translation (40) leading to a lack of a sufficient amount of MV-N. Otherwise, the failure of encapsidated DI-RNAs to induce IFN- $\beta$  (Fig. 7C and D) also contests the previously suggested ability of RLRs to use the ATP-driven receptor dynamics for remodeling viral RNPs to facilitate their accessibility to RNA ligands (49).

Our experiments demonstrating a difference in type I IFN responses to nonencapsidated and encapsidated DI-RNAs were obtained upon their transfection into either HEK293T-T7 or HEK293T-T7-NP cells. This protocol may involve a "passive" encapsidation by N and P that may be different from a bona fide cotranscriptional encapsidation occurring during regular viral replication. However, MV-N is the only viral protein that encapsidates the MV genome, thus forming nucleocapsids that constitute the functional template for viral RdRp. MV-P serves as an anchor that brings viral RdRp to nucleocapsids via protein-protein interaction (for a recent review, see reference 50). In addition, MV N-P protein interaction maintains nucleoproteins in a soluble monomeric form and prevents illegitimate encapsidation of cellular RNA (50, 51). In our transfection experiments, we used HEK293-T7-NP cells that express both MV-N and MV-P. The above-mentioned data show that the presence in the cytoplasm of both the N and P proteins together with defective viral genomes is sufficient to form functional nucleocapsids in HEK293-T7-NP cells upon transfection of DI-RNAs. Importantly, HEK293-T7-NP cells were the cells in which viral genome encapsidation was functionally validated, since these cells are routinely used to rescue recombinant MV by reverse genetics (27, 52).

Vaccine efficacy depends on the immunostimulatory properties of the vaccine. We suggest that 5' copy-back DI-RNAs act as intrinsic adjuvants naturally produced by the measles virus vector during replication, as they enhance recognition and activation of the innate immune system. They certainly play a major role in MV effectiveness as a vector against heterologous antigens, and their presence should be considered to have great importance. Obviously, standardization of DI production by rMVs is required to produce homogeneous vaccine batches, and a modified vaccine production protocol should be developed in the future.

## MATERIALS AND METHODS

**Cells, viruses, plasmid vectors, and antibodies.** HEK293T (human embryonic kidney cells), Vero (African green monkey kidney cells), A549 (human alveolar basal epithelial adenocarcinoma cells), and HeLa cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS; GE Healthcare) and 10,000 U/ml of penicillin-streptomycin (Life Technologies). Vero/hSLAM and HEK293 cell lines expressing One-STrEP-tagged RIG-I (ST-RIG-I), MDA5 (ST-MDA5), LGP2 (ST-LGP2), and Cherry (ST-CH) (13) were maintained in the same medium supplemented with G418 (Sigma) at 500  $\mu$ g/ml. The STING-37 cell line corresponded to HEK293 cells stably transfected with an ISRE-luciferase reporter gene (33). HEK293-T7 (kindly provided by Yves Jacob, Unité de Génétique Moléculaire des Virus ARN, Institut Pasteur, and Pierre Charneau, Unité de Virologie Moléculaire et Vaccinologie, Institut Pasteur) and HEK293-T7-NP (27) cells expressed the T7 polymerase in the cytosol. HEK-293-T7-NP cells also stably expressed MV-N and MV-P.

The MV-Schwarz vaccine strain (GenBank accession no. [AF266291.1](#)) (27) and seven recombinant MVs were used: rMV-N, expressing an additional nucleoprotein in additional transcription unit 2 (ATU2) (Fig. 1A) (10); rMV-ΔC, lacking the MV C protein; rMV-ΔV, lacking the MV V protein (13); rMV-CHIKV, expressing the chikungunya virus structural proteins (E1, E2, E3, C, and 6K) in ATU2 (29); rMV-p55Gag/Env, expressing the HIV-1 p55Gag polyprotein and EnvΔV1V2 envelope glycoprotein in ATU2 (30); rMV-GFP, expressing green fluorescent protein in ATU2 (27); and rMV-CH, expressing Cherry red fluorescent protein in ATU3 (A. Meignié C. Combredet, A. Arbabian, F. Tangy, and A. V. Komarova, unpublished data). rMV-ΔC was generated by site-directed mutagenesis on a cassette vector covering the P gene sequence. The second translation initiation codon present in the N-terminal P ORF in the +1 frame was mutated (U → C), and then a substitution (G → A) was generated at nucleotide position 1845 of the MV genome to introduce a stop codon within the C ORF. Both mutations do not disturb the P and V ORFs (Fig. 1B). MV-Schwarz P8 was obtained after 8 passages of MV-Schwarz on Vero cells at an MOI of 0.1. wt-MV was obtained from a patient urine sample and assigned G2V wt-MV (GenBank accession no. [MF449469](#)). A stock of wt-MV was produced by virus multiplication on Vero/hSLAM cells at an MOI of 0.1. Virus titers were determined by TCID<sub>50</sub> titration on Vero cells (or Vero-SLAM cells for wt-MV). Two different viral stocks from two technical replicates of rescues were obtained for rMV-ΔC, rMV-N, and rMV-CHIKV, using the protocol described by Radecke et al. (52) and modified by Parks et al. (53).

The plasmid vector pCRII-TOPO from a TOPO TA cloning kit (Invitrogen) was used to clone RT-PCR products before sequencing. The DI-RNA sequences were cloned into the *in vitro* transcription vector p2RZ (Addgene) by use of the HindIII and NheI restriction sites. *In vitro* transcription was carried out at 37°C by using T7 RiboMAX (Promega), and RNA products were purified using an RNeasy clean-up kit (Qiagen).

The following antibodies were used: anti-STRiP tag (34850; Qiagen), a monoclonal anti-β-actin antibody (A5441; Sigma), a polyclonal anti-T7 polymerase antibody (kindly provided by Yves Jacob), monoclonal anti-MV-N (clone 25; kindly provided by Chantal Rabourdin-Combe [54]), monoclonal anti-MV-P (9H4; Novus), anti-RIG-I (D14G6; Cell Signaling), and anti-LGP2 (HPA019570; Sigma).

**Virus growth curves.** Monolayers of A549 cells in 24-mm-diameter dishes (6-well plates) were infected with MV-Schwarz, MV-Schwarz P8, or rMVs at an MOI of 1. At various times postinfection, cells were scraped into culture medium. After freeze-thawing of cells and medium and clarification of cell debris, virus titers were determined. For this purpose, Vero cells were seeded into 96-well plates (7,500 cells/well) and infected with serial 1:10 dilutions of virus sample in DMEM-5% FCS. After incubation for 7 days, cells were stained with crystal violet, and the TCID<sub>50</sub> values were calculated by use of the Karber method.

**Virus infection for RT-PCR detection of 5' copy-back DI-RNAs.** Cells were seeded into T25 flasks 1 day before infection. Virus infections were carried out at an MOI of 1. Viruses were diluted with Opti-MEM to obtain a final inoculum volume of 2 ml. Cells were incubated with virus for 2 h at 37°C. Four milliliters of DMEM containing 10% fetal bovine serum (FBS) was added to each T25 flask, and cells were incubated at 37°C until infections were stopped by cell lysis 24 h later.

Total RNA was extracted by use of an RNeasy minikit (Qiagen). cDNA was generated from 300 ng of total RNA by using Superscript III (Thermo Fisher Scientific) and primer a (Fig. 2A and Table 1) in a total volume of 20 μl. A total of 2 μl of the resultant cDNA was then amplified with primers a and b for genome amplification (Fig. 2A and Table 1) and primers a and c for DI-RNA amplification (Fig. 2A and Table 1), using Phusion high-fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific) in a total volume of 50 μl (95°C for 2 min; 40 cycles of 95°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 1 min; and 72°C for 10 min). At the end of the PCR, Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific) was added and incubated at 72°C for 10 min. The products were analyzed in a 1% agarose gel, with a Smartladder (MW-1700-10; Eurogentec) as the size standard, and gel purified with a QIAquick gel extraction kit (Qiagen). The PCR-amplified products were cloned into the pCRII-TOPO vector and sequenced.

**TaqMan RT-qPCR analysis of DI-RNAs and full-length MV genomes.** Analysis was performed using Applied Biosystems StepOnePlus technology. Various MV DI-RNA primers and probes were designed using Primer Express software (Applied Biosystems) (Table 1). Reactions were performed on 400 ng of total RNA by use of TaqMan RNA-to-Ct 1-Step kits (Thermo Fisher Scientific) for one-step RT-qPCR analyses. Reactions were performed in a final volume of 20 μl in the presence of 100 nM TaqMan DI-RNA-specific probe and 100 nM (each) DI-RNA-specific forward and reverse primers. For absolute quantification of DI-RNAs, standard curves were established by using serially diluted RNAs obtained by *in vitro* transcription of p2RZ, encompassing DI-RNAs specific for each rMV. The protocol for absolute quantification of β-actin or MV genomes was described elsewhere (10). The standard curves were generated by the StepOnePlus software system by plotting the threshold cycle (C<sub>T</sub>) values against the logarithms of the calculated initial copy numbers. The unknown initial sample copy numbers were then automatically calculated from their C<sub>T</sub> values and compared with the RNA standard curves.

**Affinity chromatography of RLR-RNP complexes and subsequent RNA purification.** ST-RLR cells (4 × 10<sup>7</sup>) were infected at an MOI of 1 for 24 h with MV-Schwarz, rMV-ΔV, rMV-ΔC, or rMV-CHIKV. Cells were washed twice with cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in 4 ml of lysis buffer (20 mM morpholinepropanesulfonic acid [MOPS]-KOH, pH 7.4, 120 mM KCl, 0.5% Igepal, 2 mM β-mercaptoethanol) supplemented with RNasin at 1/200 (Promega) and with Complete protease inhibitor cocktail (Roche). Cell lysates were incubated on ice for 20 min, with gentle mixing every 5 min, and then clarified by centrifugation at 16,000 × g for 15 min at 4°C. A 100-μl aliquot of each cell lysate was used to perform total RNA purification, using Tri reagent LS (Sigma). The rest of the cell lysate was incubated for 2 h on a spinning wheel at 4°C with 200 μl of StrepTactin Sepharose (high performance; GE Healthcare). Beads were collected by centrifugation (1,600 × g for 5 min at 4°C) and washed three

times for 5 min each on a spinning wheel with 5 ml of washing buffer (20 mM MOPS-KOH, pH 7.4, 120 mM KCl, 2 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) supplemented with RNasin at 1/400 and with Complete protease inhibitor cocktail. RNA purification was performed using Tri reagent LS. RNA was dissolved in 50  $\mu$ l of DNase-free and RNase-free ultrapure water. Extracted RNAs were analyzed using Nanovue (GE Healthcare) and a Bioanalyser RNA nanokit (Agilent).

To validate the efficacy of RLR-ribonucleoprotein complex purification, protein extracts were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis on 4 to 12% Criterion gels (Bio-Rad) with MOPS running buffer and transferred to cellulose membranes (GE Healthcare) by use of a Criterion blotter system (Bio-Rad).

Absolute quantification of DI-RNAs, genomes, and  $\beta$ -actin mRNA was done by RT-qPCR on total RNA and on RNA obtained after One-STREP tag affinity purification. A  $\beta$ -actin mRNA fragment was used to normalize the quantities of RNA before and after affinity purification.

**Analysis of rMV immunostimulatory activities.** STING-37 cells (33) were infected with MV-Schwarz, MV-Schwarz P8, or rMVs at an MOI of 1, left noninfected (mock), or transfected with 10 ng of *in vitro*-transcribed DI-RNAs by use of a TransIT-mRNA transfection kit (Mirus). Poly(I:C) of high molecular weight (HMW; Invivogen) and low molecular weight (LMW; Invivogen), short 5'3P RNA (synthesized *in vitro* with a T7 RiboMAX Express kit), and recombinant human IFN- $\beta$  1a (PBL) were used as positive controls. Cells were lysed at different time points postinfection. The firefly luciferase activity was measured using the Bright-Glo Luciferase assay system (Promega) following the manufacturer's recommendations.

**TaqMan RT-qPCR of IFN- $\beta$  and ISG expression.** Gene expression qPCR analysis was performed by using Applied Biosystems StepOnePlus technology. Total RNA was extracted from A549 cells infected by different rMVs or from A549, HEK293-T7, or HEK293-T7-NP cells transfected with different *in vitro*-transcribed DI-RNAs at 24 h, using an RNeasy minikit. Total RNAs extracted from HEK293-T7 and HEK293-T7-NP cells transfected with p2RZ vector in the presence or absence of pEMC-La (a kind gift of M. A. Billeter) were treated with RQ1 RNase-free DNase (Promega). Expression levels of IFN- $\beta$  or ISG (Mx1 and DHX58) were quantified by one-step real-time PCR, using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA expression as an internal control. One hundred nanograms of total RNA was amplified with 20 $\times$  custom TaqMan gene expression assays (IFN- $\beta$ , Hs01077958\_s1; Mx1, Hs00895608\_m1; DHX58, Hs00225561\_m1; and GAPDH, Hs99999905\_m1) (Life Technologies) by using a TaqMan RNA-to-Ct 1-Step kit in accordance with the manufacturer's instructions. All measurements were performed in triplicate and analyzed by use of the StepOnePlus software system.

**Bioinformatics tools for DI-RNA analysis.** Weblogo and MUSCLE (multiple-sequence comparison by log expectation) software was used for multiple-sequence alignment analysis. The mFold Web server was used to predict RNA secondary structures. GC ratios were calculated using the GC Content Calculator (BiologicsCorp). All software consulted is available via free access online.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Martin Billeter, Yves Jacob, and Pierre Charneau for providing material, Phanramphoei Frantz (Unité de Génomique Virale et Vaccination, Institut Pasteur) for a critical reading of the manuscript, and Bernd Jagla (Hub Bioinformatique et Biostatistique, Institut Pasteur) for help with bioinformatics analysis of DI-RNAs. We thank all the members of the Viral Genomics and Vaccination Research Unit for their help and useful discussions.

This work was supported by the Institut Pasteur and the CNRS. M.M. was supported by the Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), and R.Y.S.D. was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (grant FDT20140931129).

## REFERENCES

- Lazzarini RA, Keene JD, Schubert M. 1981. The origins of defective interfering particles of the negative-strand RNA viruses. *Cell* 26:145–154. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90298-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90298-1).
- Dimmock NJ, Easton AJ. 2014. Defective interfering influenza virus RNAs: time to reevaluate their clinical potential as broad-spectrum antivirals? *J Virol* 88:5217–5227. <https://doi.org/10.1128/JVI.03193-13>.
- Lopez CB. 2014. Defective viral genomes: critical danger signals of viral infections. *J Virol* 88:8720–8723. <https://doi.org/10.1128/JVI.00707-14>.
- Gubbay O, Curran J, Kolakofsky D. 2001. Sendai virus genome synthesis and assembly are coupled: a possible mechanism to promote viral RNA polymerase processivity. *J Gen Virol* 82:2895–2903. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-12-2895>.
- Bellini WJ, Englund G, Rozenblatt S, Arnheiter H, Richardson CD. 1985. Measles virus P gene codes for two proteins. *J Virol* 53:908–919.
- Cattaneo R, Kaelin K, Bacsko K, Billeter MA. 1989. Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell* 56:759–764. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90679-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90679-X).
- Strahle L, Garcin D, Kolakofsky D. 2006. Sendai virus defective-interfering genomes and the activation of interferon-beta. *Virology* 351:101–111. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.03.022>.
- Shingai M, Ebihara T, Begum NA, Kato A, Honma T, Matsumoto K, Saito H, Ogura H, Matsumoto M, Seya T. 2007. Differential type I IFN-inducing abilities of wild-type versus vaccine strains of measles virus. *J Immunol* 179:6123–6133. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.9.6123>.
- Mercado-Lopez X, Cotter CR, Kim WK, Sun Y, Munoz L, Tapia K, Lopez CB. 2013. Highly immunostimulatory RNA derived from a Sendai virus defective viral genome. *Vaccine* 31:5713–5721. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.09.040>.
- Komarova AV, Combredet C, Sismeiro O, Dillies MA, Jagla B, Sanchez David RY, Vabret N, Coppee JY, Vidalain PO, Tangy F. 2013. Identification of RNA partners of viral proteins in infected cells. *RNA Biol* 10:944–956. <https://doi.org/10.4161/rna.24453>.
- Baum A, Sachidanandam R, Garcia-Sastre A. 2010. Preference of RIG-I for short viral RNA molecules in infected cells revealed by next-generation sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:16303–16308. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005077107>.
- Runge S, Sparrer KM, Lassig C, Hembach K, Baum A, Garcia-Sastre A,

- Soding J, Conzelmann KK, Hopfner KP. 2014. In vivo ligands of MDA5 and RIG-I in measles virus-infected cells. *PLoS Pathog* 10:e1004081. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004081>.
13. Sanchez David RY, Combredet C, Sismeiro O, Dillies MA, Jagla B, Coppee JY, Mura M, Guerbois Galla M, Despres P, Tangy F, Komarova AV. 2016. Comparative analysis of viral RNA signatures on different RIG-I-like receptors. *eLife* 5:e11275. <https://doi.org/10.7554/eLife.11275>.
  14. Ho TH, Kew C, Lui PY, Chan CP, Satoh T, Akira S, Jin DY, Kok KH. 2015. PACT- and RIG-I-dependent activation of type I interferon production by a defective interfering RNA derived from measles virus vaccine. *J Virol* 90:1557–1568. <https://doi.org/10.1128/JVI.02161-15>.
  15. Pfaller CK, Radeke MJ, Cattaneo R, Samuel CE. 2014. Measles virus C protein impairs production of defective copyback double-stranded viral RNA and activation of protein kinase R. *J Virol* 88:456–468. <https://doi.org/10.1128/JVI.02572-13>.
  16. Saira K, Lin X, DePasse JV, Halpin R, Twaddle A, Stockwell T, Angus B, Cozzi-Lepri A, Delfino M, Dugan V, Dwyer DE, Freiberg M, Horban A, Lusso M, Lynfield R, Wentworth DN, Holmes EC, Davey R, Wentworth DE, Ghedin E, INSIGHT FLU002 Study Group, INSIGHT FLU003 Study Group. 2013. Sequence analysis of in vivo defective interfering-like RNA of influenza A H1N1 pandemic virus. *J Virol* 87:8064–8074. <https://doi.org/10.1128/JVI.00240-13>.
  17. Li D, Lott WB, Lowry K, Jones A, Thu HM, Aaskov J. 2011. Defective interfering viral particles in acute dengue infections. *PLoS One* 6:e19447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019447>.
  18. Prince AM, Huima-Byron T, Parker TS, Levine DM. 1996. Visualization of hepatitis C virions and putative defective interfering particles isolated from low-density lipoproteins. *J Viral Hepat* 3:11–17. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.1996.tb00075.x>.
  19. Sun Y, Jain D, Koziol-White CJ, Genoyer E, Gilbert M, Tapia K, Panettieri RA, Jr, Hodinka RL, Lopez CB. 2015. Immunostimulatory defective viral genomes from respiratory syncytial virus promote a strong innate antiviral response during infection in mice and humans. *PLoS Pathog* 11:e1005122. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005122>.
  20. Kessler JR, Kremer JR, Muller CP. 2011. Interplay of measles virus with early induced cytokines reveals different wild type phenotypes. *Virus Res* 155:195–202. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.10.005>.
  21. Calain P, Roux L. 1988. Generation of measles virus defective interfering particles and their presence in a preparation of attenuated live-virus vaccine. *J Virol* 62:2859–2866.
  22. Whistler T, Bellini WJ, Rota PA. 1996. Generation of defective interfering particles by two vaccine strains of measles virus. *Virology* 220:480–484. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0335>.
  23. Pulendran B, Oh JZ, Nakaya HI, Ravindran R, Kazmin DA. 2013. Immunity to viruses: learning from successful human vaccines. *Immunol Rev* 255:243–255. <https://doi.org/10.1111/immr.12099>.
  24. Pfaller CK, Mastorakos GM, Matchett WE, Ma X, Samuel CE, Cattaneo R. 2015. Measles virus defective interfering RNAs are generated frequently and early in the absence of C protein and can be destabilized by adenosine deaminase acting on RNA-1-like hypermutations. *J Virol* 89:7735–7747. <https://doi.org/10.1128/JVI.01017-15>.
  25. Brandler S, Tangy F. 2008. Recombinant vector derived from live attenuated measles virus: potential for flavivirus vaccines. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 31:271–291. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2007.07.012>.
  26. Ramsauer K, Schwameis M, Firbas C, Mullner M, Putnak RJ, Thomas SJ, Despres P, Tauber E, Jilma B, Tangy F. 2015. Immunogenicity, safety, and tolerability of a recombinant measles-virus-based chikungunya vaccine: a randomised, double-blind, placebo-controlled, active-comparator, first-in-man trial. *Lancet Infect Dis* 15:519–527. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)70043-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)70043-5).
  27. Combredet C, Labrousse V, Mollet L, Lorin C, Delebecque F, Hurtrel B, McClure H, Feinberg MB, Brahic M, Tangy F. 2003. A molecularly cloned Schwarz strain of measles virus vaccine induces strong immune responses in macaques and transgenic mice. *J Virol* 77:11546–11554. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.21.11546-11554.2003>.
  28. Kolakofsky D, Roux L, Garcin D, Ruigrok RW. 2005. Paramyxovirus mRNA editing, the “rule of six” and error catastrophe: a hypothesis. *J Gen Virol* 86:1869–1877. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80986-0>.
  29. Brandler S, Ruffie C, Combredet C, Brault JB, Najburg V, Prevost MC, Habel A, Tauber E, Despres P, Tangy F. 2013. A recombinant measles vaccine expressing chikungunya virus-like particles is strongly immunogenic and protects mice from lethal challenge with chikungunya virus. *Vaccine* 31:3718–3725. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.086>.
  30. Guerbois M, Moris A, Combredet C, Najburg V, Ruffie C, Fevrier M, Cayet N, Brandler S, Schwartz O, Tangy F. 2009. Live attenuated measles vaccine expressing HIV-1 Gag virus like particles covered with gp160DeltaV1V2 is strongly immunogenic. *Virology* 388:191–203. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.02.047>.
  31. Pathak KB, Nagy PD. 2009. Defective interfering RNAs: foes of viruses and friends of virologists. *Viruses* 1:895–919. <https://doi.org/10.3390/v1030895>.
  32. Desmyter J, Melnick JL, Rawls WE. 1968. Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *J Virol* 2:955–961.
  33. Lucas-Hourani M, Munier-Lehmann H, Helynck O, Komarova A, Despres P, Tangy F, Vidalain PO. 2014. High-throughput screening for broad-spectrum chemical inhibitors of RNA viruses. *J Vis Exp* 2014:51222. <https://doi.org/10.3791/51222>.
  34. Saito T, Hirai R, Loo YM, Owen D, Johnson CL, Sinha SC, Akira S, Fujita T, Gale M, Jr. 2007. Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:582–587. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606699104>.
  35. Li S, Wang L, Berman M, Kong YY, Dorf ME. 2011. Mapping a dynamic innate immunity protein interaction network regulating type I interferon production. *Immunity* 35:426–440. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.06.014>.
  36. Parks CL, Witko SE, Kotash C, Lin SL, Sidhu MS, Udem SA. 2006. Role of V protein RNA binding in inhibition of measles virus minigenome replication. *Virology* 348:96–106. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.12.018>.
  37. Parks CL, Lerch RA, Walpita P, Wang HP, Sidhu MS, Udem SA. 2001. Analysis of the noncoding regions of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage. *J Virol* 75:921–933. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.2.921-933.2001>.
  38. Salinas Y, Roux L. 2005. Replication and packaging properties of short paramyxovirus defective RNAs. *Virus Res* 109:125–132. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.11.015>.
  39. Bhella D, Ralph A, Yeo RP. 2004. Conformational flexibility in recombinant measles virus nucleocapsids visualised by cryo-negative stain electron microscopy and real-space helical reconstruction. *J Mol Biol* 340:319–331. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.05.015>.
  40. Tapparel C, Maurice D, Roux L. 1998. The activity of Sendai virus genomic and antigenomic promoters requires a second element past the leader template regions: a motif (GNNNNN)3 is essential for replication. *J Virol* 72:3117–3128.
  41. Perrault J. 1981. Origin and replication of defective interfering particles. *Curr Top Microbiol Immunol* 93:151–207.
  42. Nakatsu Y, Takeda M, Ohno S, Koga R, Yanagi Y. 2006. Translational inhibition and increased interferon induction in cells infected with C protein-deficient measles virus. *J Virol* 80:11861–11867. <https://doi.org/10.1128/JVI.00751-06>.
  43. Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Foy E, Loo YM, Gale M, Jr, Akira S, Yonehara S, Kato A, Fujita T. 2005. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* 175:2851–2858. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.5.2851>.
  44. Rothenfusser S, Goutagny N, DiPerna G, Gong M, Monks BG, Schoenemeyer A, Yamamoto M, Akira S, Fitzgerald KA. 2005. The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol* 175:5260–5268. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.8.5260>.
  45. Bruns AM, Horvath CM. 2015. LGP2 synergy with MDA5 in RLR-mediated RNA recognition and antiviral signaling. *Cytokine* 74:198–206. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.02.010>.
  46. Bruns AM, Leser GP, Lamb RA, Horvath CM. 2014. The innate immune sensor LGP2 activates antiviral signaling by regulating MDA5-RNA interaction and filament assembly. *Mol Cell* 55:771–781. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.07.003>.
  47. Deddouche S, Goubau D, Rehwinkel J, Chakravarty P, Begum S, Maillard PV, Borg A, Matthews N, Feng Q, van Kuppeveld FJ, Reis e Sousa C. 2014. Identification of an LGP2-associated MDA5 agonist in picornavirus-infected cells. *eLife* 3:e01535. <https://doi.org/10.7554/eLife.01535>.
  48. Berghall H, Siren J, Sarkar D, Julkunen I, Fisher PB, Vainionpaa R, Matikainen S. 2006. The interferon-inducible RNA helicase, mda-5, is involved in measles virus-induced expression of antiviral cytokines. *Microbes Infect* 8:2138–2144. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.04.005>.

49. Yao H, Dittmann M, Peisley A, Hoffmann HH, Gilmore RH, Schmidt T, Schmid-Burgk JL, Hornung V, Rice CM, Hur S. 2015. ATP-dependent effector-like functions of RIG-I-like receptors. *Mol Cell* 58:541–548. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.03.014>.
50. Longhi S, Bloyet LM, Gianni S, Gerlier D. 2017. How order and disorder within paramyxoviral nucleoproteins and phosphoproteins orchestrate the molecular interplay of transcription and replication. *Cell Mol Life Sci* 74:3091–3118. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2556-3>.
51. Curran J, Marq JB, Kolakofsky D. 1995. An N-terminal domain of the Sendai paramyxovirus P protein acts as a chaperone for the NP protein during the nascent chain assembly step of genome replication. *J Virol* 69:849–855.
52. Radecke F, Spielhofer P, Schneider H, Kaelin K, Huber M, Dotsch C, Christiansen G, Billeter MA. 1995. Rescue of measles viruses from cloned DNA. *EMBO J* 14:5773–5784.
53. Parks CL, Lerch RA, Walpita P, Sidhu MS, Udem SA. 1999. Enhanced measles virus cDNA rescue and gene expression after heat shock. *J Virol* 73:3560–3566.
54. Giraudon P, Wild TF. 1981. Monoclonal antibodies against measles virus. *J Gen Virol* 54:325–332. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-54-2-325>.



## 2. Article II : développement d'un outil bio-informatique pour détecter les DI-RNAs à partir de données de séquençage de nouvelle génération

*DI-tector : defective interfering viral genomes detector for next generation sequencing data.*

Guillaume Beauclair, **Marie Mura**, Chantal Combredet, Frédéric Tangy, Nolwenn Jouvenet et Anastassia V. Komarova.

Soumis au journal NUCLEIC ACID RESEARCH Methods le 18 avril 2018

Le séquençage de nouvelle génération (NGS) fournit des jeux de données importants pour détecter et caractériser les types de DI-RNAs présents au cours des infections virales. C'est par ce biais qu'au sein du laboratoire, un DI-RNA avait été identifié au cours d'une infection cellulaire par un VacR déficitaire pour la protéine V (115). Plusieurs outils ont déjà été développés pour détecter au sein de données NGS des DI-RNAs présentant des délétions internes (ViVan, Papparazzi ou ViReMa). Cependant aucun outil ne permettait à ce jour de détecter les copy-back DI-RNAs, qui sont au cœur de notre travail. La présence au laboratoire d'un chercheur post-doctorant formé à la bioinformatique nous a permis de développer un outil de détection des différents types de DI-RNAs (délétion, *copy-back* ou *snap-back*) à partir de données NGS. Nous avons validé cet outil et montré sa supériorité vis-à-vis des techniques classiques de RT-PCR et RT-qPCR, qui restent cependant utiles pour la confirmation et la quantification. Cet outil est mis à disposition en ligne gratuitement.

**Some supplementary files may need to be viewed online via your Referee Centre at <http://mc.manuscriptcentral.com/nar>.**

**DI-tector: defective interfering viral genomes detector for next generation sequencing data**

Journal:	<i>Nucleic Acids Research</i>
Manuscript ID	NAR-01209-2018
Manuscript Type:	1 Standard Manuscript
Key Words:	copy-back, panhandle, NGS, defective interfering viral genome, viral replication

SCHOLARONE™  
Manuscripts

## ***DI-tector*: defective interfering viral genomes detector for next generation sequencing data**

Guillaume Beauclair<sup>1,2,\*</sup>, Marie Mura<sup>1,2,3</sup>, Chantal Combredet<sup>1,2</sup>, Frédéric Tangy<sup>1,2</sup>, Nolwenn Jouvenet<sup>1,2,\*</sup>, Anastassia V. Komarova<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Unité de Génomique Virale et Vaccination, Institut Pasteur, Paris, 75015, France

<sup>2</sup> CNRS UMR-3569, Paris, France

<sup>3</sup> Unité des Biothérapies anti-infectieuses et Immunologie, Institut de Recherche Biomédicale des Armées BP73, Brétigny-sur-Orge, 91223, France

\* To whom correspondence should be addressed. Tel: +33(0) 145 688 561; Fax: +33(0) 140 613 167; Emails: guillaume.beauclair@pasteur.fr; nolwenn.jouvenet@pasteur.fr; anastasia.komarova@pasteur.fr

### **ABSTRACT**

Defective interfering (DI) genomes are truncated viral genomes generated during replication of most viruses, including live viral vaccines. Among these, 5' panhandle DI genomes are generated during RNA virus replication. They include 5' snap-back and 5' copy-back DI genomes, which are highly relevant for viral pathogenesis since they harbour immunostimulatory properties that increase virus recognition by the innate immune system of the host. We have developed *DI-tector*, a user-friendly and freely program that identifies and characterizes panhandle genomes from Next Generation Sequencing (NGS) data. *DI-tector* confirmed the presence of 5' panhandle genomes in cells infected with measles virus (MV). *DI-tector* also identified a novel 5' panhandle genome, as well as a variety of 3' panhandle genomes whose existence had not previously been detected by conventional approaches in MV-infected cells. The presence of these novel panhandle genomes was confirmed by RT-qPCR and RT-PCR, validating the ability of *DI-tector* to reveal the landscape of DI genome population in infected cell samples. Performance assessment using different experimental and simulated datasets revealed the robust specificity and sensitivity of *DI-tector*. We propose *DI-tector* as a universal tool for the unbiased detection of DI viral genomes, including 5' panhandle DI genomes, in NGS data.

### **INTRODUCTION**

Defective interfering (DI) genomes are truncated forms of viral genomes generated by most viruses during viral replication. DI genomes possess the minimum nucleotide sequences required for their replication but are unable to replicate in the absence of the replicative viral machinery provided by full-length genomes (1). Moreover, DI genomes retain a packaging signal and are thus encapsidated together with newly assembled viral particles and transmitted between hosts (2). *In vitro*, DI genomes have been detected during replication at high multiplicity of infection (MOI) for most RNA and DNA viruses (3–5). Importantly, they have been identified in patients infected with influenza virus (6, 7), dengue virus (8), hepatitis C virus (9) and respiratory syncytial virus (10), as well as in live attenuated viral vaccine batches that are used safely and efficiently on a large scale for human vaccination (11–14). DI genomes production during viral replication is highly relevant for viral pathogenesis due to

1  
2  
3 their immunostimulatory properties that increase virus recognition by the innate immune system of the  
4 host (7, 10, 15). Therefore, the identification of DI genomes during viral infection, in viral stocks or live  
5 attenuated vaccines batches is of great importance and there is a need for accessible tools to detect  
6 them.  
7

8 Three main classes of DI genomes exist: simple and multiple internal deletions, mosaic or complex  
9 DI genomes (including insertions), and 5' panhandle genomes that include 5' snap-back and 5' copy-  
10 back DI genomes (Figure 1) (1, 16). 5' panhandle genomes are described most exclusively for RNA  
11 viruses belonging to the order *Mononegavirales* (*Paramyxoviridae* and *Rhabdoviridae* families). Snap-  
12 back and copy-back DI genomes share similar RNA structure, *i.e.* a double-stranded stem formed by  
13 the opposite sensed 5' and 3' ends of the DI genome and with complementary blunt ends bearing a  
14 5'-triphosphate (Figures 1e and 1d) (17–19). Only 5' panhandle genomes, containing a copy of the  
15 antigenomic promoter at both RNA ends, have been identified so far (1). This is possibly because the  
16 5' end antigenomic promoter (assigned as trailer) of *Mononegavirales* genomes is stronger than the 3'  
17 end genomic promoter (assigned as leader) (20). 5' panhandle genomes are generated when the viral  
18 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), due to a yet unknown mechanism, detaches from the  
19 positive-sense antigenome template and reattaches itself to the negative-sense strand nascent  
20 product to copy it back, forming a 5' panhandle structure (Figures 1e and 1d) (reviewed in (1, 15, 16)).  
21 The position at which the RdRp detaches defines the breakpoint site (BP), and the position at which  
22 the RdRp reattaches to the nascent strand defines the reinitiation site (RI). The stem and loop sizes of  
23 the hairpin structure varies from one panhandle genome to another (21, 22). Thus, the way to identify  
24 panhandle genomes is to detect a switch of strand polarity at different positions on the genome. We  
25 have previously detected, by classical PCR amplification and Sanger sequencing approaches, the  
26 presence of 5' panhandle genomes of length varying from 402 to 2,094 nt in cells infected with  
27 differently modified recombinant measles viruses (MV) but not with low passage MV Schwarz vaccine  
28 strain (21, 23, 24). We and others have shown that 5' panhandle genomes efficiently activate type-I  
29 interferon (IFN) production *via* recognition by the cytosolic RIG-I-like receptors (RLR) (21, 23–29).  
30  
31

32 Next generation sequencing (NGS) provides useful datasets to detect various DI genomes.  
33 Mappers that identify aberrant junctions might be exploited to identify deletion type of DI genomes,  
34 which resembles mRNA splice variants. However, such analyses require some bioinformatics  
35 knowledge to correctly search for signs of the presence of these types of DI genomes in the alignment.  
36 Several methods aiming at robustly and accurately detect DI genomes harbouring deletion from deep  
37 sequencing datasets have been proposed (6, 30, 31). In addition, diverse tools have been developed  
38 like Paparazzi (32) or ViReMa (33). However, none of these tools can easily detect nor classified  
39 panhandle genomes.  
40  
41

42 We present here *DI-tector*, a user-friendly and freely program, that enables detection of  
43 deletion/insertion DI genomes but also of panhandle genomes in deep sequencing datasets. We  
44 exploited published NGS datasets obtained from human cells infected with two members of the  
45 *Paramyxoviridae* family: MV and Sendai virus (SeV), which are both known to produce 5' panhandle  
46 genomes. We validated *DI-tector* algorithm *in silico* and *in cellulo* and showed its superiority to  
47 conventional approaches for detection of panhandle DI genomes. In addition, *DI-tector* identified for  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57

1  
2  
3 the first time 3' panhandle genomes in both MV and SeV samples. We validated the existence of one  
4 of these novel MV 3' panhandle genomes using conventional approaches.  
5

## 6 7 **MATERIAL AND METHODS**

8  
9 Our DI genome detection protocol comprises four main steps: (i) alignment of reads against host and  
10 viral genomes, (ii) unmatched and mismatched reads segmentation, (iii) second alignment of reads  
11 against viral genome and (iv) analyses of the matched reads, as detailed below (Figures 2 and 3).  
12 These steps involved commonly used pre-existing tools such as *bwa* (34) and *samtools* (35).  
13 Analyses and graphical representation of the results are proposed respectively as a python script  
14 freely available at [www.di-tector.cyame.eu](http://www.di-tector.cyame.eu) and a webtool at the same address. Figures 4, 7, 8 and  
15 Supplementary figures 2, 3 and 4 have been generated using a custom R script and R Studio (36).  
16 *ggplot2* (37), *readr* (38) and *gridExtra* (39) packages are required. Confirmation of newly discovered  
17 viral 5' panhandle genomes implied usage of *bwa*, *samtools* and *bedtools* (40).  
18  
19  
20  
21

### 22 **Raw data**

23  
24 *DI-tector* pipeline proceeds with adaptor sequence trimmed fastq files generated from the  
25 sequencer. Reads quality may be evaluated by FastQC  
26 ([www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/)) and reads can be quality trimmed when  
27 necessary. Fastq files (Single-end Read) for MV and recombinant MV that is unable to express the V  
28 protein (rMV- $\Delta$ V) have been previously generated in our laboratory (24). Briefly, infected HEK-293  
29 cells stably expressing One-STrEP-tagged RIG-I or Cherry protein were lysed with MOPS lysis buffer  
30 (20 mM MOPS-KOH pH7.4, 120 mM of KCl, 0.5% Igepal, 2 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol), supplemented  
31 with 200 unit/ml RNasin (Promega) and Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche). An aliquot of  
32 each cell lysate was used to perform total RNA purification using TRI Reagent LS (Sigma). The  
33 remaining of cell lysate was kept to purify the RIG-I/RNA, or Cherry/RNA complexes by affinity  
34 chromatography using StrepTactin Sepharose High Performance beads (GE Healthcare). RNAs that  
35 had co-precipitated with either RIG-I or Cherry proteins, were isolated using TRI Reagent LS. RNA was  
36 dissolved in DNase-free and RNase-free ultrapure water. Extracted RNAs were analysed using  
37 Nanovue (GE Healthcare) and Bioanalyser RNA nano kit (Agilent). 300 ng of each RNA sample were  
38 treated for library preparation using the Truseq Stranded mRNA sample preparation kit (Illumina).  
39 Sequencing was performed on the Illumina Hiseq2000 platform to generate single-end 51 bp reads  
40 bearing strand specificity (24). Three biological experiments were performed.  
41  
42  
43  
44  
45  
46

47 Datasets of Sendai virus (SeV) infected Huh-7 cells were retrieved on NCBI (Illumina, NextSeq  
48 500) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/sra](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra), accession number SRX2600182 and SRX2600183).  
49

50 Reference sequence used in this study are GRCh38.p11 for Human genome  
51 (GCF\_000001405.37\_GRCh38.p11\_genomic), NCBI reference sequence FJ211590.1 for MV (strain  
52 Schwarz), and NC\_001552.1 for SeV. Fasta files containing human and viral genome sequences  
53 were indexed using the *bwa index* tool.  
54  
55

### 56 **Alignment against host and viral genomes**

1  
2  
3 The first step of the workflow consists in an alignment of the reads against the host genome (Figure  
4 2i). This step aims at discarding reads that map to the host genome and may partially map to the viral  
5 genome after segmentation, and at reducing the working file size. For example, MV and rMV-ΔV  
6 datasets were generated from total RNA samples coming from infected cells and contained mostly  
7 reads mapping the human genome (≈98%). This step uses a combination of *bwa mem* and *samtools*  
8 *view* with the parameters *-bS -f4*. An additional step consists in an alignment of the reads against the  
9 viral genome of interest, in order to exclude reads perfectly mapping the viral genome. Therefore, only  
10 unmapped reads are further analysed. Of note, clipped reads (*i.e.* CIGAR motif contain S or H) are  
11 also conserved. Some of these reads may map to viral genome recombination junctions that are  
12 present in DI genomes.  
13  
14  
15  
16

### 17 Reads segmentation

18  
19 The second step consists in a segmentation of each unmapped read into two pieces, assigned "first"  
20 and "last" segments (Figure 2ii). This step allows the mapping of reads that contain junctions of the DI  
21 genomes, with first and last segments mapping each side of the junction. Moreover, in the case of  
22 panhandle genomes, each part of the initial read will map to forward and reverse strands of the viral  
23 RNA.  
24  
25

26 As the position of the junction will be randomly covered by the reads, for each single read the first  
27 segment size will vary from X to N-X nucleotides and the last segment from N-X to X (where N is the  
28 initial length of the read and X the minimum segment length defined by the user using the parameter  
29 "--Min\_Segment") (Figure 2 ii). Increasing the range of segmentation (*i.e.* decreasing the X value)  
30 may increase the number of DI genomes detected, at the expense of working file size and time of  
31 analysis (Supplementary Figure 2).  
32  
33  
34

### 35 Alignment of segmented reads against the viral genome, analyses of matched reads and 36 characterisation of DI genome sequences

37  
38 The third step consists in an alignment of the segments against the viral genome of interest using *bwa*  
39 *aln*, *bwa samse* (Figure 2iii). For the last step, only QNAME (read names), FLAG, RNAME (reference  
40 names), POS (position), MAPQ (mapping quality), CIGAR, SEQ (sequence of the segment), and MD  
41 tag values (string for mismatching positions) are collected (Figure 2 iv). Reads for which the first  
42 and/or the last segments are unmapped or multimapped are not further processed. Then FLAG  
43 values for both read segments are compared to allow DI genomes clustering by the nature of their  
44 junctions (Figure 3). If the two fragments map to different reference strand, these reads will be  
45 processed to uncover panhandle genomes. If the two fragments map to the same reference strand,  
46 positions of the two fragments will be compared to characterise deletion/insertion forms of the DI  
47 genome. To define BP and RI sites, position between first and last segments of the reads are  
48 compared. These positions are adjusted to take in consideration MD tag value (*i.e.* mismatch, deletion,  
49 or clip). The user can define filtering values allowing to discard reads covering junction with low  
50 mapping quality or small insertion/deletion. The size filtering step is not applied to panhandle  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 genomes detection to avoid exclusion of snap-back DI genomes, as they are characterized by small  
4 loops, *i.e.* a small delta between fragments positions.

5 Individual discovered DI genome entities are counted and sorted by type (5' panhandle, 3'  
6 panhandle genomes, insertions, or deletions). Results are exported in four main text format files.  
7 *"\*\_summary.txt"* which recapitulates initial command line parameters and the total number of reads  
8 mapping a junction of each type of DI genomes. *"\*\_counts.txt"* lists all DI genomes with their  
9 respective counts and percentage, type, length, BP and RI sites. Information concerning the length of  
10 the insert/deletion or loops is also mentioned. *"\*\_output\_sorted.txt"* lists all reads overlapping a  
11 junction. For each read, DI genome length, BP, RI, delta position between BP and RI, segmentation  
12 of the read, MAPQ, RNAME, CIGAR, MD, POS (for both segments), QNAME values are mentioned.  
13 Sequence of the read is printed in upper-case letter before the junction and lower-case letter after.  
14 Sequence of each DI genome can be generated and exported as a multifasta file *"\*\_fasta.fa"*.  
15 Intermediate fastq and sam format files are also generated for potential further manual analyses.  
16 *"\*\_Error.txt"* and *"\*\_Ali.txt"* contain respectively error messages and a list of putatively correctly  
17 aligned segment that passed previous filters, mostly due to too many mismatches during alignment  
18 against the viral genome.  
19  
20  
21  
22  
23  
24

### 25 ***DI-tector* parameters**

26  
27 *DI-tector* uses several parameters to process data. *"Virus\_Ref"* and *"Input\_Data"* are mandatory  
28 strings to define paths to files for respectively the indexed viral genome sequence and raw data file in  
29 fastq format (or fasta format if parameter *"-f"* or *"--Fasta"* is used). In addition, users can provide host  
30 genome reference indexed sequence, using *"-g"* or *"--Host\_Ref"*, to perform optional alignment  
31 against host genome (Figure 2i).  
32  
33

34 Two important parameters are *"-s"* or *"--Min\_Segment"* and *"-n"* or *"--Nb\_Reads"* which  
35 respectively allow to setup minimum segment length (Default is 15) and show only DI genomes with  
36 count reads superior to *"--Nb\_Reads"* value (Default is 1).  
37

38 Several other parameters can be setup by the users, such as *"-m"* or *"--Min\_MAPQ"* to skip  
39 alignments with MAPQ smaller than the mentioned value (Default is 25), *"-l"* or *"--InDel\_Length"* to  
40 skip alignments with size of InDels smaller or equal to the mentioned value (Default size is 1), *"-x"* or  
41 *"--Nb\_threads"* for the number of threads to use (Default is 1), *"-o"* or *"--Output\_Directory"* for directory  
42 name where all compiled output files will be saved, *"-t"* or *"--Tag"* for tagging file names, or *"-k"* or *"--*  
43 *Keep\_files"* to keep or not intermediate files (*i.e.* alignment etc.). Basic help on parameters can be  
44 accessed using *"-h"* or *"--help"*.  
45  
46  
47

### 48 **Assessment of *DI-tector* detection performance**

49  
50 The detection performance of *DI-tector* was evaluated using three simulated datasets generated  
51 independently. They respectively contain 500,000 simulated reads covering junctions of 5' copy-back  
52 ("5' cb"), 3' copy-back ("3' cb") DI genomes, or DI genomes with insertion/deletion ("INDEL"). These  
53 datasets were generated as follows: two times 500,000 random values from 1 to 15,894 (MV genome  
54 length) were generated respectively for BP and RI sites. This step was repeated individually for each  
55  
56  
57  
58  
59  
60

dataset. For each combination of BP and RI values, a random value (J) between 1 and 50 (51 nt reads length - 1) was generated. We generated 51 nt-long reads since the experimental dataset for MV and rΔV-MV samples contained 51 nt-long reads. For the dataset "INDEL", sequences of MV genome from BP to BP+J and RI to RI+(51-J) were combined. For the dataset "5' cb", first part of the read (i.e. from BP to BP+J) was reverse complemented. In a similar manner, second part of the simulated reads (i.e. RI to RI+(51-J)) was reverse complemented to generate "3' cb" dataset. Sensitivity (Sn) and specificity (Sp) were calculated as follows:  $Sn = TP / (TP + FN)$ ;  $Sp = TN / (TN + FP)$ . TP (true positive) and FN (false negative) are respectively correctly and incorrectly detected 5' copy-back junction in "5' cb" dataset. FP (false positive) and TN (true negative) are respectively clustered as 5' copy-back junction or not in "INDEL" dataset. Datasets from non infected cells (total or beads) (Vabret *et al.* in preparation) were also analysed to estimate putative FP from host material.

### Confirmation of newly discovered viral DI genome

To confirm the existence of reads mapping to the newly discovered recombination junction (BP and RI sites for DI\_336), datasets were mapped to DI\_336 and, in parallel, to DI\_1236 indexed sequence using *bwa mem*, sorted and indexed using *samtools sort* and *samtools index*. Only reads mapping the recombination junction were represented (Supplementary figure 1).

### RT-qPCR and RT-PCR detection of panhandle genomes

HEK293T cells were seeded into T25 flasks one day before infection. Recombinant MV infections were carried out at MOI of 1. Virus stocks were diluted with Opti-MEM to obtain a final inoculum volume of 2 ml. Cells were incubated with virus for 2 hours at 37°C. Then, 4 ml of DMEM containing 10% FBS were added in each T25 flask, and cells were incubated at 37°C until infections were stopped by cell lysis 24 hours later. Total RNA was extracted with the RNeasy mini kit (Qiagen). Quality and quantity of extracted RNAs were analysed using Nanovue and Bioanalyser RNA nano kit. RT-qPCR analysis was performed using Applied Biosystems StepOnePlus technology. DI and viral genome primers and probes were designed using Primer Express software (Applied Biosystems). Reactions were performed on 400 ng of total RNA by use of TaqMan RNA-to-Ct 1-Step kits (Thermo Fisher Scientific) for one-step RT-qPCR analyses according to the manufacturer's protocol. Reactions were performed in a final volume of 20µl in the presence of 100 nM TaqMan DI\_336 (TGA CTT GGA TAG ATT CTT-FAM) or Genome (CAT CAG AAT TAA GAA AAA CGT AG-VIC) -specific probe and 100 nM DI\_336 or Genome-specific forward (DI\_336: CCC CCG TCA TAA TAA TCT GTT TCT; Genome: TCA GGC ATA CCC ACT AGT GTG AA) and reverse (DI\_336 : ACC ACC TAG GGC AGG ATT AGG; Genome: TGA CAG ATA GCG AGT CCA TAA CG) primers.

3' panhandle genome detection by RT-PCR was performed on RNA samples from MV infected cells, prepared as above. First-strand complementary DNA (cDNA) synthesis was performed on 500 ng of total RNA in a final volume of 20 µl with the RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) using primer F1 (AAA GTT GGG TAA GGA TAG) according to the manufacturer's protocol. 2 µl of the above RT reaction and Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) was used for PCR reaction and in accordance with the manufacturer's protocol. Amplicon of



DI\_2202 was generated using primers F307 (CCA AAC TAA CAG GGG CAC TAA TAG G) and F677 (TTC GGA GCT AAG AAG GTG GA) and sent for Sanger sequencing for sequence confirmation.

## RESULTS

### ***DI-tector* detects various types of DI genomes**

The *DI-tector* protocol consists of four steps: (i) alignment of reads against the host and viral genomes, (ii) unmatched reads segmentation, (iii) second alignment against the viral genome and (iv) analyses of the matched reads (Figure 2). *DI-tector* does not require any pre-treatment of the original deep sequencing dataset beyond standard adapter sequences trimming and quality-filtering. Alignment against the host genome in the first step is optional but is recommended since it may improve specificity results and accelerate the analytic process by decreasing the number of reads and discarding potential human contamination. Mapping against the viral genome is another way to reduce the dataset size. Unmapped, or not perfectly mapped reads with mismatches, insertions, or clips, are considered as reads potentially containing recombinant junctions corresponding to DI genomes. Removal of duplicated reads speeds up the analysis. For the second step, a high number of segments positively correlates with a higher number of detected DI genomes but slow down the analysis (Supplementary figure 2). For faster overview analyses, we believe that few segmentations of the reads are more than sufficient to detect highly represented DI genomes. Our *DI-tector* generates as output several files containing all the information needed to define DI genome sequences.

### **Characterisation of DI genomes identified by *DI-tector* in MV and rMV- $\Delta$ V samples**

During our previous studies, we generated several NGS datasets from human cells infected with either MV Schwarz strain or with a recombinant version of this strain that is unable to express the V protein (rMV- $\Delta$ V). The latter virus is known to produce 5' panhandle genomes, contrary to the Schwarz strain (21, 24). In order to study viral RNA signatures on RLR receptors, in the Sanchez David *et al.* study we performed affinity chromatography purification of RIG-I using cells overexpressing recombinant RIG-I protein fused to One-STrEP-tag (ST). As control for RNA-nonspecific binding, we also used cells overexpressing a ST-Cherry protein. This previous work has generated datasets from MV and rMV- $\Delta$ V infected samples, including RNA samples before (Total) or after purification (Beads) on ST-Cherry or ST-RIG-I cells and obtained in triplicates (24). We analysed these datasets using *DI-tector*. We mainly focused on panhandle genomes.

In our analysis, the two 5' panhandle genomes exhibiting the most reads were a 336 nt-long DI (DI\_336) and a 1,236 nt-long DI genome (DI\_1236) (Figure 4a). All other panhandle genomes from MV and rMV- $\Delta$ V infected ST-RIG-I or ST-Cherry cells (total and beads samples) were supported only by very little numbers of reads. These species might be poorly represented in the sample or be false positive and were thus not analysed. *DI-tector* found both DI\_336 and DI\_1236 in RNAs specifically associated with RIG-I upon infection with rMV- $\Delta$ V (Figure 4). DI\_1236 is a previously identified 5' panhandle genome that results from a BP at position 14,861 and a RI at 15,694, with one nucleotide

1  
2  
3 insertion (24). The exact position of BP and RI for 5' panhandle genomes may be ambiguous, for  
4 instance when the nucleotides immediately upstream of the BP site are identical to the nucleotides  
5 immediately upstream of the RI site. Similar phenomenon is also observed for 3' panhandle genomes  
6 and insertion/deletion DI genomes, leading to several possible combinations of BP/RI sites that result  
7 in identical sequences. Both positive and negative strands of DI\_1236 were detected with *DI-tector*.  
8 DI\_336, which was not previously identified using conventional techniques, resulted from a BP at  
9 position 15,651 and a RI at 15,803 and both strands were detected in the dataset. To our knowledge,  
10 this is the first identification of such a short MV DI genome. Of note, this newly-identified DI\_336  
11 follows the "rule of six" postulating that for the paramyxovirus subfamily *Paramyxovirinae*, only  
12 panhexameric-length (6n+0) genomes are replicated efficiently (41). This observation re-enforces the  
13 potential existence of DI\_336.  
14

15 Surprisingly, several 3' panhandle genomes were detected in our datasets. In contrast to 5'  
16 panhandle genomes, which were characterised by a first read segment mapping to the reverse strand  
17 and a last read segment on the forward strand, 3' panhandle genomes were identified by a first and a  
18 last segment mapping the forward and reverse strands, respectively (Figure 3). However, 3'  
19 panhandle genomes detection was generated from a low number of reads and could thus be false  
20 positives.  
21

#### 22 **Confirmation of newly discovered junctions in viral 5' panhandle genomes**

23 Existence of the putative DI\_336 genome revealed by *DI-tector* was further examined by depicting  
24 number of reads overlapping its recombination junction (Supplementary figure 1). For this, reads  
25 obtained by sequencing RNA purified on RIG-I from cells infected with rMV- $\Delta$ V (sample #1) were  
26 mapped to the newly discovered DI\_336 and, as a positive control, the well-characterized DI\_1236.  
27 Reads mapping to the recombination junction on both strands of the viral genome were observed,  
28 confirming the nature of the 5' panhandle genomes associated with RIG-I (Supplementary figure 1).  
29 Of note, by analysing CIGAR information from sam files generated by mapping the human-depleted  
30 reads from rMV- $\Delta$ V to the viral genome (or using, for example, Tablet (42)), we observed some soft  
31 clip (*i.e.* bases in 5' or 3' of the read that are not part of the alignment) at positions 14,861, 15,694,  
32 15,651 and 15,803. These positions correspond to BP and RI sites for DI\_1236 and DI\_336 (data not  
33 shown). We also observed several other clips but, after manual analysis, the unmapped part of the  
34 read was composed of only few nucleotides. These clips were most likely due to the lower quality of  
35 the read extremities. Analysing the reads covering the recombination junction also allowed the  
36 identification of a single-nucleotide insertion in the DI\_1236 genome sequence, as previously reported  
37 by conventional approaches (24).  
38

#### 39 **Validation of the presence of DI\_336 by RT-qPCR in rMV- $\Delta$ V infected cells**

40 In order to test the robustness and accuracy of our DI-detector approach and to validate the existence  
41 of the 5' copy-back DI\_336 in rMV- $\Delta$ V infected cells, we performed an RT-qPCR analysis on total  
42 RNA extracted from Vero cells infected with rMV- $\Delta$ V or with MV as negative control (Figure 5). As  
43 expected, DI\_336 genome was detected only in RNA extracted from HEK293T cells infected with  
44 rMV- $\Delta$ V (Figure 5). These experiments validate the presence of DI\_336 in rMV- $\Delta$ V infected cells by  
45  
46  
47  
48  
49

1  
2  
3 classical approaches and thus highlights the power of *DI-tector* to reveal the landscape of the DI  
4 genome population.

### 5 6 **Validation of the presence of 3' panhandle genome in MV infected cells**

7  
8 As 3' panhandle genomes were never characterised before, we decided to validate their existence in  
9 MV infected cells by RT-PCR (Figure 6). An amplicon of around 1,200 bp was observed on agarose  
10 gel. Sequencing of the PCR product by Sanger sequencing allowed us to identify for the first time a  
11 2,202 nt-long 3' panhandle genome (DI\_2202) generated from a BP at position 1,728 and a RI at 474,  
12 which is compatible with the expected amplicon size of 1,218 bp observed on the gel. These results  
13 confirmed the existence of previously unknown 3' panhandle genome species that *DI-tector* identified  
14 in different NGS datasets for MV and SeV (data not shown) samples, with yet unknown functions.  
15 Importantly, the identified MV DI\_2202 respected the "rule of six".  
16  
17  
18

### 19 **Impact of ribosomal RNA depletion on SeV DI genomes detection**

20  
21 MV DI\_1236 and DI\_336 were easily detected in RNA samples after enrichment on RIG-I (Figure 4a),  
22 however their junctions remained poorly covered in total RNA samples purified from infected cells. A  
23 classical way to increase proportion of viral reads in NGS analysis is to treat the samples with  
24 RiboZero™, which removes all ribosomal RNAs (43). We took advantage of published datasets  
25 generated from total RNA extracted from SeV infected cells to evaluate the impact of viral RNA  
26 enrichment over total RNA by ribosomal RNA depletion. Upon analysis of these SeV datasets, we  
27 observed that panhandle genomes detection was greatly enhanced with the RiboZero™ treatment  
28 (Figure 7). Importantly, we detected around five times more unmatched and mismatched reads after  
29 filtering against host and viral genomes. Therefore, increasing the proportion of viral reads improves  
30 the sensitivity of the DI genomes detection, which is useful since DI genomes entities are often poorly  
31 represented in total RNA populations.  
32  
33  
34  
35

### 36 **Sensitivity and specificity of *DI-tector***

37  
38 To assess the sensitivity and specificity of *DI-tector*, we analysed both datasets from non-infected  
39 cells and three simulated datasets. Datasets generated from non-infected cells were composed of  
40 sample before (Total) or after (Beads) purification on ST-Cherry or ST-RIG-I beads, all in triplicates.  
41 We failed to detect any DI genomes in datasets from non-infected cells, suggesting that reads  
42 covering DI genome junctions predicted from *DI-tector* analysis were not generated from aberrant  
43 host or viral sequences or any other contaminant sequences (data not shown).  
44  
45  
46

47 We also generated three simulated datasets, each containing 500,000 reads of 51 nucleotides  
48 covering randomly the junction of 500,000 random and unique 5' or 3' panhandle genomes, or DI  
49 genomes with insertion/deletion. These datasets are constituted of equal number of reads harbouring  
50 a junction at a read position ranging from 1 to 50. As we focused on the identification of 5' panhandle  
51 genomes from the simulated datasets, the dataset containing the 5' panhandle sequences was used  
52 to assess the sensitivity of *DI-tector*, and the two other datasets were used to determine *DI-tector*  
53 specificity (Figure 8). Each read classified as a 5' panhandle genomes was analysed to confirm  
54 whether the predicted BP and RI sites were similar to the theoretical ones (5' cb/sb TP) or not (5'  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 cb/sb FP), where TP and FP stand for true positive and false positive respectively. Of note, analysis  
4 of the 3' panhandle genomes dataset failed to predict any 5' panhandle sequences, resulting in a  
5 specificity of 100% for this dataset. To investigate further the specificity of *DI-tector*, we used a less  
6 favourable dataset, which is composed of 500,000 reads covering junction of genomes with  
7 insertion/deletion (250,000 each) (Figure 8b). We observed a sensitivity decreasing from around 65  
8 and 60% to 15 and 10% respectively for "--Min\_MAPQ" parameters of 25 and 26, when "--Min-  
9 Segment" parameter range from 5 to 25 (half of the read length) (Figure 8a and 8b). Low sensitivity at  
10 "--Min-Segment" value close to 25 was expected since the detected junction should be at the middle  
11 of the reads. Nevertheless, we reached good sensitivity at lower value of the "--Min-Segment"  
12 parameter. However, the number of 5' copy-back FP genome increased when "--Min-Segment"  
13 parameter decreased but remained low (Figure 8a). Few DI genomes with insertion or deletion were  
14 detected from this dataset (Figure 8a).

15  
16 We then categorized the clustering of the reads in "5'cp", "3'cp", "insertion" or "deletion" group  
17 based on the original position of the junction in the simulated read (Figure 8c). We also represented  
18 reads that were aligned during filtering, i.e. mapping entirely directly to the viral genome (Figure 8c,  
19 "Viral", dark purple) or after segmentation (Figure 8c, "Aligned", light purple). Those were only  
20 observed when the junction was situated at the extremity of the reads. This was not surprising as  
21 reads with minor differences at the sequence extremity should be treated with care as they may result  
22 from sequencing mistakes or polymorphisms. False discovery of insertion or deletion (Figure 8c,  
23 "Insertion" and "Deletion", yellow and green) occurred also at the sequence extremity, likely for the  
24 same reasons. To identify potential false positive (Figure 8c, "5' cb/sb FP", pink), we compared  
25 predicted and real BP and RI positions on the viral genome for all 5' panhandle genomes detected.  
26 True positive (Figure 8c, "5' cb/sb TP", red) represent a major part of the 5' panhandle genomes  
27 detected (Figure 8a). Again, FP were observed when the junction is present at the extremity of the  
28 reads. Quantification of the TP and FP 5' panhandle genomes was used to estimate sensitivity (Figure  
29 8b)

30  
31 Similar analyses were performed on "INDEL" and "3' cb" dataset. Few FP 5' panhandle genomes  
32 were founded in "INDEL" dataset, and any in "3' cb" one. Quantification of the FP 5' panhandle  
33 genomes was used to estimate specificity (Fig. 8b). It is important to note that these results were  
34 highly dependent on the dataset used, as using the datasets "3' cb" or the experimental dataset  
35 generated from non-infected sample gave a specificity of 100%.

36  
37 Specificity was close to 100% at almost all "--Min-Segment" values, reflecting the very high  
38 specificity of *DI-tector*. By analysing the impact of "--Min-Segment" parameter in these dataset, we  
39 observed that "--Min-Segment" = 15 was one of the value providing a good combination of sensitivity  
40 and specificity. We thus decided to set it up as a default value in *DI-tector*.

41  
42 In the analysis of these datasets, the global impact of the "--Min\_MAPQ" parameters between 25  
43 or 26 was not important (Supplementary figures 3 and 4). It mostly impacted the detection of junctions  
44 present in the 10th first and the 10th last nucleotides of the reads. It may have a more important  
45 impact when using experimental dataset where sequencing mistake can impact alignment. For a  
46 more accurate characterization of the DI genome present in a dataset, "--Min\_MAPQ" = 26 should be  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 used but it may result in the omission of the detection of some true DI genomes. We thus decided to  
4 use a milder value (*i.e.* "--Min\_MAPQ" = 25) as default.

5  
6 It is important to note that the results in figure 8 are specific for 51 nucleotides long reads. We  
7 observed symmetrical pattern centred on 25 nt value, *i.e.* the half of the reads length. These datasets  
8 are unfavourable to *DI-tector* as they contain 40% of reads with junction in the 10th first and last  
9 nucleotides, where the majority of the FP are found. Analysis of longer reads will give higher  
10 specificity as the proportion of reads with junction after the 10th first and before the 10th last  
11 nucleotides will increase, giving better sensitivity. In this simulated dataset, each 500,000 reads  
12 where unique, nevertheless, in experimental dataset several copies of each DI genomes should be  
13 found, and therefore reads with junction will be found several times. This statement is true if enough  
14 viral material is sequenced when searching for rare events. In addition, results of *DI-tector* can be  
15 curated for entities with few hits. Moreover, if the predicted junction position is close to the extremity,  
16 according to the simulated dataset, the chance to be a FP is higher (Figure 8b) and can be excluded  
17 from further analyses.  
18  
19  
20  
21

### 22 **Online *DI-tector* as a graphic tool for DI genomes representation**

23  
24 Once DI genomes are characterized, using either *DI-tector* or other methods, their RNA sequences  
25 may be graphically represented using online *DI-tector* ([www.di-tector.cyame.eu](http://www.di-tector.cyame.eu)). This graphic tool  
26 allows users to represent predicted DI genomes and their BP and RI positions on the viral genome.  
27 List of DI genome from "\*\_ counts.txt" file or custom list can be used to generate scatter-plot, chord  
28 diagram, sequence logos or representation as on figure 4 (Figure 9). In scatter-plot, BP and RI  
29 positions are respectively used for "x" and "y" axis (Figure 9a). Colour and dot size change according  
30 to DI genome type and frequency. The closer the dot is to the diagonal of the scatter plot, the smaller  
31 the distance difference between BP and RI. This representation is useful to define replicative DI as  
32 the two entities (genome and antigenome) will be symmetrically plotted around the diagonal. Another  
33 option is to represent the data as chords diagram (Figure 9b). For each DI genome identified by *DI-*  
34 *tector*, sequence starts at the viral genome extremity until representing the RdRp jump from BP to RI,  
35 as an arc, and then terminates from RI to genome extremity again. Finally, if the viral sequence is  
36 provided, sequence logos can be represented in frequency or bits units (44). Graphics for the x  
37 nucleotides (defined by the user) before and after the BP or the RI can be generated (Figure 9c). This  
38 representation allows the analysis of specific sequence pattern that may appear before and/or after  
39 BP and RI sites. All graphs are created as pictures and can be easily exported without any  
40 programming language knowledge, either by copy/paste or saving as image.  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47

### 48 **DISCUSSION**

49  
50 For decades detection and characterisation of DI viral genomes have been performed by northern  
51 blotting, RT-PCR, and Sanger sequencing (1, 15). These approaches can be now completed by more  
52 recent techniques such as NGS. Indeed, methods to detect DI genomes from deep sequencing  
53 datasets have been already proposed (6, 30, 31) and diverse tools have been developed like, for  
54 example, Paparazzi (32) or ViReMa (33). They allow detection of DI genomes harbouring deletion or  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 mosaic recombination. Nevertheless, to our knowledge, none of these tools are able to easily detect  
4 nor classified panhandle genomes. We therefore propose *DI-tector* as a tool that allows detection of  
5 BP and RI of DI genomes from deep sequencing dataset in an unbiased manner. This program  
6 characterises all potential DI genomes in the population, contrary to classical PCR amplification,  
7 which requires specific primers, assuming that the type of DI genomes searched is known. Moreover,  
8 *DI-tector* allows the use of a unique dataset to detect various type of DI genomes, even for instance  
9 from co-infected samples. *DI-tector* is available as a free python script at [www.di-tector.cyame.eu](http://www.di-tector.cyame.eu).  
10 Graphical outputs, such as scatter-plot, chord diagram, sequence logo and linear representation of DI  
11 genomes, can be generated using the complementary online *DI-tector* ([www.di-tector.cyame.eu](http://www.di-tector.cyame.eu)).  
12  
13  
14

15 One of the key step of *DI-tector* is unmatched reads segmentation (Figure 2 ii). During this  
16 segmentation step, reads are split to detect recombination junction, which occurred at least after the  
17 first X, and before the last X, nucleotides of the read (where X is defined by the user). This obviously  
18 excludes some reads overlapping the junction closer to extremities. This is mostly the case for the last  
19 read segment as this region is known to have lower quality compared to the beginning of the reads  
20 with Illumina technology. However, the excluded reads can still be estimated after the second  
21 mapping described above but have to be analysed carefully to be sure that they really cover the  
22 junction and not just map to it because the beginning of the reverse sequence from one of the part of  
23 the DI genome is identical to the genomic sequence just after/before the junction. The exact site of  
24 recombination is sometimes ambiguous when the nucleotides immediately after the BP are identical  
25 in the reference sequence and in DI sequence at the junction site. Therefore, several possible  
26 combinations of BP and RI can be observed for the same junction site. Nevertheless, distance  
27 between BP and RI, DI size and sequence will remain unchanged allowing the user to correctly  
28 characterize the DI.  
29  
30  
31  
32  
33

34 Putative DI genomes sequences determined by *DI-tector* must be confirmed *in silico*. One  
35 approach is to map all reads to the DI genome sequence. This allows the user to determine how  
36 many reads overlap the recombination junction and to identify the potential presence of reads  
37 mapping to both positive and negative strand, which is expected since DI genomes possess minimal  
38 signals for their replication. Stacked ladder-like pattern of short reads across the fusion point should  
39 be observed (Supplementary figure 1). A another particular attention has to be made to check if  
40 mapping is not in repetitive region, explaining why distance between the first and last read segment is  
41 not as expected. This step should allow the user to exclude obvious mapping artefact. Potential  
42 duplicated read and read quality can be checked to reject ambiguous mapping.  
43  
44  
45

46 During this confirmation step, we observed that coverage at recombinant junction is poor in certain  
47 conditions, mainly in total RNA samples purified from infected cells. This is likely explained by the fact  
48 that around 99% of the reads of our datasets mapped to the human genome. Moreover, for some  
49 panhandle genomes, we were looking at an area at the extremity of the genomes, which are less  
50 covered. A recommendation is to have enough depth to avoid non-detection of certain DI genome  
51 sequences (mostly panhandle genomes) and increase confidence in case of poorly covered  
52 recombination junction. Starting from purified viral stocks may be a solution to drastically reduce  
53 human read contaminants, but it may change the pattern of DI genomes.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 Several enrichment techniques may be used to increase sequencing depth (Mertes et al., 2011),  
4 and therefore improve DI genomes detection sensitivity. We compared data generated from samples  
5 treated or not with RiboZero™ and clearly observed an improvement of panhandle genomes  
6 detection (Figure 7).  
7

8 In this study, we focused on panhandle genomes detection. Analyses of the results obtained with  
9 *DI-tector* showed reproductive results among replicates, which were in agreement with previous  
10 results from our laboratory (24). DI\_1236 was detected only in rMV-ΔV infected cells and was highly  
11 enriched after RIG-I purification. Interestingly, another DI genome of 336 nts was also detected in  
12 RIG-I RNA samples. This 5' panhandle genome had never been detected before due to RT-PCR  
13 technical limitation (position of 5' panhandle genome specific primers). We used RT-qPCR to confirm  
14 the presence of DI\_336 in our sample. This 5' panhandle genome followed the rule of six, a hallmark  
15 shared by a large number of MV DI genomes (21).  
16  
17  
18

19 In addition, we detected and confirmed, for the first time, the existence of 3' panhandle genomes in  
20 MV and SeV samples. Therefore, we revealed a novel aspect a *Paramyxovirus* biology by  
21 demonstrating that, similarly to 5' panhandle genomes which are generated when the viral RdRp  
22 detaches from the positive-sense antigenome template and reattaches itself to the nascent negative-  
23 sense strand, 3' panhandle genomes are generated during the replication of the antigenome from  
24 genome (20). These data highlight the power of the unbiased analysis performed by *DI-tector*.  
25  
26

27 Quantification of DI genomes detected by *DI-tector* is not reliable. This is due to the nature of the  
28 samples. For instance, in MV- and SeV- infected cell samples, reads may come from viral genomes or  
29 viral transcripts. Analysis of non-translated regions may be used for DI genome quantification. This  
30 did not apply to our data since the coverage at genome extremity was lower than the average  
31 coverage. Using non-transcribed intergenic regions may be also a solution, but should be addressed  
32 for each virus and no automatic estimation of the quantity can be done. Moreover, only relative  
33 abundance may be assessed. As solution to quantify the DI genomes detected with *DI-tector* is to  
34 perform qPCR on the samples using specific probes overlapping the junction (21) as the exact  
35 sequence of the recombination junction is given by *DI-tector*.  
36  
37  
38

39 Predictive performance assessment of *DI-tector* using different experimental and simulated  
40 datasets revealed a robust specificity and sensitivity (Figure 8, Supplementary figures 3 and 4). *DI-*  
41 *tector* prediction remains nevertheless poor when the junction is localized in the 10th first and last  
42 nucleotides of the reads. This is the trade-off to avoid higher number of FP detection. To increase the  
43 power of detection we therefore recommend to use longer reads and no shorter than 30 nts, as then  
44 the proportion of these 10 nucleotides at the extremity compared to the size of the read will decrease.  
45 This will not be an issue when DI genomes are plentiful (i.e. represented by several reads) as the  
46 probability that the junction span in the middle of the reads in at least some reads remain favourable.  
47 In case of rare events, we recommend to check the predicted junction position (see  
48 `"*_output_sorted.txt"` file). If the junction is closed to the read extremity (i.e. around 10 nucleotides),  
49 users should keep in mind that they have a higher chance to be FP than when being further away  
50 from the read extremity. Classical techniques with high sensitivity, such as RT-qPCR, should be used  
51 to confirm the existence of these rare entities.  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 In conclusion, *DI-tector* provides a sensitive tool for DI viral genomes discovery, including  
4 panhandle genomes. It characterizes the BP and RI sites, and potential inserted nucleotides between  
5 recombination junctions. It applies to a variety of samples, from purified viral particles to infected  
6 whole cell lysates, if sufficient sequencing read depth is provided, allowing researchers to quickly  
7 identify and characterize different species of DI genomes. This method is useful to characterize DI  
8 genomes of viral populations in various viral and vaccine stocks.  
9

## 11 AVAILABILITY

12  
13 Python script used in this article is available at [www.di-tector.cyame.eu](http://www.di-tector.cyame.eu). Graphical output can be  
14 generated using the freely available online *DI-tector*.  
15

## 17 SUPPLEMENTARY DATA

18  
19 Supplementary Data are available at NAR online.  
20

## 21 ACKNOWLEDGEMENT

22  
23 The authors thank Dr. Elias Hage, Dr. Mickael Orgeur, Dr. Guillaume Cornelis, the Transcriptome and  
24 Epigenome Platform of Institut Pasteur, specifically Rachel Legendre, and all members of "Unité de  
25 Génomique Virale et Vaccination" for advice and discussions. We thank Dr. Bernd Jagla ("Hub  
26 Bioinformatique et Biostatistique", Institut Pasteur) and Dr. Etienne Simon-Lorier ("Génomique  
27 évolutive des virus à ARN", Institut Pasteur) for their critical reading. We also thanks Ségolène  
28 Gracias for help in choosing the online *DI-tector* logo.  
29  
30  
31

## 32 FUNDING

33  
34 This work was supported by the Institut Pasteur, the CNRS, fundings from Agence Nationale pour la  
35 Recherche (ANR-16-CE15-0025-01 to N.J). M.M. was supported by the Institut de Recherche  
36 Biomédicale des Armées (IRBA).  
37  
38

## 39 REFERENCES

- 40  
41 1. Lazzarini,R.A., Keene,J.D. and Schubert,M. (1981) The origins of defective interfering particles of  
42 the negative-strand RNA viruses. *Cell*, **26**, 145–54.  
43  
44 2. Ke,R., Aaskov,J., Holmes,E.C. and Lloyd-Smith,J.O. (2013) Phylodynamic Analysis of the  
45 Emergence and Epidemiological Impact of Transmissible Defective Dengue Viruses. *PLoS*  
46 *Pathog.*, **9**, e1003193.  
47  
48 3. Huang,A.S. (1973) Defective Interfering Viruses. *Annu. Rev. Microbiol.*, **27**, 101–118.  
49  
50 4. Perrault,J. (1981) Origin and Replication of Defective Interfering Particles. In: Springer, Berlin,  
51 Heidelberg, pp. 151–207.  
52  
53 5. Frensing,T. (2015) Defective interfering viruses and their impact on vaccines and viral vectors.  
54 *Biotechnol. J.*, **10**, 681–689.  
55  
56 6. Saira,K., Lin,X., DePasse,J. V., Halpin,R., Twaddle,A., Stockwell,T., Angus,B., Cozzi-Lepri,A.,  
57 Delfino,M., Dugan,V., *et al.* (2013) Sequence analysis of in vivo defective interfering-like RNA  
58  
59  
60



- of influenza A H1N1 pandemic virus. *J. Virol.*, **87**, 8064–74.
7. Vasilijevic, J., Zamarreño, N., Oliveros, J.C., Rodriguez-Frandsen, A., Gómez, G., Rodriguez, G., Pérez-Ruiz, M., Rey, S., Barba, I., Pozo, F., *et al.* (2017) Reduced accumulation of defective viral genomes contributes to severe outcome in influenza virus infected patients. *PLOS Pathog.*, **13**, e1006650.
  8. Li, D., Lott, W.B., Lowry, K., Jones, A., Thu, H.M. and Aaskov, J. (2011) Defective Interfering Viral Particles in Acute Dengue Infections. *PLoS One*, **6**, e19447.
  9. Prince, A.M., Huima-Byron, T., Parker, T.S. and Levine, D.M. (1996) Visualization of hepatitis C virions and putative defective interfering particles isolated from low-density lipoproteins. *J. Viral Hepat.*, **3**, 11–17.
  10. Sun, Y., Jain, D., Koziol-White, C.J., Genoyer, E., Gilbert, M., Tapia, K., Panettieri, R.A., Hodinka, R.L. and López, C.B. (2015) Immunostimulatory Defective Viral Genomes from Respiratory Syncytial Virus Promote a Strong Innate Antiviral Response during Infection in Mice and Humans. *PLOS Pathog.*, **11**, e1005122.
  11. McLaren, L.C. and Holland, J.J. (1974) Defective interfering particles from poliovirus vaccine and vaccine reference strains. *Virology*, **60**, 579–583.
  12. Bellocq, C., Mottet, G. and Roux, L. (1990) Wide occurrence of measles virus subgenomic RNAs in attenuated live-virus vaccines. *Biologicals*, **18**, 337–343.
  13. Holland, J.J. (1990) Defective viral genomes. In B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, T. P. Monath, J. L. Melnick, B.R. & S.E.S. (ed), *Virology*. Raven Press, New York, pp. 151–165.
  14. Wiktor, T.J., Dietzschold, B., Leamnson, R.N. and Koprowski, H. (1977) Induction and biological properties of defective interfering particles of rabies virus. *J. Virol.*, **21**, 626–35.
  15. López, C.B. (2014) Defective viral genomes: critical danger signals of viral infections. *J. Virol.*, **88**, 8720–3.
  16. Dimmock, N.J. and Easton, A.J. (2014) Defective interfering influenza virus RNAs: time to reevaluate their clinical potential as broad-spectrum antivirals? *J. Virol.*, **88**, 5217–27.
  17. Rao, D.D. and Huang, A.S. (1982) Interference among defective interfering particles of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.*, **41**, 210–21.
  18. Baum, A. and García-Sastre, A. (2011) Differential recognition of viral RNA by RIG-I. *Virulence*, **2**, 166–9.
  19. Re, G.G., Gupta, K.C. and Kingsbury, D.W. (1983) Sequence of the 5' end of the Sendai virus genome and its variable representation in complementary form at the 3' ends of copy-back defective interfering RNA species: identification of the L gene terminus. *Virology*, **130**, 390–6.
  20. Finke, S. and Conzelmann, K.K. (1999) Virus promoters determine interference by defective RNAs: selective amplification of mini-RNA vectors and rescue from cDNA by a 3' copy-back ambisense rabies virus. *J. Virol.*, **73**, 3818–25.
  21. Mura, M., Combredet, C., Najburg, V., Sanchez David, R.Y., Tangy, F. and Komarova, A. V. (2017) Non-encapsidated 5' copy-back defective-interfering genomes produced by recombinant measles viruses are recognized by RIG-I and LGP2 but not MDA5. *J. Virol.*, 10.1128/JVI.00643-17.
  22. Pfaller, C.K., Mastorakos, G.M., Matchett, W.E., Ma, X., Samuel, C.E. and Cattaneo, R. (2015)

- 1  
2  
3 Measles Virus Defective Interfering RNAs Are Generated Frequently and Early in the Absence  
4 of C Protein and Can Be Destabilized by Adenosine Deaminase Acting on RNA-I-Like  
5 Hypermutations. *J. Virol.*, **89**, 7735–47.
- 6  
7 23. Komarova, A. V., Combredet, C., Sismeiro, O., Dillies, M.-A., Jagla, B., Sanchez David, R.Y.,  
8 Vabret, N., Coppée, J.-Y., Vidalain, P.-O. and Tangy, F. (2013) Identification of RNA partners of  
9 viral proteins in infected cells. *RNA Biol.*, **10**, 943–956.
- 10  
11 24. Sanchez David, R.Y., Combredet, C., Sismeiro, O., Dillies, M.A., Jagla, B., Coppée, J.Y., Mura, M.,  
12 Galla, M.G., Despres, P., Tangy, F., *et al.* (2016) Comparative analysis of viral RNA signatures on  
13 different RIG-I-like receptors. *Elife*, **5**, e11275.
- 14  
15 25. Mercado-López, X., Cotter, C.R., Kim, W. keun, Sun, Y., Muñoz, L., Tapia, K. and López, C.B. (2013)  
16 Highly immunostimulatory RNA derived from a Sendai virus defective viral genome. *Vaccine*,  
17 **31**, 5713–5721.
- 18  
19 26. Shingai, M., Ebihara, T., Begum, N.A., Kato, A., Honma, T., Matsumoto, K., Saito, H., Ogura, H.,  
20 Matsumoto, M. and Seya, T. (2007) Differential type I IFN-inducing abilities of wild-type versus  
21 vaccine strains of measles virus. *J. Immunol.*, **179**, 6123–33.
- 22  
23 27. Strahle, L., Garcin, D. and Kolakofsky, D. (2006) Sendai virus defective-interfering genomes and  
24 the activation of interferon-beta. *Virology*, **351**, 101–111.
- 25  
26 28. Baum, A., Sachidanandam, R. and Garcia-Sastre, A. (2010) Preference of RIG-I for short viral RNA  
27 molecules in infected cells revealed by next-generation sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**,  
28 16303–16308.
- 29  
30 29. Runge, S., Sparrer, K.M.J., Lässig, C., Hembach, K., Baum, A., García-Sastre, A., Söding, J.,  
31 Conzelmann, K.-K. and Hopfner, K.-P. (2014) In Vivo Ligands of MDA5 and RIG-I in Measles  
32 Virus-Infected Cells. *PLoS Pathog.*, **10**, e1004081.
- 33  
34 30. Killip, M.J., Young, D.F., Gatherer, D., Ross, C.S., Short, J.A.L., Davison, A.J., Goodbourn, S. and  
35 Randall, R.E. (2013) Deep Sequencing Analysis of Defective Genomes of Parainfluenza Virus 5  
36 and Their Role in Interferon Induction. *J. Virol.*, **87**, 4798–4807.
- 37  
38 31. Timm, C., Akpinar, F. and Yin, J. (2014) Quantitative Characterization of Defective Virus  
39 Emergence by Deep Sequencing. *J. Virol.*, **88**, 2623–2632.
- 40  
41 32. Vodovar, N., Goic, B., Blanc, H. and Saleh, M.-C. (2011) In silico reconstruction of viral genomes  
42 from small RNAs improves virus-derived small interfering RNA profiling. *J. Virol.*, **85**, 11016–  
43 21.
- 44  
45 33. Routh, A. and Johnson, J.E. (2014) Discovery of functional genomic motifs in viruses with  
46 ViReMa-a Virus Recombination Mapper-for analysis of next-generation sequencing data.  
47 *Nucleic Acids Res.*, **42**, e11.
- 48  
49 34. Li, H. and Durbin, R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler  
50 transform. *Bioinformatics*, **25**, 1754–1760.
- 51  
52 35. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G.,  
53 Durbin, R. and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup (2009) The Sequence  
54 Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, **25**, 2078–2079.
- 55  
56 36. RStudio Team (2016) RStudio: Integrated Development Environment for R.
- 57  
58 37. Wickham, H. (2009) ggplot2: elegant graphics for data analysis Springer New York.
- 59  
60 38. Wickham, H., Hester, J. and Francois, R. (2017) readr: Read Rectangular Text Data.

- 1  
2  
3 39. Auguie,B. (2017) gridExtra: Miscellaneous Functions for ‘Grid’ Graphics.  
4  
5 40. Quinlan,A.R. and Hall,I.M. (2010) BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic  
6 features. *Bioinformatics*, **26**, 841–842.  
7  
8 41. Kolakofsky,D., Roux,L., Garcin,D. and Ruigrok,R.W.H. (2005) Paramyxovirus mRNA editing,  
9 the ‘rule of six’ and error catastrophe: a hypothesis. *J. Gen. Virol.*, **86**, 1869–77.  
10  
11 42. Milne,I., Stephen,G., Bayer,M., Cock,P.J.A., Pritchard,L., Cardle,L., Shaw,P.D. and Marshall,D.  
12 (2013) Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. *Brief.*  
13 *Bioinform.*, **14**, 193–202.  
14  
15 43. Mertes,F., ElSharawy,A., Sauer,S., van Helvoort,J.M.L.M., van der Zaag,P.J., Franke,A.,  
16 Nilsson,M., Lehrach,H. and Brookes,A.J. (2011) Targeted enrichment of genomic DNA regions  
17 for next-generation sequencing. *Brief. Funct. Genomics*, **10**, 374–386.  
18  
19 44. Crooks,G.E., Hon,G., Chandonia,J.-M. and Brenner,S.E. (2004) WebLogo: a sequence logo  
20 generator. *Genome Res.*, **14**, 1188–90.  
21

## 22 FIGURES LEGENDS

23  
24 **Figure 1.** Schematic representation of the main classes of DI genomes that may arise from (a) a full-  
25 length negative-sense viral RNA antigenome: (b) DI genomes with deletion, (c) mosaic genomes, and  
26 panhandle genomes: (d) copy-back and (e) snap-back. C’ represent C complementary region. ΔB and  
27 ΔB’ represent shorter B sequence and its complementary region. D represents sequence from other  
28 origin. BP: Breakpoint site. RI: Reinitiation site.  
29  
30

31  
32 **Figure 2.** Schematic representation of the *DI-tector* workflow. It includes four main steps i) alignment  
33 against host and viral genomes to collect unmatched reads, ii) segmentation, iii) second alignment  
34 against viral genomes and iv) analyses of the matched segmented reads. Dashed lines represent  
35 optional steps.  
36  
37

38 **Figure 3.** Schematic representation of *DI-tector* DI genomes group clustering on a positive sense viral  
39 genome reference.  
40

41 **Figure 4.** Characterisation of DI genomes identified by *DI-tector* in RNA samples coming from rMV-  
42 ΔV infected cells. (a) Counts of reads overlapping junction for DI\_336 and DI\_1236 in several rMV-ΔV  
43 samples. Values are followed by a star when reads only align on one strand. (b) Example of results  
44 representation of 5’ panhandle genomes of rMV-ΔV samples after RIG-I affinity purification (# 1 to 3  
45 represent 3 biological triplicates). Red and grey lines represent respectively panhandle genome  
46 hairpin and loop.  
47  
48  
49

50 **Figure 5.** Validation of the presence of DI\_336 by RT-qPCR in rMV-ΔV infected cells. RT-qPCR Ct  
51 values for actin, MV and DI\_336 genomes detection in 400 ng of total RNA extracted from MV or rMV-  
52 ΔV infected HEK293T cells are shown. Samples were analysed in triplicates. ND: Non determined  
53 (Ct > 40).  
54  
55  
56  
57

1  
2  
3 **Figure 6.** Validation of the presence of 3' panhandle genome (DI\_2202) by RT-PCR in MV infected  
4 cells. A RT-PCR was performed on total RNA extracted from HEK203T cells infected with MV. A 3'  
5 panhandle genome of 2,202 bp was detected. The amplicon of expected size of 1219 bp was  
6 sequenced.  
7

8 **Figure 7.** Impact of RiboZero™ treatment on SeV DI genomes detection. Example of results  
9 representation of 5' panhandle genomes of SeV with and without RiboZero™ treatment ("  
10 *Min\_Segment*" = 15). Red and grey lines represent respectively panhandle genome hairpin and loop.  
11  
12

13 **Figure 8.** Predictive performance assessment of *DI-tector*. (a) Quantification of reads clustered as  
14 true positive (TP) or false positive (FP) 5' or 3' panhandle genome (cb/sb), or DI genome with  
15 insertion or deletion after analyse of "5' cb" simulated dataset using different "*Min\_Segment*" and "  
16 *Min\_MAPQ*". (b) Sensitivity and Selectivity values using different "*Min\_Segment*" and "*Min\_MAPQ*".  
17 (c) Clustering of reads as TP or FP 5' or 3' panhandle genome, DI genome with insertion or deletion,  
18 or reads mapped on viral genome before and after segmentation, based on junction position in read.  
19 Analyses was performed on "5' cb" (left), "INDEL" (center) and "3' cb" (right) simulated datasets using  
20 different "*Min\_Segment*" values and "*Min\_MAPQ*"=25.  
21  
22  
23  
24

25 **Figure 9.** Example of other graphical outputs available using *DI-tector* online tool with rMV-ΔV sample  
26 #1 data ([www.di-tector.cyame.eu](http://www.di-tector.cyame.eu)). (a) Scatter-plot, (b) chord diagram or (c) sequence logo for 5'  
27 panhandle and DI genomes with deletion.  
28  
29

### 30 SUPPLEMENTARY FIGURES LEGENDS

31  
32 **Supplementary figure 1.** Representation of reads mapped to DI\_336 (a) or DI\_1236 (b) junction from  
33 purified ST-RIG-I cells infected with rMV-ΔV sample #1. Blue and red lines represent reads aligned on  
34 positive and negative strand. Dashed lines represent junction position.  
35  
36

37 **Supplementary figure 2.** Example of results representation of 5' panhandle genomes of SeV for  
38 sample with RiboZero™ treatment using (a) 15, (b) 16, (c) 17 or (d) 18 values for "*Min\_Segment*"  
39 parameter. Red and grey lines represent respectively panhandle genome hairpin and loop.  
40  
41

42 **Supplementary figure 3.** Clustering of reads as true positive (TP) or false positive (FP) 5' or 3'  
43 panhandle genomes (cb/sb), DI genome with insertion or deletion, or reads mapped to the viral  
44 genome before and after segmentation, based on junction position in read. Analyses was performed  
45 on "5' cb" simulated dataset using different "*Min\_Segment*" and "*Min\_MAPQ*" values.  
46  
47

48 **Supplementary figure 4.** Clustering of reads as true positive (TP) or false positive (FP) 5' or 3'  
49 panhandle genomes (cb/sb), DI genome with insertion or deletion, or reads mapped to the viral  
50 genome before and after segmentation, based on junction position in read. Analyses was performed  
51 on "INDEL" simulated dataset using different "*Min\_Segment*" and "*Min\_MAPQ*" values.  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

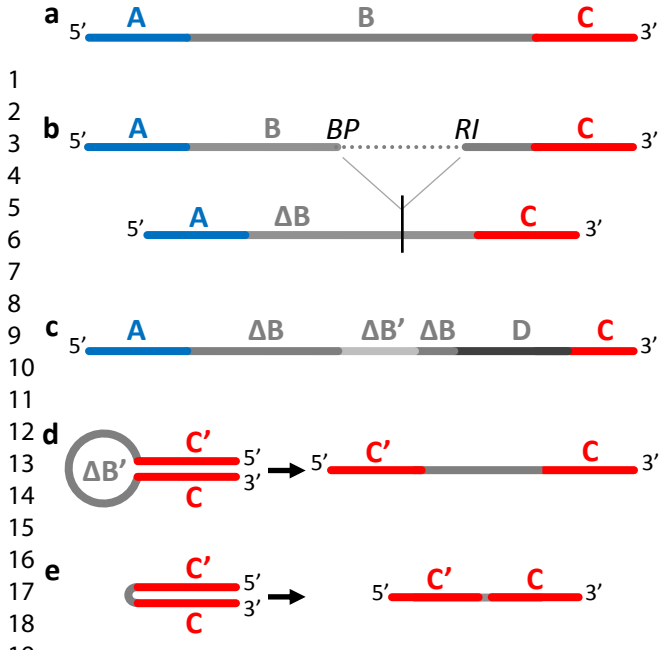


Figure 1.

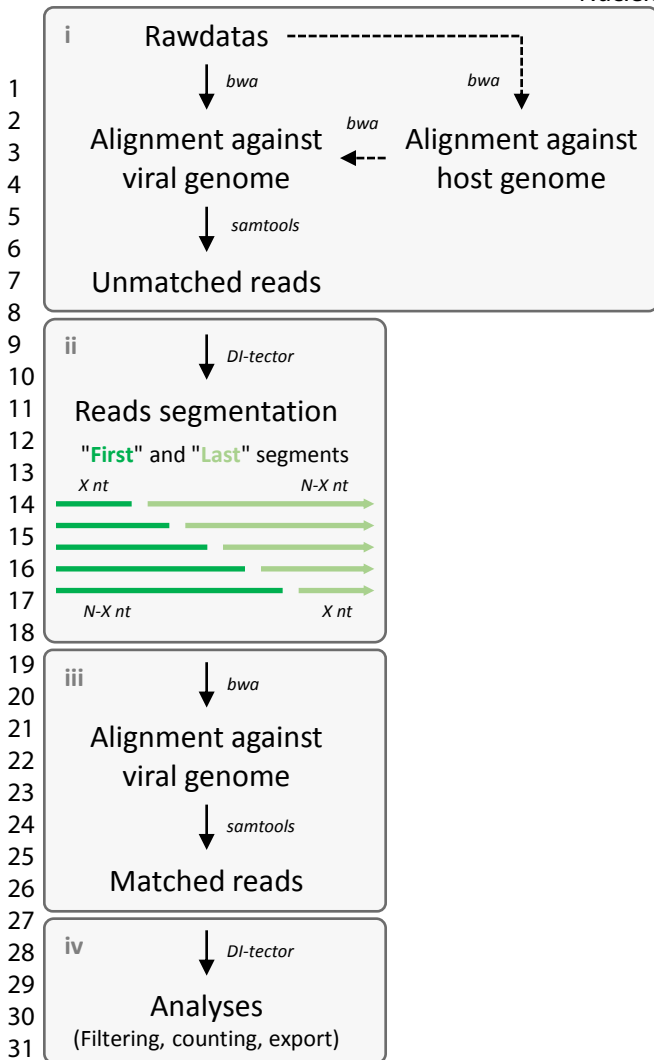


Figure 2.

"First" AND "Last" segments match on viral genome ...

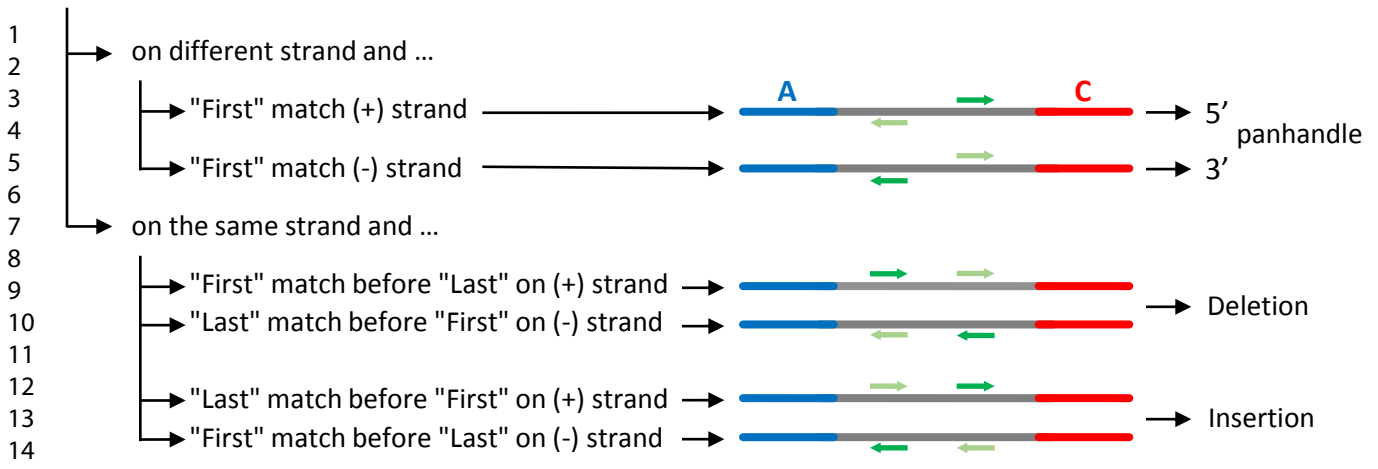
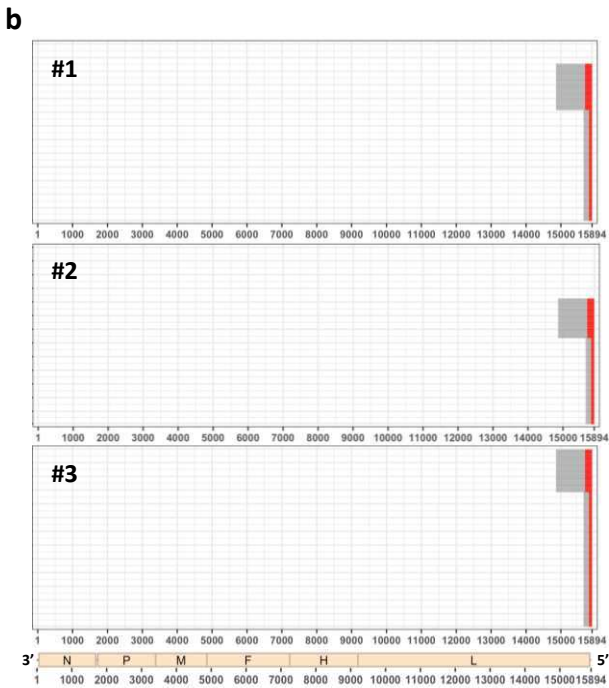


Figure 3.

17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**a**

	ST-Cherry			ST-RIG-I				
	#1	#2	#3	#1	#2	#3		
1	DI_336	1*	2*	2	NA	NA	1*	Total
2	DI_1236	2*	1*	4*	3	2*	9	
3	DI_336	NA	1*	2*	81	63	98	Beads
4	DI_1236	3	NA	1*	34	29	31	



**Figure 4.**



	Ct	
	MV	rMV-ΔV
Actin	14.45 ± 0.08	14.47 ± 0.06
Genome	14.72 ± 0.14	15.83 ± 0.15
DI_336	ND	22.88 ± 0.09

Figure 5.

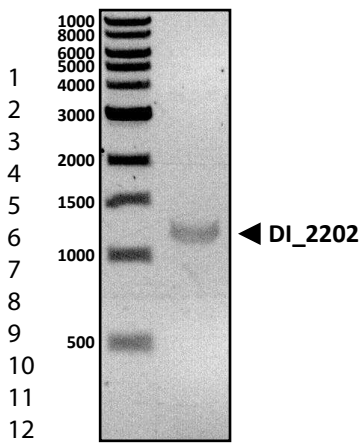
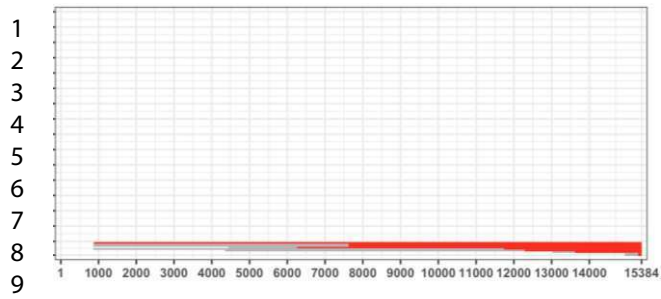
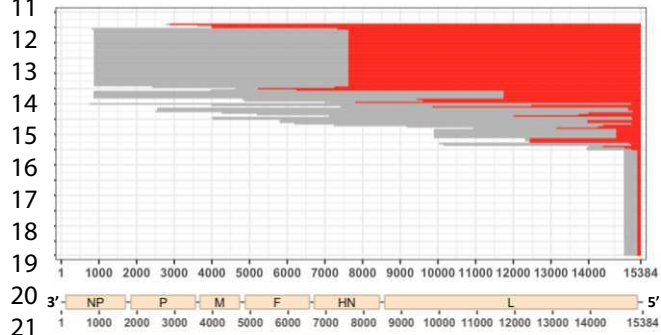


Figure 6.

**Without RiboZero™ treatment****With RiboZero™ treatment****Figure 7.**

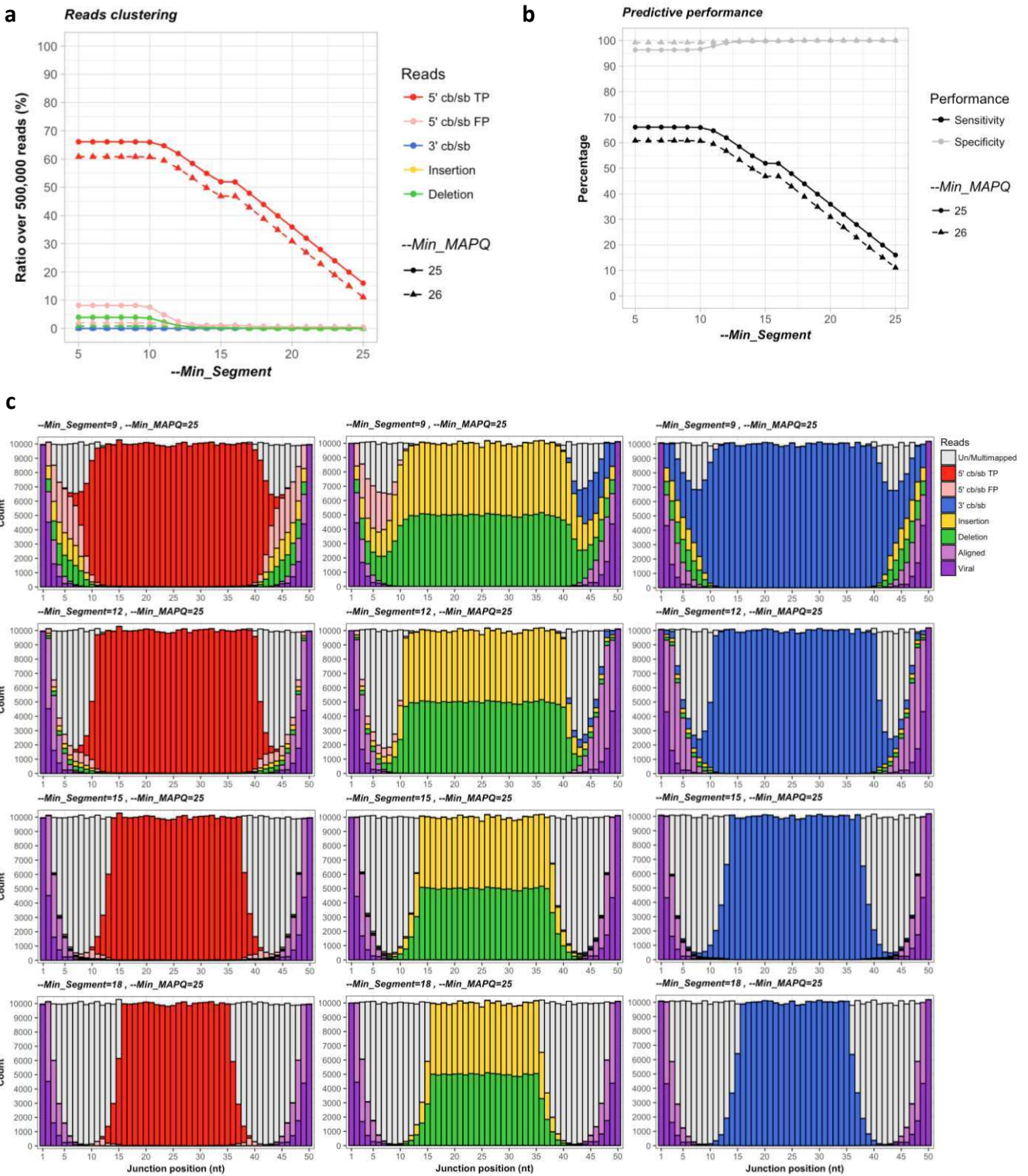


Figure 8.

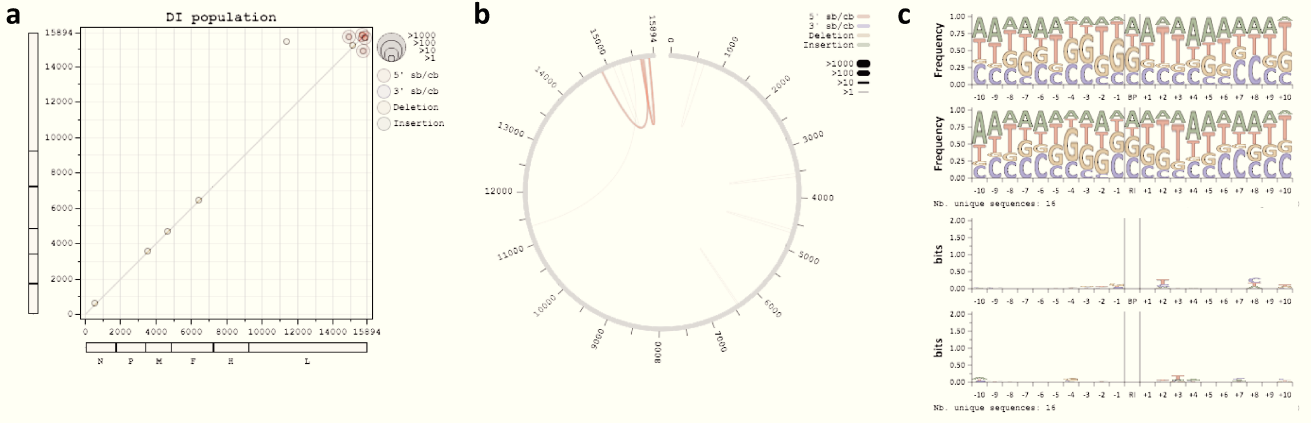
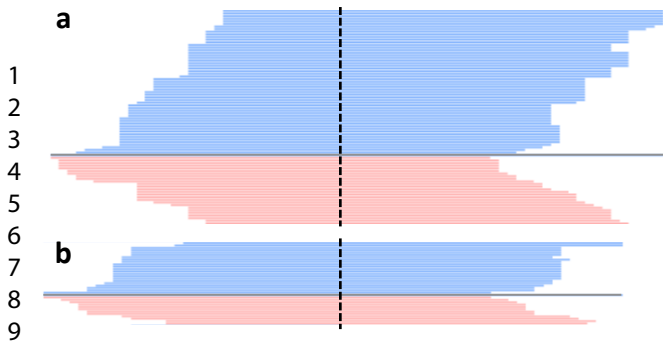
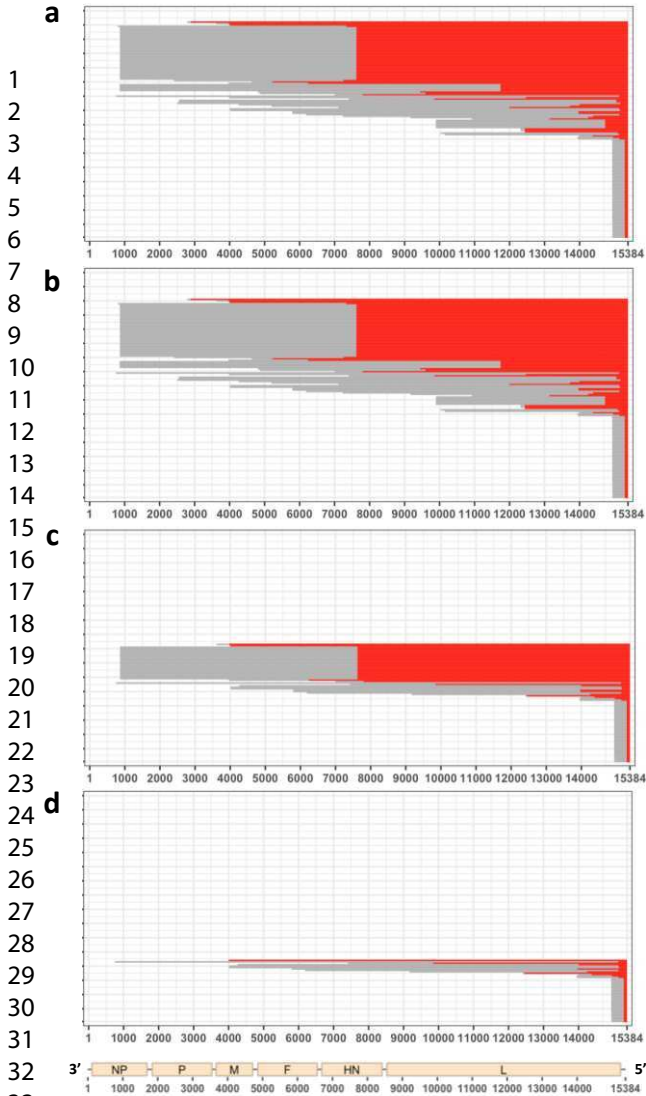


Figure 9.

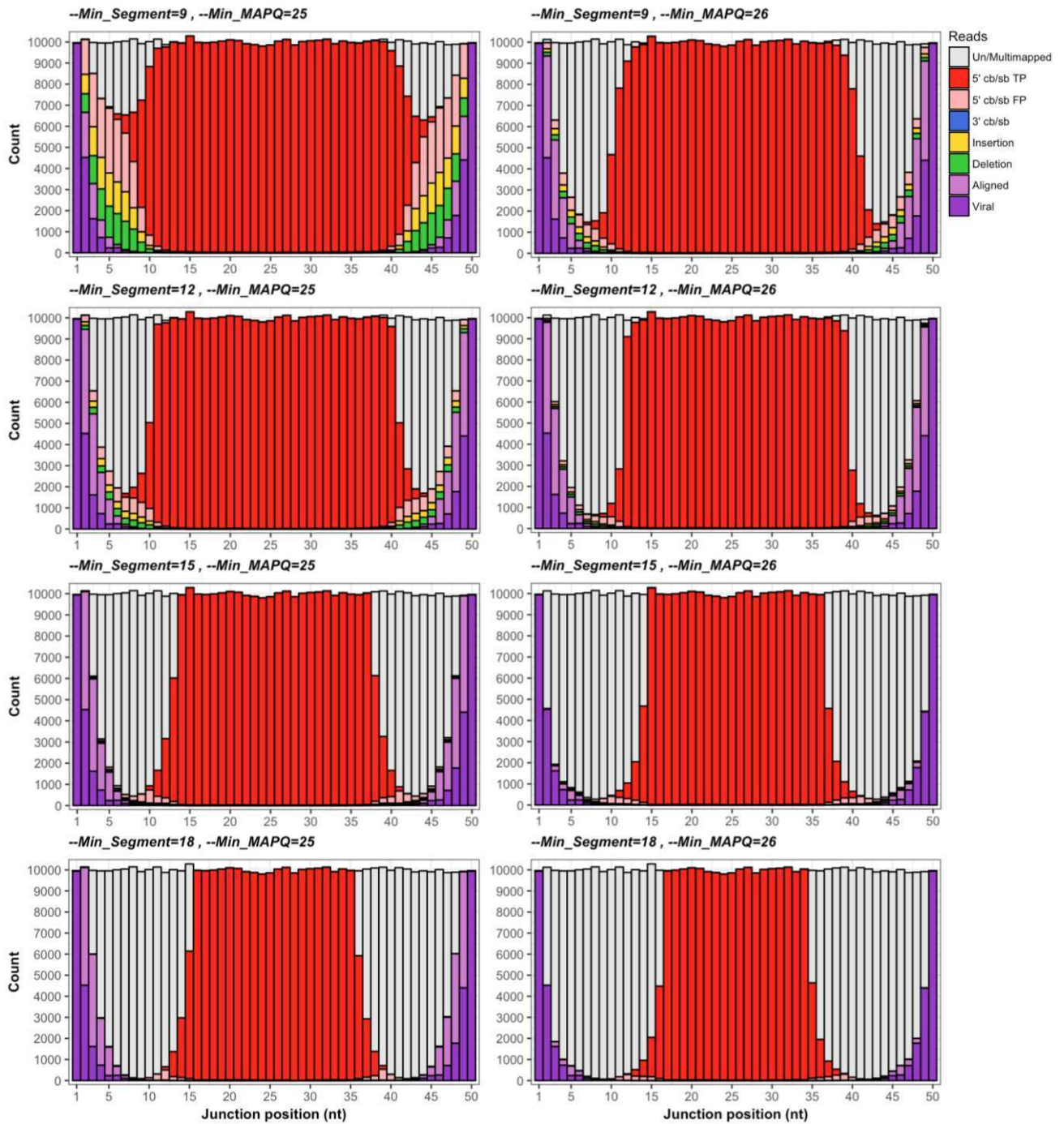
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Supplementary figure 1.

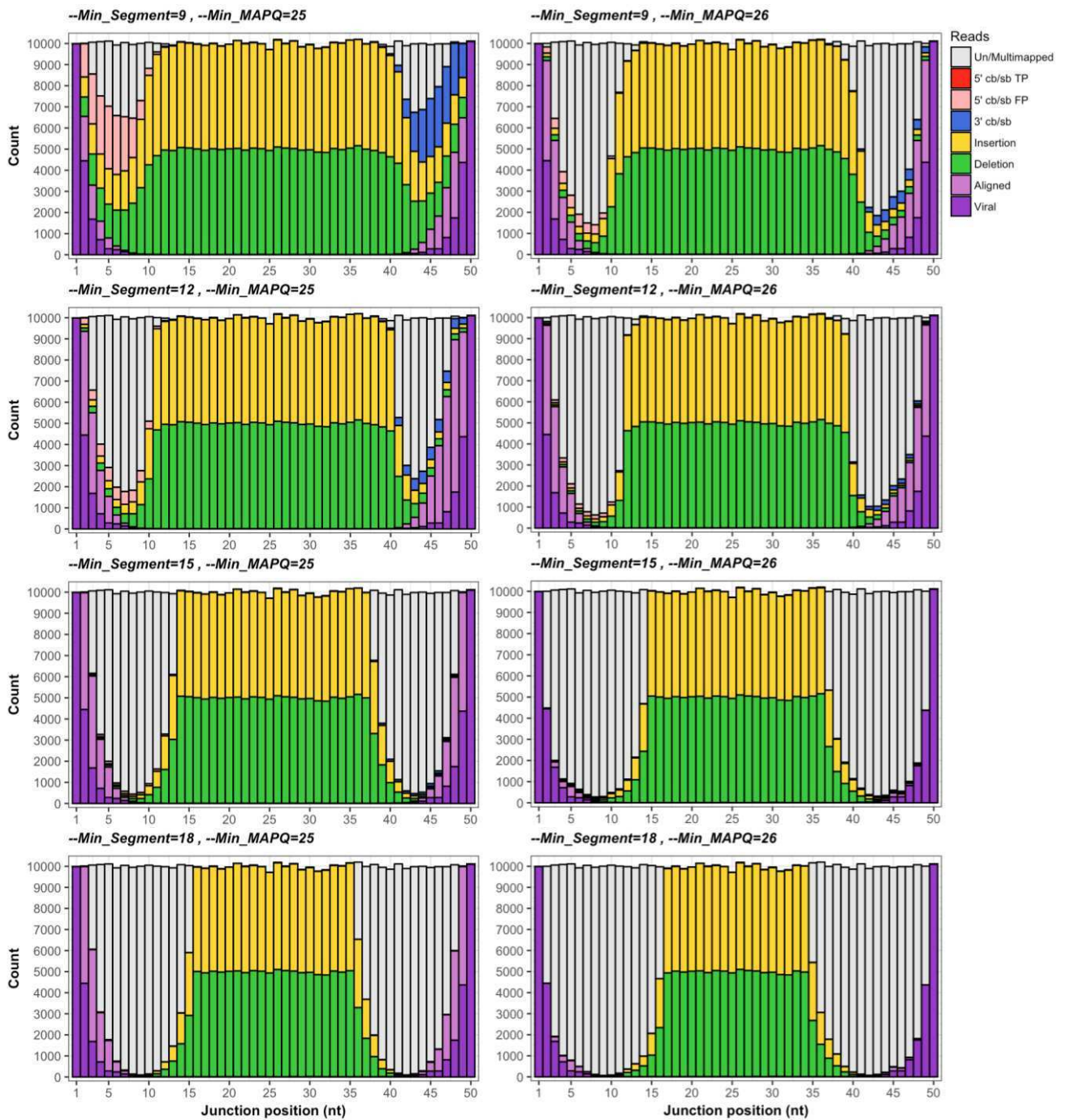


Supplementary figure 2.



Supplementary figure 3.





Supplementary figure 4.

## B. Comparaison des modèles murins et barrière d'espèce

### 1. Article III : le récepteur hCD46 n'est pas requis pour la réplication du VacR *in vivo* chez la souris : l'IFN-I est la barrière d'espèce

*hCD46 receptor is not required for Measles vaccine replication in vivo: type-I IFN is the species barrier in mice.*

**Marie Mura**, Claude Ruffié, Emmanuelle Billon-Denis, Chantal Combredet, Jean-Nicolas Tournier et Frédéric Tangy.

Soumission imminente au journal *Virology*

Afin de tester le rôle d'adjuvant des DI-RNAs *in vivo*, nous avons tout d'abord comparé différents modèles murins afin de trouver un modèle où la voie IFN-I serait fonctionnelle et dans lequel le VacR se répliquerait de façon systémique. En effet, nos précédents résultats *ex vivo* soulignaient l'importance de la réplication virale pour obtenir l'effet immunostimulateur des DI-RNAs : perte de l'immunostimulation après irradiation aux UV ou lorsque le DI-RNA est encapsidé. Nous avons ainsi comparé quatre modèles murins sur fond génétique Sv129 (H-2K<sup>b</sup>, H-2D<sup>b</sup>, I-A<sup>b</sup>) : sauvage (Sv129-wt), KO pour le récepteur IFNAR (IFNAR), exprimant le transgène humain CD46 (hCD46tg), exprimant le transgène humain CD46 et KO pour le récepteur IFNAR (IFNARhCD46tg). Malheureusement, aucun des modèles étudiés ne présentait les caractéristiques requises. En effet, aucune réplication systémique n'était observée dans les souris Sv129 et Sv129 hCD46tg, bien qu'on ne puisse éliminer la présence d'une réplication locale partielle. A l'inverse, la réplication du VacR était systémique dans les souris IFNAR et IFNARhCD46tg, où la voie de signalisation de l'IFN-I est abolie.

En revanche, ces résultats ont permis de mieux comprendre les éléments définissant la barrière d'espèce du VacR. En effet, si le tropisme cellulaire joue un rôle indiscutable dans la barrière d'espèce du VR et des *Morbillivirus* en général, il n'en est pas de même pour le virus atténué. Nous démontrons *in vivo*, chez la souris, que le récepteur hCD46 n'est pas requis pour la réplication virale. Seule la voie IFN-I est impliquée dans la restriction d'hôte. D'un point de vue éthique, ces résultats vont permettre de simplifier le modèle animal utilisé en évitant les contraintes d'élevages liées au maintien de l'hétérozygotie du transgène hCD46.

**hCD46 receptor is not required for measles vaccine replication *in vivo*: only type-I IFN is involved in host restriction in mice.**

Mura M.<sup>1,2</sup>, Ruffié C.<sup>1</sup>, Billon-Denis E.<sup>1,2</sup>, Combredet C.<sup>1</sup>, Tournier J.N.<sup>1,2</sup>, Tangy F.<sup>1\*</sup>

1. Viral genomics and vaccination, Institut Pasteur, CNRS UMR-3569, Paris, France.

2. Anti-infectious biotherapies and immunity, Institut de Recherche Biomédicale des Armées BP73, Brétigny-sur-Orge, France

\* Corresponding author: ftangy@pasteur.fr

## **Abstract**

Measles virus has been successfully attenuated on chicken embryo cells to obtain a highly efficient and safe live attenuated vaccine, administered thus far to billions of children. Measles virus attenuation has long been described to involve a modification of cellular tropism with the use of human CD46 ubiquitous receptor. Nevertheless, the use of this receptor *in vivo* is not obvious. In this study we use four different mouse models to decipher the respective part of hCD46 receptor and type-I interferon response in measles host restriction. We observed that only type-I interferon restricts viral replication of attenuated MV Schwarz strain in mice, independently of the presence of hCD46 receptor. By comparing measles virus immunogenicity in the different models, we confirmed that there was no impact on the absence of this receptor on the immune response. Therefore, we propose to simplify the mouse model.

**Key words:** measles live attenuated vaccine, host restriction, mouse model, type-I interferon, cellular tropism

## 1. Introduction

Measles is a highly contagious disease caused by measles virus (MV). It remains an important cause of death among young children worldwide even though a safe, very efficient and cost-effective vaccine is available (1). Measles is restricted to human and likely sustained through uninterrupted human-to-human transmission due to inadequate vaccine coverage in certain regions. Nevertheless, non-human primates (NHP) are also susceptible to MV. Whether they could serve as MV reservoir is not fully elucidated (2).

MV belongs to the *paramyxoviridae* family and has a single negative-strand RNA genome. The host restriction presumably relies on one hand on the two envelope glycoproteins, Hemagglutinin (H) and Fusion (F) proteins, that are involved in the attachment and fusion to host cells, and on another hand on V and C proteins that help the virus escaping the innate immune system, especially to circumvent the type-I interferon (IFN) response (3). Indeed, mutations in P/V/C gene play a role in attenuation that is well documented with different animal models (4-6). Live-attenuated vaccine strains differ from Edmonston wild-type (Wt) strain by 30 to 70 mutations, depending on the vaccine strain (7). Notably, P/V/C and H gene present a higher variability, compared to the other genes. Several substitutions in the H gene may be involved in the ability of vaccine strains to use human CD46 (hCD46) ubiquitous receptor in addition to wild-type receptor, human CD150/SLAM (hCD150), which expression is restricted to immune cells (lymphocytes, dendritic cells, monocytes) (8). Nectin 4 (also known as PVRL4), which is expressed at adherent junctions of human and NHP epithelia, was also identified as a shedding receptor of wild-type strains (9), responsible for MV transmission (10).

Unlike NHP, none of these receptors are present in rodents but a suitable small animal model was required to better understand MV pathogenesis and support the development of recombinant MV-based vaccine candidates (rMV). Transgenic mouse models using hCD46 (hCD46tg) were generated in 1996 (11). But they failed to induce a systemic infection with MV replication and spread, unless type-I interferon (IFN-I) pathway was suppressed by knocking down the expression of IFN- $\alpha$ -receptor subunit 1 (IFNAR) (12). Some arguments favor the hypothesis that hCD46 receptor facilitates infection but is not strictly required for MV spread and pathogenesis (12). We wondered whether MV vaccine strains, conversely to wild-type strains (13, 14), could replicate in a simple IFNAR model.

To better understand factors that are involved in MV host restriction after viral attenuation, we compared MV Schwarz systemic replication and immune response in four different mouse models allowing to evaluating independently the role of hCD46 and IFN-I (Sv129-wt, hCD46tg, IFNARhCD46tg and IFNAR mice). We found the same pattern of replication, humoral and cellular response in IFNARhCD46tg and IFNAR mice. We conclude that hCD46 receptor is not required for MV Schwarz replication *in vivo* and that, after viral attenuation, host restriction, at least in mice, only relies on IFN-I response.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Cells and viruses**

Vero (African green monkey kidney cells), DBS-FRHL-2 (monkey lung fibroblasts), Tb1-Lu (bat epithelial lung cells), MDBK (bovine epithelial kidney cells), PTK75 (pig nasal fibroblasts) and CF-52-Tr (dog epithelial cells) cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (#10566-016, Gibco™ DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (#A15-101, GE Healthcare) and 10,000 U/ml of Penicillin-Streptomycin (#15140122, Life Technologies).

Viruses used in the study were the live-attenuated MV Schwarz vaccine strain (GenBank: AF266291.1) (15), an rMV expressing green fluorescent protein (rMV-GFP) in additional transcription unit 2 (ATU2) (15), an rMV expressing the chikungunya virus structural proteins (rMV-CHIKV) in ATU2 (16) and an rMV expressing luciferase protein in ATU2 (rMV-Luc) (17). MV wild-type virus was isolated from a patient urine sample, amplified on Vero/hSLAM cells at an MOI of 0.1 and assigned G2V wt-MV (GenBank: MF449469).

### **2.2. Mice and immunization**

Sv129 mice deficient for IFN $\alpha$ / $\beta$  receptors and expressing human MV receptor CD46 (IFNARhCD46Tg) or not (IFNAR) were produced as previously described (15) and housed under pathogen-free conditions at the Institut Pasteur animal facility. C57Bl/6 mice expressing hCD46Tg MCP7 (11) were kindly provided by B. Horvat (International Centre for Infectiology Research, INSERM U1111 - UMR5308). They were backcrossed 10 times on Sv129 mice before use to obtain a similar genetic background. All experiments were approved and conducted in accordance with the guidelines of the Office of Laboratory Animal Care at Institut Pasteur.

Spleens were collected at 24h, 48h and 72h post-infection and after total RNA extraction using RNeasy mini kit (Qiagen), MV genome was detected by RT-qPCR as described elsewhere (18). Sera were collected 3 weeks after each immunization for the characterization of humoral response by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Cellular immune responses were assessed by enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assays on splenocytes collected 8 days after the first immunization (early response) or 4 weeks after the second immunization (late response).

### 2.3. ELISA

Measles virus antigen, Edmonston strain (#PR-BA102-S-L, Jena Bioscience) or Chikungunya antigen at 1 µg/ml (kindly provided by J. Vanhomwegen, Laboratory for Urgent Response to Biological Threats, Institut Pasteur Paris) in PBS were coated overnight at 4°C onto 96-well plates (#439454, Thermo Scientific) and then blocked for 1h at 37°C with a saturation buffer (PBS, 0.05% Tween, 3% BSA). Sera samples from immunized mice were serially diluted (PBS, 0.05% Tween, 1% BSA) and incubated on plates for 1h at 37°C. After washing steps (0.05% Tween in PBS), a secondary horseradish peroxidase conjugated goat anti-mice Ig antibody (#115-035-146, Jackson ImmunoResearch) was added at a dilution of 1/1000 for 1h at 37°C. Antibody binding was revealed by addition of the TMB substrate (#5120-0047, Eurobio) and the reaction was stopped by addition of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. The optical densities (O.D.) were recorded at 450 nm. The endpoint titers for each individual serum were calculated as the reciprocal of the last dilution giving twice the absorbance of negative control sera.

### 2.4. ELISPOT

The capacity to secrete IFN-γ upon specific stimulation was tested on freshly extracted splenocytes from immunized mice. Multiscreen-HA 96-well plates (#MSIP4510, Millipore) were coated overnight at 4°C with 5 µg/ml of anti-mouse IFN-γ (#551216, BD Biosciences Pharmingen) in PBS and, after washing, were blocked for 2h at 37°C with complete MEM (MEM 10% FCS supplemented with non-essential amino-acids 1%, sodium pyruvate 1% and β-mercapto-ethanol). The medium was then replaced by 100 µl of cell suspension containing 1 x 10<sup>6</sup> splenocytes in each well (triplicate) and 100 µl of stimulating agent in complete MEM. Plates were incubated for 40h at 37°C. Cells were stimulated with live attenuated MV Schwarz virus at an MOI of 1, or Concanavaline A (#C-5275, Sigma) as positive control and complete MEM as negative control. After incubation and washing, biotinylated anti-mouse

IFN- $\gamma$  antibody (#554410, BD Biosciences Pharmingen) was added and plates were incubated for 90 minutes at room temperature. After extensive washing, streptavidin-alkaline phosphatase conjugate (#7100-05, Clinisciences) was added and plates were incubated 1h at room temperature. Spots were developed with BCIP/NBT (#B1911, Sigma) and counted in an ELISpot reader (CTL ImmunoSpot®).

### 2.5. *In vivo* imaging

*In vivo* imaging of bioluminescence activity from luciferase was performed using an IVIS Spectrum instrument (Perkin Elmer). Mice were evaluated at 3, 12, 24, 48, 72 and 96h post infection with  $10^5$  TCID of rMV-Luc (100 $\mu$ l, intra-peritoneally i.p.). Mice received 150mg/kg of luciferin (Xenogen) i.p. in 100  $\mu$ l and were then anesthetized with inhaled isoflurane. They were positioned ventral side then dorsal side up in the IVIS on a 37 °C platform. They continued to receive isoflurane through the nose cone delivery method while IVIS imaging was performed. The camera exposure time was set for 1 min for the different time points. Quantitative analysis (photons) of bioluminescence emitted from the abdominal area or regions of intensity (ROI) was performed by measuring the luminescence signal intensity using Living image 3.0 software (Xenogen).

### 2.6. Statistical analysis

Mann-Whitney nonparametric tests were performed using GraphPad Prism version 5.0f for Mac OS X (GraphPad Software, San Diego California USA).

## 3. Results

3.1. Systemic replication and spread of MV Schwarz strain depend on type-I IFN and not on the presence of the hCD46 receptor in mice.

*In vivo* imaging of luciferase bioluminescence activity was used to observe systemic viral replication. Mice were infected i.p. with  $10^5$  TCID<sub>50</sub> of rMV-luc, expressing luciferase protein, UV-irradiated rMV-luc, or not infected (Optimem®). At 3 hours post-infection, we controlled that no signal was observed from luciferase protein already present in the viral stock. This control allowed to link bioluminescence signal with “*de novo*” luciferase production resulting from viral replication. This was also confirmed by the absence of signal in mice infected by UV-irradiated rMV-luc that did not replicate. In IFNAR and IFNARhCD46Tg mice viral replication was detected at 12 hours post-infection, culminated at 72 hours, and declined until total signal loss after 120 hours (Figure 1). No viral replication was observed in Sv129-



wt or hCD46Tg mice at any time post-infection (Figure 1). The intensity of bioluminescence signal was comparable in IFNAR and IFNARhCD46Tg mice, indicating that whether or not hCD46 receptor was present a similar systemic replication occurred. These results clearly show that IFN-I is controlling viral replication in mice. The presence of hCD46 receptor alone is not sufficient to permit viral systemic replication in mice.

3.2. Conversely to MV vaccine strain, MV wild-type strain cannot replicate in IFNAR mice spleens.

Wild-type strains of MV are known to be strictly dependent on the presence of CD150/SLAM receptor for their replication (13, 14). To confirm this we compared the replication of MV Schwarz vaccine and wt-MV in IFNAR mice. We used G2V wt-MV strain to infect Sv129-wt and IFNAR mice. We quantified MV genome by RT-qPCR in spleens at 24h, 48h and 72h post-infection by i.p. route with  $10^5$  TCID<sub>50</sub> of MV Schwarz or G2V wt-MV. As expected, genome copy number increased in IFNAR mice infected with MV Schwarz (Figure 2A) but not with G2V wt-MV (Figure 2B). Sv129-wt mice were used as negative control for replication of both viruses to detect genome from MV inoculum. This confirms that only attenuated MV but not wild-type MV can replicate in IFNAR mice without any specific receptor.

3.3. Type-I IFN is required to block MV Schwarz infection in mice splenocytes *ex vivo*, regardless of hCD46 receptor.

We further investigated whether hCD46 receptor was dispensable for primary immune cells infection *ex vivo*. We used freshly extracted splenocytes from Sv129-wt, hCD46Tg, IFNAR or IFNARhCD46Tg mice. After 48 hours of infection by MV Schwarz strain expressing green fluorescent protein (rMV-eGFP) at an MOI of 1, we only observed infection in IFNAR and IFNARhCD46Tg splenocytes (Figure 3A). No infection was detected on IFN-I competent splenocytes, even after 72 hours. The presence of hCD46 receptor was not sufficient to allow cell infection on primary cells *ex vivo*. These results confirmed that hCD46 receptor is not required for cell infection and suggest that IFN-I plays the major role in the species barrier that controls MV Schwarz infection in mice.

3.4. MV Schwarz strain can infect multiple mammalian cell lines that do not express hCD46.

We used recombinant MV Schwarz expressing green fluorescent protein (rMV-eGFP) to determine whether hCD46-negative cell lines from other lineage than human or mouse

could be infected by MV vaccine. Epithelial or fibroblastic cells from bat (Tb1-Lu), bovine (MDBK), dog (CF-52-Tr), and pig (PTK 75) were infected by rMV-eGFP at an MOI of 1 for 72 hours. Monkey cells were used as positive control: IFN deficient Vero cells that are usually used to grow MV vaccine strains, and IFN competent DBS-FRHL-2 cells. As expected, monkey cells were infected and large syncytia were visible from 24 hours post-infection (Figure 3B). Nevertheless, infection was massive on Vero cells, which are IFN competent, compared to DBS-FRHL-2. Importantly, rMV-eGFP was able to infect all the other tested hCD46-negative mammalian cells. The infection rates were lower compared to monkey cells, but visible from 24 hours post-infection. No syncytium formation was observed in hCD46-negative cells at 24, 48 or 72 hours post-infection. This observation shows that MV Schwarz attenuated strain can infect cells that do not express hCD46 receptor, and suggests that this receptor allows syncytia formation and infection spread, but is dispensable for cell entry and replication.

3.5. MV humoral response is higher after a single immunization in IFNAR mice than in Sv129-wt mice, but antibody titers reach the same level after two immunizations.

Because these mouse models are currently used for preclinical evaluation of rMV vaccines, we compared their capacity to mount immune responses. First, we analyzed MV antibody response by ELISA 4 weeks after the first (day 28) and second immunizations (day 56) of  $10^3$  TCID<sub>50</sub> of MV Schwarz (Figure 4A),  $10^5$  TCID<sub>50</sub> of MV Schwarz (Figure 4B), or  $10^5$  TCID<sub>50</sub> of rMV-CHIKV expressing the chikungunya virus structural proteins (Figure 4C). Once more, we observed that IFNAR<sup>+</sup> mice (Sv129-wt and hCD46Tg) behave similarly but differently from IFNAR KO mice (IFNAR and IFNARhCD46Tg). After a single immunization, the antibody titers were 10 times higher in IFNAR KO mice than in IFNAR<sup>+</sup> mice. Nevertheless, after the boost immunization, all mice had the same high level of anti-MV antibodies, whatever the vaccine and the dose used ( $10^3$  or  $10^5$  TCID<sub>50</sub>). Thus, this effect was not due to a saturation of the immune system. Moreover, we found that in IFNAR<sup>+</sup> mice, humoral responses were similar between live rMV-luc and UV-irradiated rMV-luc, indicating that the observed response reflected the antigenic load only. On the contrary in IFNAR KO mice, antibody titers were 10-100 times higher for live rMV-luc than for UV-irradiated rMV-luc, indicating that viral replication was involved (Figure 5).

3.6. Mice model does not change IgG subtypes profile, nevertheless the vaccine dose modified it in a Th1/Th2 manner.

To further compare the quality of humoral response in the different mouse models we looked at IgG subtypes after prime immunization (Figure 6). Immunization with a low dose of  $10^3$  TCID<sub>50</sub>, which is the standard human baby dose, elicited a Th1 profile in all models, with mainly IgG2a antibodies and a complete absence of IgG1 (Figure 6A). However, immunization with a higher dose of  $10^5$  TCID<sub>50</sub>, induced a balance towards Th2: IgG2 still remained dominant but IgG1 strongly appeared (Figure 6B). It is important to note that no IgG2c was detectable in IFNAR KO mice, meaning that IFN-I pathway was needed for its polarization. Similar observations were done with anti-chikungunya antibodies after the first immunization with rMV-CHIKV (Figure 6C).

3.7. MV cell mediated immune response requires viral replication and does not depend on type-I IFN.

We assessed the cellular response elicited to MV by IFN- $\gamma$  Elispot assay performed in mice splenocytes collected at two different times post-immunization. First, we analyzed the early response 8 days after an i.p. immunization with  $10^5$  TCID<sub>50</sub> of MV (Figure 7A). Significant cellular responses were only elicited in IFNAR KO mice at the same level (> 1000 spots per million cells) regardless of the presence of hCD46 transgene. Then, we analyzed the late cellular response in the mice used for IVIS study, 4 weeks after the second immunization (Figure 7B). Live replicating rMV-luc elicited high cellular responses in IFNAR KO mice, but when the virus was UV-irradiated no cellular response was induced. On the contrary, low cellular responses were induced in IFNAR+ mice, that were similar for live rMV-luc or UV-irradiated rMV-luc, indicating again that only antigenic load was involved in this response. These results showed that viral replication is needed to induce cellular responses in the absence of efficient IFN-I response. Nevertheless, the presence of IFN-I can induce a moderate but late cellular response in the absence of viral replication.

#### 4. Discussion

The major role of hCD46 receptor for vaccine MV strains has long been described (19, 20) and mice models were constructed on that view (11). However, MV Schwarz vaccine strain was obtained from Edmonston wild-type MV after multiple passages on different cell lines, including Chicken embryo fibroblasts that do not express hCD46. So it was relevant to raise the issue of its importance *in vivo*, on animal models. By comparing four mouse models, we were able to unravel the role of both hCD46 receptor and IFN-I in MV host restriction. We

showed that only IFN-I restricts MV Schwarz systemic replication in mice, regardless of the presence of hCD46 receptor. We observed similar results in mouse splenocytes infected *ex vivo*, and showed that MV Schwarz strain infected hCD46-negative cells from different mammal species, even though infection was limited and did not induce visible syncytia after 72 hours. Conversely to vaccine strains, wild-type MV needs simultaneously its specific receptor CD150/SLAM and IFN-I down regulation for systemic viral replication *in vivo* in mice (13, 14). Thus, MV attenuation modified the MV cellular tropism in a larger way than only by targeting hCD46. This may involve another ubiquitous receptor, or a cell-to-cell spread mechanism (21-23).

By comparing Sv129-wt mice with hCD46Tg, IFNAR and IFNARhCD46Tg mice, we observed only two different patterns of immune response to MV i.p. inoculation that also depended only on the presence (IFNAR+) or absence (IFNAR KO) of IFN-I receptor, and not on the absence or presence of hCD46 receptor. Indeed, IFNAR and IFNARhCD46Tg mice mounted similar humoral and cellular responses after immunization with MV or rMV-CHIKV, with a Th1 polarization of the humoral response, as observed in human (24). The absence of difference between both mice models in replication and immunogenicity justify considering simplifying the animal model in accordance with current ethical rules by using a simple IFNAR KO model. Unlike the study of Marty RR *et al* that used C57BL/6 mice, with a similar H-2<sup>b</sup> genetic background (25), that supports the use of hCD46Tg mouse model for the characterization of the immunological profile induced by rMV vaccine candidates, we found that IFNAR+ mice were less adapted to measles immunization study. First, we observed no differences between Sv129-wt mice and hCD46Tg mice. Then, humoral and cellular responses were likely only due to antigenic load contained in the vaccine preparation, as no systemic replication was visible. Finally, cellular response was weak and delayed. So, IFNAR KO mice model fits better with the characteristics of measles infection in humans than IFNAR+ mice model. Nevertheless, humoral response in IFNAR+ mice reached the same level of IgG than in IFNAR KO mice after 2 immunizations with  $10^3$  or  $10^5$  TCID<sub>50</sub>. This observation opens a new potential use of MV as a non-replicative vector vaccine platform to deliver heterologous antigens for veterinarian use. IgG subtypes profiles were similar in all animals, apart from IgG2c subtype that was absent in IFNAR KO animals (26). Importantly, the increase of the inoculated dose from  $10^3$  to  $10^5$  TCID<sub>50</sub> resulted in a Th1/Th2 balance. This

result highlights the importance of determining vaccine dose to shape the polarization of the immune response.

A simple IFNAR KO mouse model seems therefore sufficient to study physiopathology and immunogenicity of rMV. IFN-I is an important innate component of viral species barrier. It is a powerful innate immune mechanism that orchestrates antiviral immune response thanks to three major functions: (i) cell intrinsic anti-viral state that limits the spread of viruses, (ii) modulation of innate immunity to promote antigen presentation and Natural Killer cell activity (NK), and (iii) activation of adaptive immunity to develop high-affinity antigen specific B and T cell responses and immunological memory (27). MV has adapted to humans by developing IFN-I evasion mechanisms. This role is especially dedicated to the V protein, which targets multiple components of the IFN-I signaling pathway (28), particularly the helicase receptor MDA5 (29) and the transcription factor STAT1 (4, 30). This immune evasion is not adapted to other mammalian species such as the mouse. The concept of species barrier is mostly multifactorial, including molecular, metabolic and immunological barriers (31). Wild-type MV receptor specificity and IFN-I both restrict the species tropism (32). Attenuated strains changed MV cellular tropism by broadening it, and not only to the use of hCD46 that was well studied *in vitro* and only showed a facilitating role for MV infection (reviewed by (33)). In our study, we demonstrate *in vivo* in mice that only IFN-I determines MV vaccine strains host restriction, regardless of hCD46 receptor. Nevertheless, further studies are needed in IFNAR KO mice to understand in what cells MV replicates and to analyze cell entry pathways. In macaques, the target cells observed at 3, 5 and 7 days p.i. were predominantly macrophages and dendritic cells (34). It can be assumed that attenuated MV would also target immune cells in mice and that virus might enter these cells without depending on a specific receptor. Notably, IFNAR KO mice model settles gently in virology as a reference model to study pathogenicity of human viruses and evaluate vaccines and therapeutics (35-37).

To conclude, we showed that the mouse model used to study immunogenicity of rMV-based vaccine candidates could be simplified by using IFNAR mice that present less breeding constraints than IFNARhCD46Tg mice. Moreover, we observed that in the absence of replication in Sv129-wt mice, MV was still able to induce high antibody titers and moderate cellular response. This would suggest a possible veterinarian use of MV vector based vaccine, as a non-replicative viral vaccine platform to deliver heterologous antigens. Finally,

we underlined the importance of innate immunity in viral host restriction and confirmed the central role of IFNAR KO mice model to study human viruses.

### **Declaration of interest**

The authors declare no conflict of interest.

### **Acknowledgements**

This work was supported by Institut Pasteur and the CNRS. M.M., B.D.E. and T.J.N. were supported by the Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA). The authors thank Branka Horvat (International Centre for Infectiology Research, INSERM U1111 - UMR5308) for providing hCD46 mouse model and Institut Pasteur animal facility for backcrossing it on Sv129 mouse genetic background.

### **References**

1. **Orenstein WA, Hinman A, Nkowane B, Olive JM, Reingold A.** 2018. Measles and Rubella Global Strategic Plan 2012-2020 midterm review. *Vaccine* **36 Suppl 1**:A1-A34.
2. **Moss WJ, Strebel P.** 2011. Biological feasibility of measles eradication. *J Infect Dis* **204 Suppl 1**:S47-53.
3. **Jiang Y, Qin Y, Chen M.** 2016. Host-Pathogen Interactions in Measles Virus Replication and Anti-Viral Immunity. *Viruses* **8**.
4. **Caignard G, Guerbois M, Labernardiere JL, Jacob Y, Jones LM, Infectious Mapping Project IM, Wild F, Tangy F, Vidalain PO.** 2007. Measles virus V protein blocks Jak1-mediated phosphorylation of STAT1 to escape IFN-alpha/beta signaling. *Virology* **368**:351-362.
5. **Devaux P, Hodge G, McChesney MB, Cattaneo R.** 2008. Attenuation of V- or C-defective measles viruses: infection control by the inflammatory and interferon responses of rhesus monkeys. *J Virol* **82**:5359-5367.
6. **Takeda M, Ohno S, Tahara M, Takeuchi H, Shirogane Y, Ohmura H, Nakamura T, Yanagi Y.** 2008. Measles viruses possessing the polymerase protein genes of the Edmonston vaccine strain exhibit attenuated gene expression and growth in cultured cells and SLAM knock-in mice. *J Virol* **82**:11979-11984.
7. **Bankamp B, Takeda M, Zhang Y, Xu W, Rota PA.** 2011. Genetic characterization of measles vaccine strains. *J Infect Dis* **204 Suppl 1**:S533-548.
8. **Vongpunsawad S, Oezgun N, Braun W, Cattaneo R.** 2004. Selectively receptor-blind measles viruses: Identification of residues necessary for SLAM- or CD46-induced fusion and their localization on a new hemagglutinin structural model. *J Virol* **78**:302-313.
9. **Muhlebach MD, Mateo M, Sinn PL, Prufer S, Uhlig KM, Leonard VH, Navaratnarajah CK, Frenzke M, Wong XX, Sawatsky B, Ramachandran S, McCray PB, Jr., Cichutek K, von Messling V, Lopez M, Cattaneo R.** 2011. Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature* **480**:530-533.

10. **Rota PA, Moss WJ, Takeda M, de Swart RL, Thompson KM, Goodson JL.** 2016. Measles. *Nat Rev Dis Primers* **2**:16049.
11. **Horvat B, Rivaller P, Varior-Krishnan G, Cardoso A, Gerlier D, Rabourdin-Combe C.** 1996. Transgenic mice expressing human measles virus (MV) receptor CD46 provide cells exhibiting different permissivities to MV infections. *J Virol* **70**:6673-6681.
12. **Mrkic B, Pavlovic J, Rulicke T, Volpe P, Buchholz CJ, Hourcade D, Atkinson JP, Aguzzi A, Cattaneo R.** 1998. Measles virus spread and pathogenesis in genetically modified mice. *J Virol* **72**:7420-7427.
13. **Ohno S, Ono N, Seki F, Takeda M, Kura S, Tsuzuki T, Yanagi Y.** 2007. Measles virus infection of SLAM (CD150) knockin mice reproduces tropism and immunosuppression in human infection. *J Virol* **81**:1650-1659.
14. **Welstead GG, Iorio C, Draker R, Bayani J, Squire J, Vongpunsawad S, Cattaneo R, Richardson CD.** 2005. Measles virus replication in lymphatic cells and organs of CD150 (SLAM) transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:16415-16420.
15. **Combredet C, Labrousse V, Mollet L, Lorin C, Delebecque F, Hurtrel B, McClure H, Feinberg MB, Brahic M, Tangy F.** 2003. A molecularly cloned Schwarz strain of measles virus vaccine induces strong immune responses in macaques and transgenic mice. *J Virol* **77**:11546-11554.
16. **Brandler S, Ruffie C, Combredet C, Brault JB, Najburg V, Prevost MC, Habel A, Tauber E, Despres P, Tangy F.** 2013. A recombinant measles vaccine expressing chikungunya virus-like particles is strongly immunogenic and protects mice from lethal challenge with chikungunya virus. *Vaccine* **31**:3718-3725.
17. **Komarova AV, Combredet C, Meyniel-Schicklin L, Chapelle M, Caignard G, Camadro JM, Lotteau V, Vidalain PO, Tangy F.** 2011. Proteomic analysis of virus-host interactions in an infectious context using recombinant viruses. *Mol Cell Proteomics* **10**:M110 007443.
18. **Mura M, Combredet C, Najburg V, Sanchez David RY, Tangy F, Komarova AV.** 2017. Nonencapsidated 5' Copy-Back Defective Interfering Genomes Produced by Recombinant Measles Viruses Are Recognized by RIG-I and LGP2 but Not MDA5. *J Virol* **91**.
19. **Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, Rabourdin-Combe C, Gerlier D.** 1993. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* **67**:6025-6032.
20. **Dorig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD.** 1993. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* **75**:295-305.
21. **Firsching R, Buchholz CJ, Schneider U, Cattaneo R, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J.** 1999. Measles virus spread by cell-cell contacts: uncoupling of contact-mediated receptor (CD46) downregulation from virus uptake. *J Virol* **73**:5265-5273.
22. **Lawrence DM, Patterson CE, Gales TL, D'Orazio JL, Vaughn MM, Rall GF.** 2000. Measles virus spread between neurons requires cell contact but not CD46 expression, syncytium formation, or extracellular virus production. *J Virol* **74**:1908-1918.
23. **Schneider-Schaulies J, Martin MJ, Logan JS, Firsching R, ter Meulen V, Diamond LE.** 2000. CD46 transgene expression in pig peripheral blood mononuclear cells does not alter their susceptibility to measles virus or their capacity to downregulate endogenous and transgenic CD46. *J Gen Virol* **81**:1431-1438.

24. **Griffin DE.** 2016. The Immune Response in Measles: Virus Control, Clearance and Protective Immunity. *Viruses* **8**.
25. **Marty RR, Knuchel MC, Morin TN, Naim HY.** 2015. An immune competent mouse model for the characterization of recombinant measles vaccines. *Hum Vaccin Immunother* **11**:83-90.
26. **Swanson CL, Wilson TJ, Strauch P, Colonna M, Pelanda R, Torres RM.** 2010. Type I IFN enhances follicular B cell contribution to the T cell-independent antibody response. *J Exp Med* **207**:1485-1500.
27. **Ivashkiv LB, Donlin LT.** 2014. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* **14**:36-49.
28. **Chinnakannan SK, Nanda SK, Baron MD.** 2013. Morbillivirus v proteins exhibit multiple mechanisms to block type 1 and type 2 interferon signalling pathways. *PLoS One* **8**:e57063.
29. **Childs K, Stock N, Ross C, Andrejeva J, Hilton L, Skinner M, Randall R, Goodbourn S.** 2007. mda-5, but not RIG-I, is a common target for paramyxovirus V proteins. *Virology* **359**:190-200.
30. **Devaux P, Priniski L, Cattaneo R.** 2013. The measles virus phosphoprotein interacts with the linker domain of STAT1. *Virology* **444**:250-256.
31. **Sansonetti P.** 2006. [How to define the species barrier to pathogen transmission?]. *Bull Acad Natl Med* **190**:611-622; discussion 623, 625-617.
32. **Manchester M, Rall GF.** 2001. Model Systems: transgenic mouse models for measles pathogenesis. *Trends Microbiol* **9**:19-23.
33. **Manchester M, Eto DS, Valsamakis A, Liton PB, Fernandez-Munoz R, Rota PA, Bellini WJ, Forthal DN, Oldstone MB.** 2000. Clinical isolates of measles virus use CD46 as a cellular receptor. *J Virol* **74**:3967-3974.
34. **Rennick LJ, de Vries RD, Carsillo TJ, Lemon K, van Amerongen G, Ludlow M, Nguyen DT, Yuksel S, Verburch RJ, Haddock P, McQuaid S, Duprex WP, de Swart RL.** 2015. Live-attenuated measles virus vaccine targets dendritic cells and macrophages in muscle of nonhuman primates. *J Virol* **89**:2192-2200.
35. **Rieger T, Merkler D, Gunther S.** 2013. Infection of type I interferon receptor-deficient mice with various old world arenaviruses: a model for studying virulence and host species barriers. *PLoS One* **8**:e72290.
36. **Lazear HM, Govero J, Smith AM, Platt DJ, Fernandez E, Miner JJ, Diamond MS.** 2016. A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. *Cell Host Microbe* **19**:720-730.
37. **Couderc T, Chretien F, Schilte C, Disson O, Brigitte M, Guivel-Benhassine F, Touret Y, Barau G, Cayet N, Schuffenecker I, Despres P, Arenzana-Seisdedos F, Michault A, Albert ML, Lecuit M.** 2008. A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. *PLoS Pathog* **4**:e29.



## Figures legends :

**Figure 1 :** Replication of rMV-Luc in Sv129-wt, hCD46Tg, IFNAR and IFNARhCD46 mice. Mice were injected with  $10^5$  TCID<sub>50</sub> of rMV-Luc, UV-inactivated rMV-Luc or Optimem (negative control) in 100  $\mu$ l i.p. *In vivo* imaging system (IVIS) was used to detect bioluminescence that reveals viral replication at different time points after injection of 150 mg/kg of luciferin i.p. Mice are represented in ventral (left) and dorsal (right) up position. Kinetics of bioluminescence quantitative signal (photons) emitted from the abdominal area or regions of intensity (ROI) for each mouse infected with rMV-Luc.

**Figure 2 :** MV genome quantification by absolute RT-qPCR in total RNA extracted from IFNAR or Sv129-wt mice spleens 24h, 48h, or 72h post-infection with  $10^5$  TCID<sub>50</sub> of MV Schwarz (A) and wild-type MV (B). Asterisks (\*) indicate the significance level of the Mann-Whitney nonparametric test: \*\*  $p < 0.01$ .

**Figure 3 :** Cell infection by rMV-eGFP at an MOI of 1 during 48 hours. (A) Splenocytes from Sv129-wt, hCD46Tg, IFNAR and IFNARhCD46 mice freshly extracted from the spleen. (B) Cell lines from different mammals: Vero (African green monkey kidney cells), DBS-FRHL-2 (monkey lung fibroblasts), Tb1-Lu (bat epithelial lung cells), MDBK (bovine epithelial kidney cells), PTK75 (pig nasal fibroblasts) and CF-52-Tr (dog epithelial cells).

**Figure 4 :** Immunogenicity of MV-Schwarz and rMV-CHIKV in Sv129-wt, hCD46Tg, IFNAR and IFNARhCD46 mice. Humoral response was assessed after two injections at 1 month of interval  $10^3$  TCID<sub>50</sub> of MV Schwarz (A),  $10^5$  TCID<sub>50</sub> of MV Schwarz (B) or  $10^5$  TCID<sub>50</sub> of rMV-CHIKV (C) injected in 100  $\mu$ l i.p. ELISA results of MV total IgG titers in the blood are represented with Log<sub>10</sub> scale at day 28 (4 weeks after the first immunization) and day 56 (4 weeks after the second immunization) for each dose (means +/- SD), 6 mice per group. Asterisks (\*) indicate the significance level of the Mann-Whitney nonparametric test: \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$ . L.D. limit of detection.

**Figure 5.** Immunogenicity of rMV-Luciferase (rMV-Luc) and UV-inactivated rMV-Luc in IFNAR+ and IFNAR- mice. Humoral response was assessed after two injections at 1 month of

interval of  $10^5$  TCID<sub>50</sub> of rMV-Luc or UV-inactivated rMV-Luc. ELISA results of MV total IgG titers in the blood are represented with Log<sub>10</sub> scale at day 30 (4 weeks after the first immunization) and day 60 (4 weeks after the second immunization) for each dose (means +/- SD), 4 mice per group. Asterisks (\*) indicate the significance level of the Mann-Whitney nonparametric test: \* p<0.05 \*\* p<0.01. L.D. limit of detection.

**Figure 6 :** IgG subtypes to MV-Schwarz and rMV-CHIKV in Sv129-wt, hCD46Tg, IFNAR and IFNARhCD46 mice 4 weeks after immunization with  $10^3$  TCID<sub>50</sub> of MV Schwarz (A),  $10^5$  TCID<sub>50</sub> of MV Schwarz (B) or  $10^5$  TCID<sub>50</sub> of rMV-CHIKV (C) in 100  $\mu$ l i.p. ELISA results of IgGA, IgG2a, IgG2b, IgG2c and IgG3 in the blood are represented with Log<sub>10</sub> scale, 6 mice per group, means represented with bars. L.D. limit of detection.

**Figure 7 :** Cellular response to MV in Sv129-wt, hCD46Tg, IFNAR and IFNARhCD46 mice. ELISPOT were done on splenocytes 8 days after one immunization of  $10^5$  TCID<sub>50</sub> of MV-Schwarz injected in 100  $\mu$ l i.p. (A) or one month after two immunizations of  $10^5$  TCID<sub>50</sub> of rMV-Luc, UV-inactivated rMV-Luc or Optimem (negative control) (B). Results are expressed in spots per  $10^6$  millions cells, with Log<sub>10</sub> scale. The bars correspond to median values per group. The positivity threshold is represented in grey. Asterisks (\*) indicate the significance level of the Mann-Whitney nonparametric test: \*\* p<0.01.

Figure 1

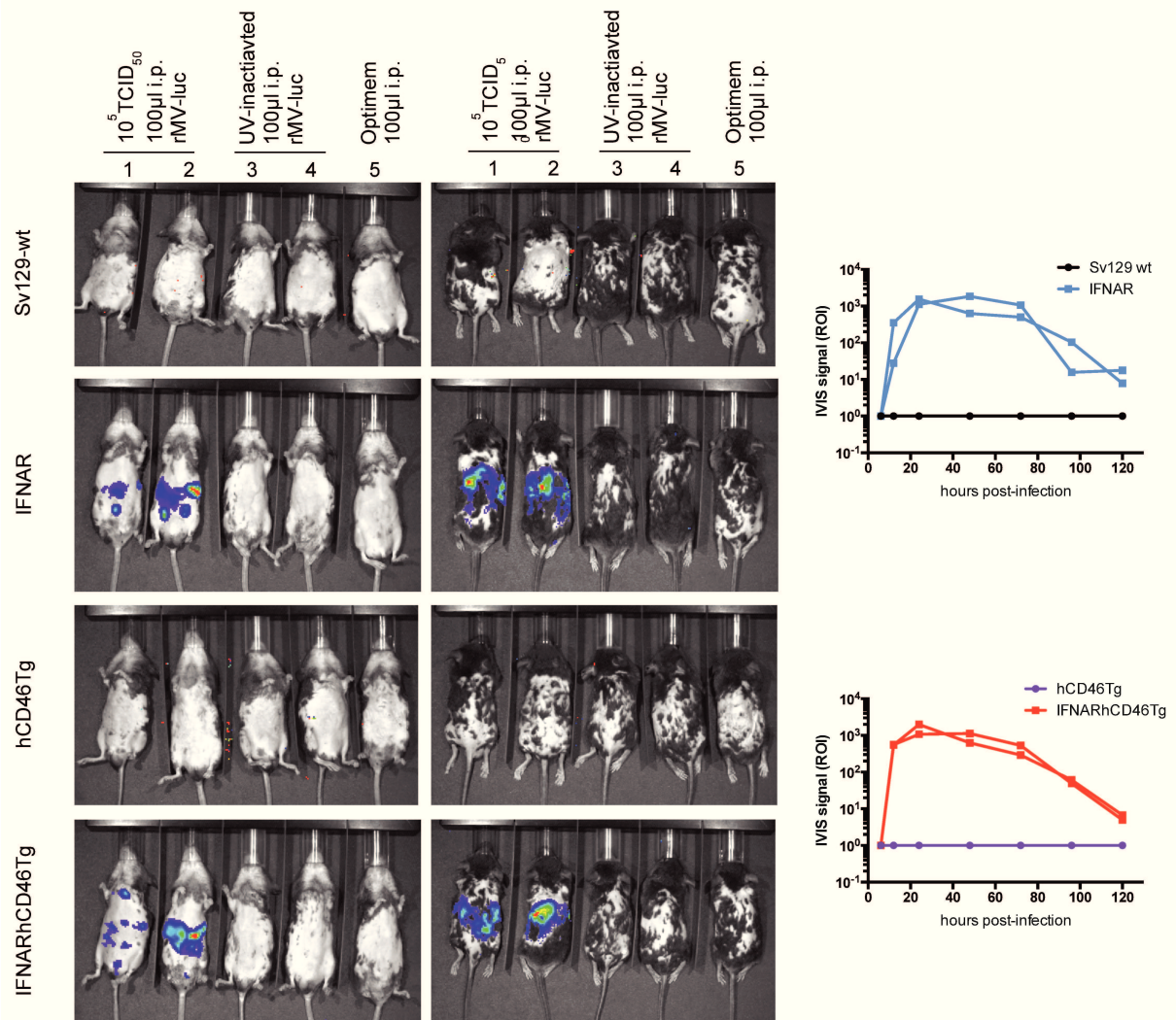


Figure 2

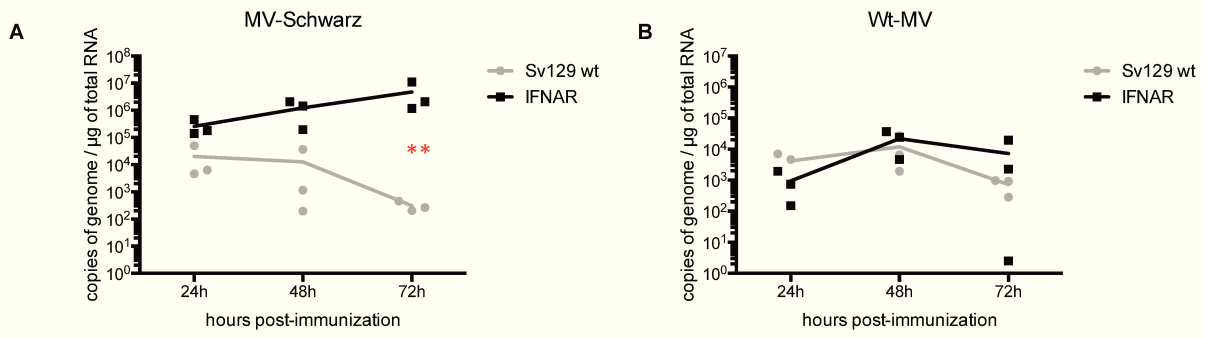


Figure 3

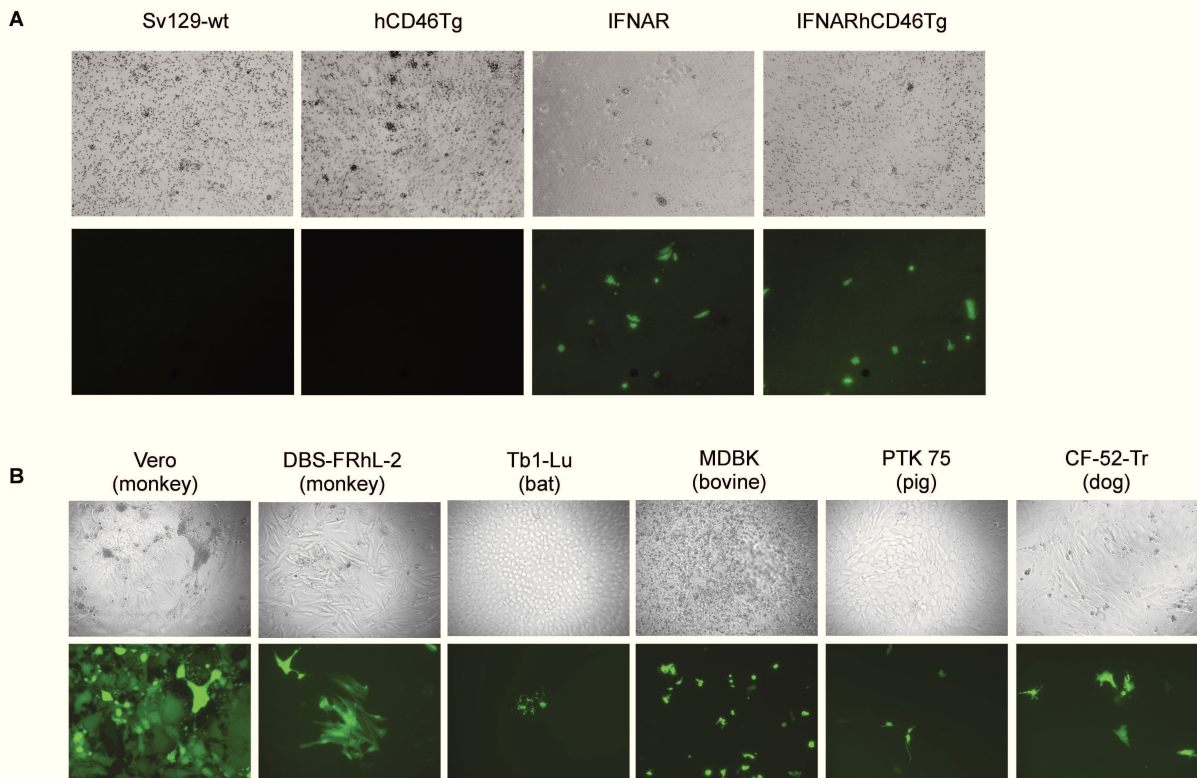


Figure 4

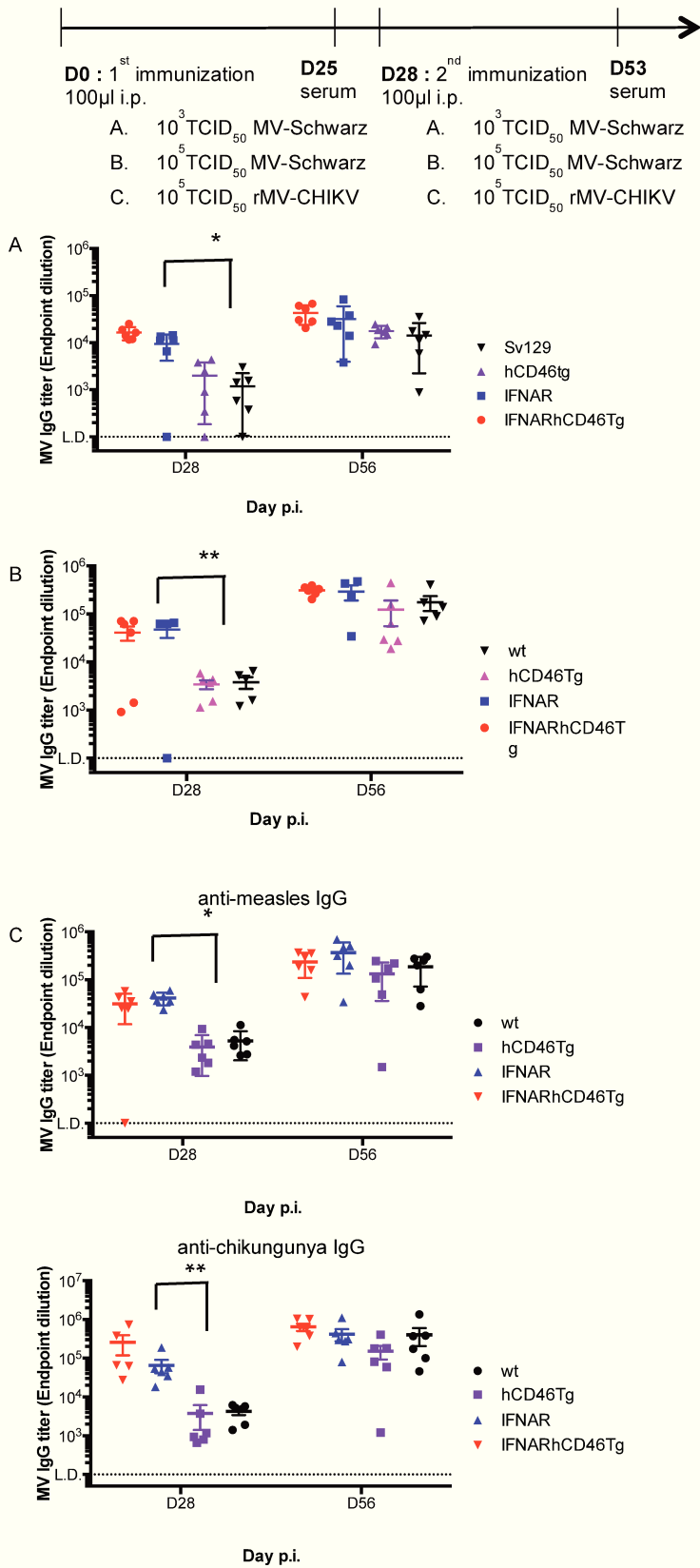


Figure 5

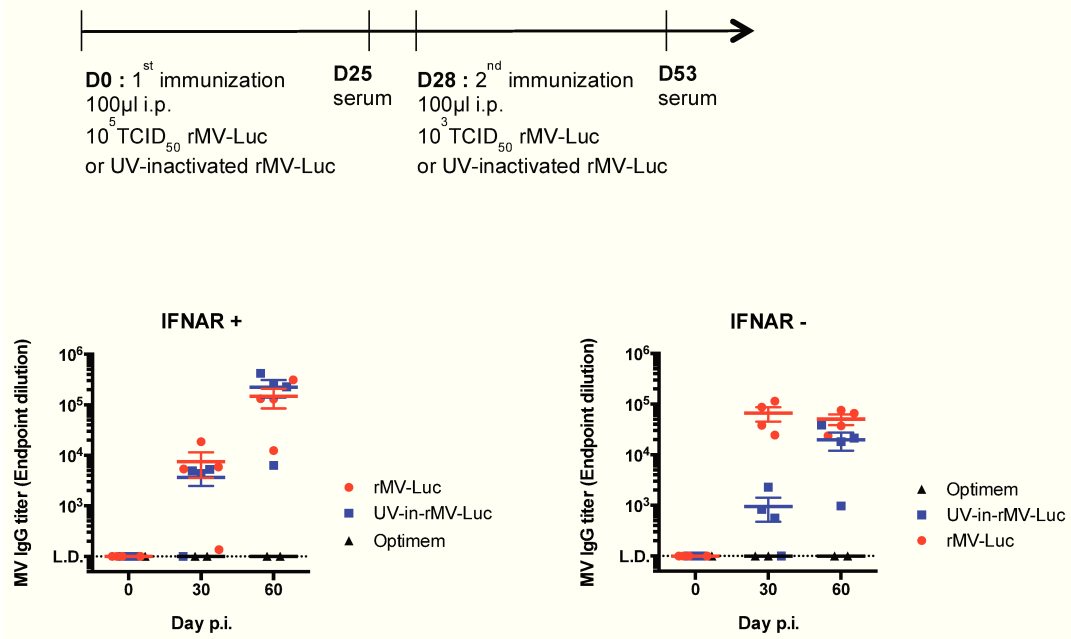


Figure 6

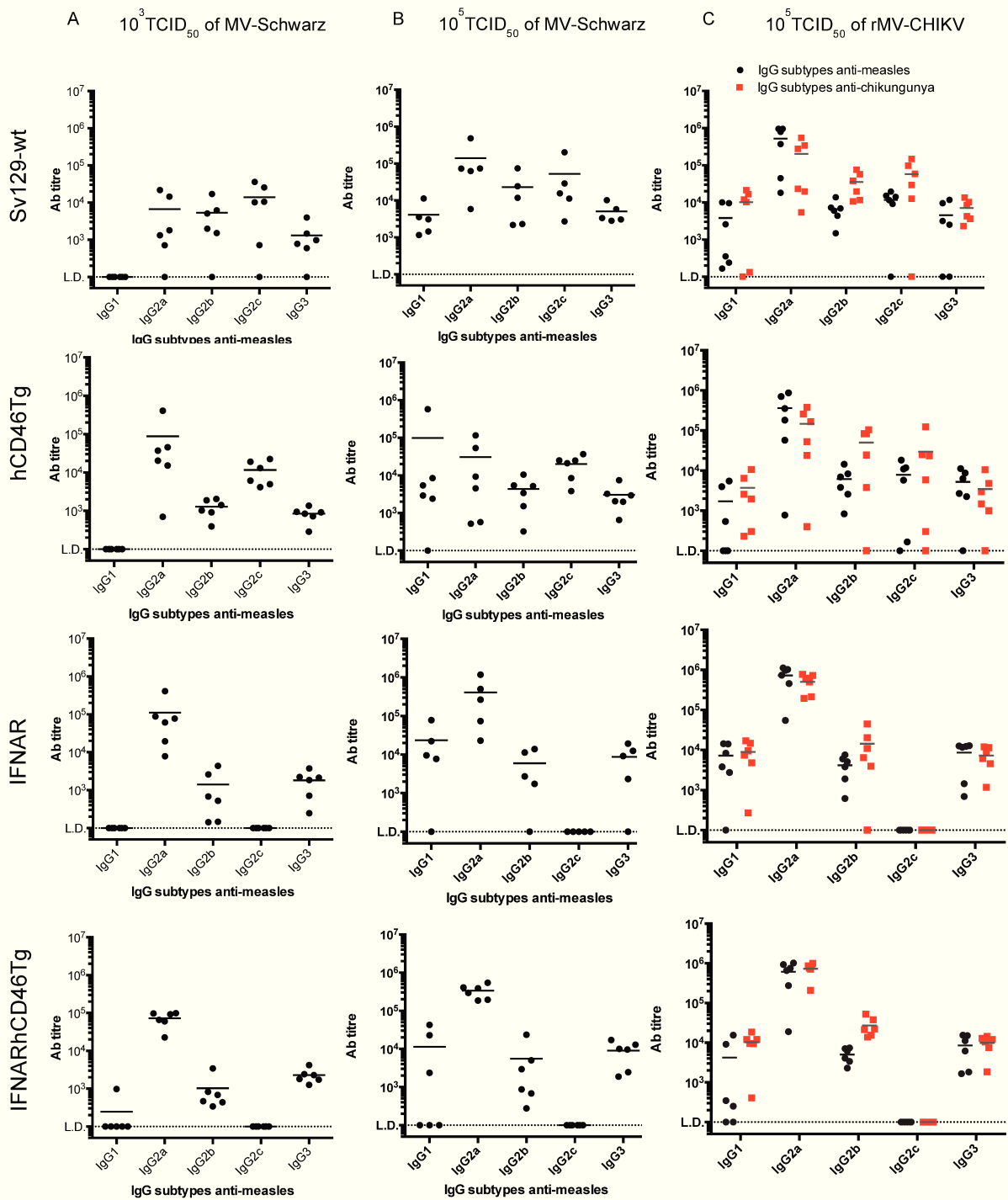
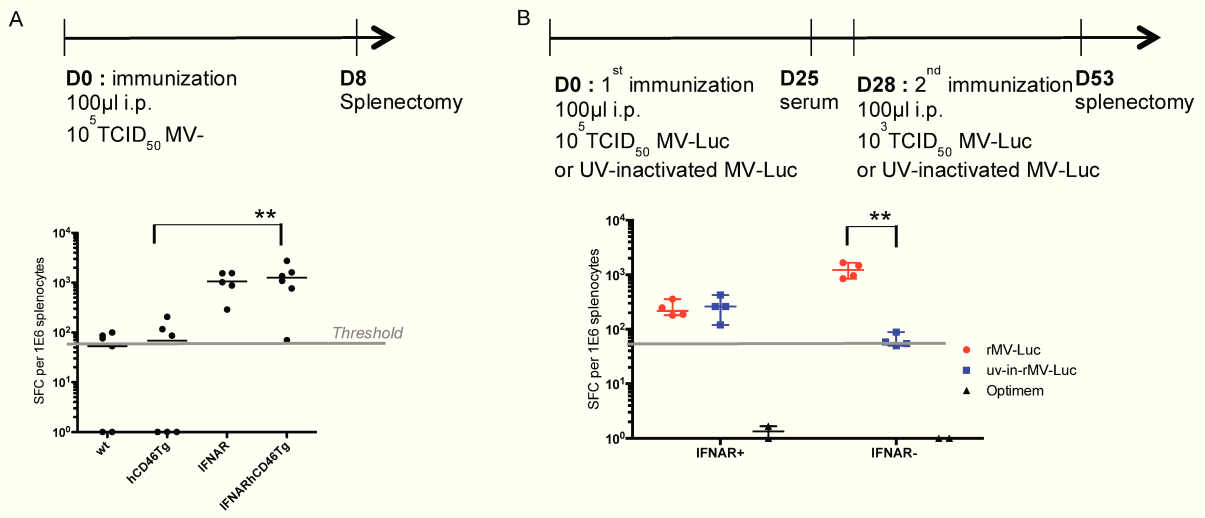




Figure 7



## C. Développement d'un vaccin antipaludique vectorisé par la rougeole

Le paludisme est le modèle d'application de notre travail. La stratégie de production d'un vaccin antipaludique à partir du vecteur rougeole s'est déroulée en trois étapes : (1) une preuve de concept d'utilisation du vecteur rougeole en utilisant l'antigène paludique « *gold standard* » CS sur modèle murin *P. berghei*, puis la CS de *P. falciparum* ; (2) la vectorisation de deux antigènes, CS du stade pré-érythrocytaire et RH5 du stade érythrocytaire ; (3) le développement d'une stratégie vaccinale basée sur l'effet adjuvant des génomes défectifs produits par les vaccins rougeole recombinants.

### 1. Article IV : preuve de concept de l'utilisation du vecteur rougeole pour délivrer l'antigène « gold standard » CS

*Long-term memory induced by recombinant measles vaccine expressing Plasmodium falciparum circumsporozoite protein in mice.*

**Marie Mura**, Claude Ruffié, Chantal Combredet, Pauline Formaglio, Aneesh Vijayan, Chetan Chitnis, Rogerio Amino et Frédéric Tangy.

Soumission imminente au journal VACCINE

Nous avons produit des vecteurs rougeole recombinants exprimant l'antigène CS de *P. berghei* (*Pb*) et *P. falciparum* (*Pf*) pour valider l'utilisation de la plateforme rougeole dans cette indication. Nous avons pu montrer sur des souris H-2<sup>b</sup> deux éléments clés pour le développement d'un vaccin antipaludique de deuxième génération : l'induction d'une mémoire immunologique avec des titres élevés d'anticorps et le développement rapide d'une réponse cellulaire CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Les anticorps, majoritairement de type IgG2a (polarisation Th1), étaient maintenus jusqu'à au moins 22 semaines après la primo immunisation. La protection stérile contre une épreuve infectieuse par *Pb* ANKA était de 33%, comme attendu dans ce modèle murin de neurovirulence avec la CS comme unique antigène. La protection clinique était complète avec une parasitémie réduite. Ces résultats sont très favorables à l'utilisation du vecteur rougeole pour délivrer des antigènes paludiques.

**Long-term memory induced by recombinant measles vaccine expressing  
*Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in mice**

Marie Mura<sup>1,2</sup>, Claude Ruffié<sup>1</sup>, Chantal Combredet<sup>1</sup>, Eduardo Aliprandini<sup>3</sup>, Pauline Formaglio<sup>3</sup>, Ruth Nussenzweig, Victor Nussenzweig, Chetan E. Chitnis<sup>4,\*</sup>, Rogerio Amino<sup>3</sup>, Frédéric Tangy<sup>1,\*</sup>.

1. Viral genomics and vaccination, Institut Pasteur, CNRS UMR-3569, Paris, France.

2. Anti-infectious biotherapies and immunity, Institut de Recherche Biomédicale des Armées BP73, Brétigny-sur-Orge, France

3. Malaria infection and immunity, Institut Pasteur, CNRS UMR-3569, Paris, France.

4. Malaria parasite biology and vaccines, Institut Pasteur, CNRS UMR-3569, Paris, France.

\* Corresponding authors: [ftangy@pasteur.fr](mailto:ftangy@pasteur.fr) / [chetan.chitnis@pasteur.fr](mailto:chetan.chitnis@pasteur.fr)

## Abstract

Following the RTS,S malaria vaccine, which showed only partial protection with short-term memory, there is strong support to develop a second-generation malaria vaccine that yields higher efficacy with longer duration. Due to manufacturing constraints in the development of attenuated whole organism based vaccines, developing sub-unit vaccines for malaria remains attractive. The use of viral vectors to deliver subunit vaccines is of great interest due to their capacity to induce efficient cellular immune responses. The measles virus platform offers an efficient and safe viral vector that could easily be implemented in the field. Here, we produced recombinant measles viruses (rMV) expressing malaria “gold standard” circumsporozoite antigen (CS) of *Plasmodium berghei* (*Pb*) and *Plasmodium falciparum* (*Pf*), to test proof of concept of this delivery strategy. We showed the induction of high antibody responses that were maintained until at least 22 weeks post-prime as well as rapid development of cellular immune responses in H-2<sup>b</sup> mice following immunization with rMV expressing PbCS or PfCS. The observed long-term memory response is key for development of second-generation malaria vaccines. Sterile protection was achieved in 33% of immunized mice and all others were clinically protected from severe and lethal *Pb* ANKA-induced cerebral malaria. Further, rMV-vectored malaria vaccine candidates expressing additional pre-erythrocytic and/or blood-stage antigens in combination with rMV expressing PfCS may provide a path to development of next generation malaria vaccines with higher efficacy.

## Highlights

- Efficient delivery of circumsporozoite malaria antigen inserted in measles vector.
- High antibody responses maintained until at least 22 weeks post-prime.
- Th1 response profile with predominant IgG2a antibodies.
- Sterile protection achieved in 33% of H-2<sup>b</sup> mice.
- Cellular immune response with activated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> specific T cells.

**Key words:** measles vector, malaria, vaccine, long-term memory

## 1. Background

Despite decades of malaria vaccine research, only RTS,S/AS01 vaccine candidate reached Phase III clinical trial to eventually show moderate protection of short duration (1). This led the World Health Organization to recommend additional pilot studies in three countries with enhanced pharmacovigilance (2). Nevertheless, these results are encouraging as they establish the feasibility of developing a malaria vaccine. Furthermore, the spread of artemisinin-resistant *P. falciparum* strains (3) underlines the need for an effective vaccine for sustained protection against malaria. The rationale for malaria vaccine development relies on several observations. First, natural immunity is gradually acquired to severe, life-threatening malaria and then to clinical disease after several years of natural exposure (4). Nevertheless, this immunity is not sterile and quickly wanes if an individual leaves the endemic area. Continued exposure to parasites is, therefore, required to maintain immunological memory (5). Second, transfer of gamma-globulin fractions from semi-immune to naïve humans clears blood stage parasites and mitigates malaria disease (6). Finally, inoculation of irradiated attenuated sporozoites can protect humans against infectious challenge, but requires high and frequent doses, and immunity wanes after six months (7). Therefore, the induction of long-term memory is critical for sustained vaccine efficacy.

The RTS,S subunit vaccine is based on the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein (CS), which is expressed during the sporozoite and early liver stages, and is involved in adhesion and invasion of hepatocytes. CS is known as the lead antigen for inclusion in a pre-erythrocytic vaccine candidate. Based on data on efficacy elicited by CS in pre-clinical as well as human challenge models, the CS is considered a “gold standard” that can be used to evaluate different vaccine delivery platforms and prime-boost strategies (8-10). The CS is composed of a central and conserved Asparagine-Alanine-Asparagine-Proline (NANP) amino acid repeat sequence, known as the immunodominant B-cell epitope. Indeed, CS-specific antibodies and CD4<sup>+</sup> T cell responses were associated with human protection during RTS,S controlled human malaria infection trials (CHMI) (11). However, RTS,S/AS01 did not induce CD8<sup>+</sup> T cell responses, which can play an important role in parasite elimination in the liver (12). Viral vectors are known for their capacity to induce CD8<sup>+</sup> T cell response but prime-boost strategies with AdCh63 and MVA, which are non-replicative viral vectors, were disappointing (13, 14).

The measles virus (MV) vector based vaccine platform offers new opportunities as a replicative but safe viral vector. It has not yet been used to deliver malaria antigens. The rationale for the use of MV is based on the following arguments: (i) MV is one of the safest and most effective human vaccines, eliciting life-long protective immunity against measles after a single injection; (ii) its production can be easily scaled up at low cost, which is important for developing countries where malaria is endemic; (iii) immunization with MV vector induces both humoral and cellular responses to the transgenes (15-19); (iv) MV genome can integrate up to six kb in additional transcription units, allowing the expression of several malaria antigens; (v) a phase I clinical trial with a recombinant MV vaccine expressing chikungunya virus-like particles showed that, unlike non replicative viral vector platforms, there was no impact of pre-existing immunity against measles vector (20). This important point has also been confirmed in the ongoing phase II clinical trial; (vi) In 2016, about 85% of the world's children received one dose of measles vaccine by their first birthday through routine health services. A recombinant measles-malaria vaccine could therefore easily be integrated in vaccination schedules.

Based on previously obtained data in collaboration with R. and V. Nussensweig, we have generated a recombinant MV expressing the CS protein of *Plasmodium berghei* (*Pb*) and *Plasmodium falciparum* (*Pf*) to establish proof of concept for the use of measles vector to express malaria antigens. In the *CSPb* model, we demonstrate that rMV-*CSPb* is able to induce sterile protection of mice or at least protect them from severe symptoms with reduced blood parasitemia. In the *CSPf* model, rMV-*CSPf* induced immunogenicity has a Th1 profile and was maintained from 3 weeks up to, at least, 4 months after the second immunization. Furthermore, we show the induction of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cellular responses. Here, we explore further the use of the MV-based vaccine platform to deliver CS and induce a cellular response as well as high antibody titers with long-term memory. Such a vaccine is key for the development of a malaria vaccine with higher efficacy and long-term protection against *P. falciparum* malaria.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Cell culture**

Vero cells (African green monkey kidney cells) and HEK293-T7-MV (human embryonic kidney cells) helper cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM;

Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (GE Healthcare) and 10.000 U/ml of penicillin-streptomycin (Life technologies). HEK293-T7-MV helpers cells stably express T7 polymerase and MV-N and MV-P proteins and are used for measles viral rescue (Tangy, EU patent, 2006).

2.2. Construction of pTM2-MV Schw-CSPb and pTM2-MV Schw-CSPf plasmids and rescue of rMV-CSPb and rMV-CSPf recombinant viruses

The plasmid pTM2-Schw (21) encodes the cDNA of the anti-genome of the Schwarz MV vaccine strain with an additional transcription unit (ATU) between the phosphoprotein (MV-P) and the matrix (MV-M) genes, flanked by *BsiWI/BssHII* restriction sites. Two cDNAs encoding the circumsporozoite protein of *Plasmodium berghei* ANKA (CSPb ANKA full length sequence, mammalian codon optimized synthetic gene, Eurofins Genomics) and the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* 3D7 (CSPf, truncated form from 19 to 369 aa, without GPI anchored signal at C-terminus, signal sequence from MV Fusion protein at N-terminus, chemically synthesized; Genscript, USA) were inserted in ATU2, to produce respectively pTM2-MV Schw-CSPb and pTM2-MV Schw-CSPf plasmids. The sequences, which were codon optimized for expression in mammalian cells, respected the “rule of six”, which stipulates that the number of nucleotides in the MV genome must be a multiple of 6, and contain *BsiWI/BssHII* restriction sites at both ends. Rescue of both recombinant viruses (rMV-CSPb and rMV-CSPf) was performed as previously described (21) using the helper-cell-based rescue method described by Radecke *et al.* (22, 23) and modified by Parks *et al.* (23). rMV-CSPb and rMV-CSPf were grown on Vero cells.

2.3. Virus growth curves

Monolayers of Vero cells grown in 24-mm-diameter dishes (6-well plates) were infected with rMV-CSPb and rMV-CSPf at an MOI of 1. At various times post-infection, cells were scraped into culture medium. After freeze thawing of cells and medium, and clarification of cell debris, virus titers were determined by endpoint dilution assay. For this purpose, Vero cells were seeded into 96-well plates (7,500 cells/well) and infected with serial 1:10 dilutions of virus sample in DMEM-5% FCS. After incubation for 7 days, cells were stained with crystal violet, and the TCID<sub>50</sub> values were calculated by use of the Spaerman-Kärber method (24).

2.4. Antigens expression

Expression of CSPf and CSPb was assessed in Vero cells infected with rMV-CSPb and rMV-CSPf by IFA and Western blotting. IFA was performed on Vero cells at 36 hours post-infection

with rMV-CSPb and rMV-CSPf at an MOI of 0.1. Cells were probed with 3D11 mouse anti-CSPb monoclonal antibody (1/1,000 dilution) (#MR4-100 hybridoma) or 2A10 mouse anti-CSPf monoclonal antibody (1/1,000 dilution) (#MR4-183 hybridoma). Cy3-conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson immunoresearch laboratories) was used as secondary antibody (1/1,000 dilution). Western blotting was performed on infected Vero cell lysates fractionated by SDS-PAGE and transferred to cellulose membranes. 3D11 mouse anti-CSPb monoclonal antibody and 2A10 mouse anti-CSPf monoclonal antibody were used to detect CS proteins. A goat anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (HRP) conjugate (#P0447, Dako) was used as secondary antibody.

## 2.5. Mice immunizations and challenge

Mice deficient for type-I IFN receptor (IFNAR) and expressing human CD46 (hCD46) (21) were housed under pathogen-free conditions at the Institut Pasteur animal facility. Group of 6 six-week-old hCD46IFNAR mice were inoculated with different doses of MV-Schwarz, rMV-CSPb and rMV-CSPf, *via* the intraperitoneal route (i.p.). To study cellular response, only one immunization was administered and spleens were extracted eight days later. For humoral response and infectious challenge, two immunizations were administered within a 4 weeks interval. Sera were collected before the first immunization (day 0, negative control) and 3 weeks after each immunization, and 4 months after the second immunization to study long-term memory responses. Immunized mice were challenged with *P. berghei* ANKA sporozoites expressing the green fluorescent protein (GFP) under the control of the *hsp70* promoter (25). Alternatively, mice immunized with rMV-CSPf were challenged with *P. berghei* NK65 sporozoites expressing the GFP under the control of the *hsp70* promoter (26) and the CSPb harboring the central repetitive region of CSPf (rGFP-Pb-CSPf repeat) (27). rGFP-Pb-CSPf repeat parasites were generated by a genetic cross as described by Ishino et al. (25). Sporozoites were freshly collected from the salivary gland of infected *Anopheles stephensi* in D-PBS and filtered using a 35µm nylon mesh cell strainer snap cap (Corning Falcon). Infectious challenges were executed 4 weeks after the second immunization (early response), or 4 months after the second immunization (long-term memory response) by the microinjection of 5,000 sporozoites in one microliter of D-PBS in the posterior footpad using a 35G microsyringe (World Precision Instruments). After challenge, parasitemia was monitored from day 3 to day 10. Blood samples (2 µl) were diluted in 500 µl of PBS and analyzed by flow cytometry (MacQuant, Miltenyi Biotec). Doublets and clusters of red



blood cells (RBCs) were excluded from counts. Single GFP + RBCs (infected RBC, iRBCs) among total RBCs were estimated and data analyzed by the MACSQuantify™ Software. As no protection against blood stage parasites was expected, mice were sacrificed at day 10 post-challenge in the presence of iRBCs in order to avoid unnecessary suffering, or before in the presence of severe symptoms that were ethical endpoints (signs of cerebral malaria: motor troubles, ruffled fur and sometimes convulsions). Non-parasitemic mice at day 10 were considered sterile protected. Experiments were conducted following the guidelines of the Office of Laboratory Animal Care at Institut Pasteur.

## 2.6. ELISA

Measles virus antigen, Edmonston strain (#PR-BA102-S-L, Jena Bioscience) antigen at 1 µg/ml in PBS, and CSPb or CSPf recombinant proteins (produced at the Recombinant Protein and Antibodies Production Core Facility of the Institut Pasteur by J. Bellalou and V. Bondet, using the BioPod F800 microfermentor battery) at 1 µg/ml in carbonate buffer were coated overnight at 4°C onto 96-well plates (#439454, Thermo Scientific) and then blocked for 1h at 37°C with a saturation buffer (PBS, 0.05% Tween, 3% BSA). Sera samples from immunized mice were serially diluted (PBS, 0.05% Tween, 1% BSA) and incubated on plates for 1h at 37°C. After washing steps (0.05% Tween in PBS), a secondary horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse Ig antibody (#115-035-146, Jackson ImmunoResearch) was added at a dilution of 1/1,000 for 1h at 37°C. Antibody binding was revealed by addition of the TMB substrate (#5120-0047, Eurobio) and the reaction was stopped by addition of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. The optical densities (O.D.) were recorded at 450 nm. The endpoint titers for each individual serum were calculated as the reciprocal of the last dilution giving twice the absorbance of negative control sera.

## 2.7. ELISPOT assay

Freshly extracted splenocytes from immunized mice were tested for their capacity to secrete IFN-γ upon specific stimulation. Multiscreen-HA 96-well plates (#MSIP4510, Millipore) were coated overnight at 4°C with 5 µg/ml of anti-mouse IFN-γ (#551216, BD Biosciences Pharmingen) in PBS and, after washing, were blocked for 2h at 37°C with complete MEM (MEM - 10% FCS supplemented with non-essential amino-acids 1%, sodium pyruvate 1% and β-mercapto-ethanol). The medium was then replaced with 100 µl of cell suspension containing 2 x 10<sup>5</sup> splenocytes in each well (triplicate) and 100 µl of stimulating agent in complete MEM. Plates were incubated for 40h at 37°C. Cells were stimulated with

Concanavalin A (#C-5275, Sigma) as positive control, complete MEM as negative control, live attenuated MV-Schwarz virus at an MOI of 1, and *CSPf* recombinant protein at 50 µg/ml. After incubation and washing, biotinylated anti-mouse IFN-γ antibody (#554410, BD Biosciences Pharmingen) was added and plates were incubated for 90 minutes at room temperature. After extensive washing, streptavidin-alkaline phosphatase conjugate (#7100-05, Clinisciences) was added and plates were incubated 1h at room temperature. Spots were developed with BCIP/NBT (#B1911, Sigma) and counted in an ELISPOT reader (CTL ImmunoSpot®).

## 2.8. Intracellular cytokine staining

Freshly extracted splenocytes from immunized mice were analyzed by flow cytometry for their capacity to secrete IFN-γ and TNF-α upon specific stimulation. Spleen cells were cultured for 16 hours in U-bottom 96-well plates ( $1.0 \times 10^6$  cells/well) in a volume of 0.2 ml complete medium (MEM - 10% FCS supplemented with non-essential amino-acids 1%, sodium pyruvate 1% and β-mercapto-ethanol). Cells were stimulated with PMA/ionomycin (#00-4970, ebioscience) as positive control, complete MEM as negative control, live attenuated MV-Schwarz virus at an MOI of 1, and *CSPf* LPS-free recombinant protein at 50 µg/ml. Brefeldin A (#B6542, Sigma) was then added at 10 µg/ml for 6 more hours of incubation. Stimulated cells were harvested, washed in phosphate-buffered saline containing 1% bovine serum albumin and 0.1% w/w sodium azide (FACS buffer), incubated 10 minutes with Fc blocking Ab (CD16/32 clone 2.4G2, PharMingen) and surface stained in FACS buffer with Live/Dead fixable dead cell violet kit (#L34955, invitrogen), anti-mouse CD4-PECy7 mAb (#552775, BD Biosciences) and anti-mouse CD8-APCH7 mAb (#560182, BD Biosciences) for 30 minutes at 4°C in the dark. After washing, cells were fixed and permeabilised for intracellular cytokine staining using the Cytofix/Cytoperm kit (#554922, BD Bioscience). Cells were then incubated in a mix of anti-mouse IFNγ-APC mAb (#554413, BD Biosciences) and anti-mouse TNF-α-FITC mAb (#554418, BD Biosciences) diluted in permwash buffer (# 557885, BD Bioscience) for 30 minutes in the dark. After washing with permwash buffer and FACS buffer, cells were fixed with 1% formaldehyde in PBS. Data were acquired using a MacsQuant® Analyzer (Miltenyi Biotec), and analysed using Flow Jo™ 9.3.2 software and are presented as % of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> cells expressing TNF-α or IFNγ among total CD4 or CD8 populations.

## 2.9. Statistical analysis

Parasitemia was Log transformed for normalization. Statistical analyses were done using the t-test. Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Production of rMVs expressing CSPb and CSPf proteins

We constructed an rMV expressing CSPb protein (rMV-CSPb) and an rMV expressing CSPf protein (rMV-CSPf) by inserting mammalian codon-optimized sequences of both proteins in additional transcription unit 2 (ATU2) of pTM-MV Schw plasmid, which encodes the antigenome of the Schwarz MV vaccine strain (21) (Fig. 1A). The ATU2 allows high-level expression of the protein, as there is a decreasing gradient of gene expression generated by MV replication (from high nucleoprotein “N” expression to low polymerase “L” expression). Both plasmids were transfected into HEK293T-helper cells for rescue and co-cultured with Vero cells for virus spread. The rescued rMV-CSPb and rMV-CSPf had slightly delayed growth curves, as compared to empty MV (Fig. 1B), but still reached high titers on Vero cells. Viral stocks were made from unique syncytia after rescue and are therefore considered as clonal. The expression of CS was assessed by Western blot, and found in the lysate and in the supernatant of infected Vero cells (Fig. 1C). The CS expression in infected cells forming syncytia was also demonstrated by immunofluorescence (Fig. 1D). For rMV-CSPf, the stability of transgene expression was demonstrated after 10 passages of the recombinant virus on Vero cells by immunofluorescence, Western blot and sequencing (data not shown). The stability of rMV-CSPb was not tested as the mouse model was only used for proof of concept.

### 3.2. Susceptibility of hCD46IFNAR mice to *Plasmodium berghei* ANKA challenge

Mice are naturally resistant to MV, which is restricted to human and non-human primates. The usual mouse model to test rMV vaccine candidates is deficient for type-I IFN receptor (IFNAR) and expresses human receptor CD46 (hCD46) (21). The genetic background of hCD46IFNAR mouse used here is Sv129, which has the same major histocompatibility complex haplotype as C57BL/6 mouse (H-2Db, H-2Kb, I-Ab). C57BL/6 mice infected with *P. berghei* ANKA (*PbA*) is a model for cerebral malaria, which leads to death. C57BL/6 mice are easily infected and highly susceptible, as compared to Balb/c mice (28, 29). In order to

validate the model of infection in hCD46IFNAR mice, we inoculated 5,000 GFP-expressing *PbA* (GFP *PbA*) sporozoites in the footpad of six C57BL/6 and six hCD46IFNAR mice. We monitored the parasitemia from day 4 to day 6 post-inoculation. Mice were sacrificed at day 6 post-challenge in the presence of iRBCs in order to avoid unnecessary suffering (ethical endpoints). Although parasitemia was slightly higher in hCD46IFNAR group, there was no statistically significant difference between both groups of mice (Fig. 2). So, we concluded that both mouse models were comparable for sporozoite challenge. These observations validated the use of hCD46IFNAR mouse for the rest of the study.

### 3.3. Immunogenicity and protective efficacy of rMV-CSPb as a proof of concept

Six-week-old hCD46IFNAR mice (6 mice per group) received  $10^5$  TCID<sub>50</sub> of rMV-CSPb, or MVSchw as negative control, by intraperitoneal (i.p.) route at day 0 and at day 28. Sera were collected before the first immunization (control) and 3 weeks after each immunization. Antibodies to MV were induced at similar levels in all immunized mice (Fig. 3A). Antibodies to CSPb were efficiently induced from the first immunization with limiting dilution titers of about  $10^4$ , then boosted after the second immunization to reach  $10^5$  (Fig. 3B). Mice were challenged 3 weeks after the second immunization with 5,000 sporozoites of GFP-PbA injected in the footpad. In MVSchw immunized group (control), we sacrificed mice at day 6 post-challenge (Fig. 3C), due to start of cerebral symptoms, which were ethical endpoints of the study. In rMV-CSPb immunized group, two mice (33%) achieved sterile protection (no detectable iRBC at day 10 post-challenge) (Fig. 3D). The other mice showed a significant delayed and decreased parasitemia (Fig. 3E), with no observed severe symptoms. Moreover, at day 10 post-challenge, the parasitemia in rMV-CSPb immunized mice was still less than 1%. So, immunization with rMV-CSPb achieved sterile protection in 33% of hCD46IFNAR mice and completely protected mice from severe and lethal *PbA*-induced cerebral malaria.

### 3.4. Immunogenicity of rMV-CSPf: Th1 IgG subtype profile and long-term memory

Six-week-old hCD46IFNAR mice (6 mice per group) received  $10^5$  TCID<sub>50</sub> of rMV-CSPf, or MVSchw as negative control, by intraperitoneal (i.p.) route at day 0 and at day 28. Sera were collected before the first immunization (control), 3 weeks after each immunization, and 22 weeks after the first immunization for a group of 6 mice dedicated to long-term memory study. As for rMV-CSPb, antibodies to MV were induced at similar levels in all immunized

mice (Fig. 4A) and antibodies to *CSPf* were efficiently induced from the first immunization with limiting dilution titers of about  $10^4$ , then boosted after the second immunization to reach  $10^5$  (Fig. 4B). Interestingly, this high antibody titer was maintained 22 weeks post-prime. The humoral response profile corresponded to Th1 polarization with high titers of IgG2a antibodies (Fig. 4C), as expected for a replicative viral vector. Mice were challenged 3 weeks after the second immunization (early challenge) or 22 weeks post-prime (late challenge) with 5,000 sporozoites of recombinant GFP-*Pb* expressing *CSPb* with *CSPf* repeat sequence (rGFP-*Pb*-*CSPf* repeat), microinjected in the mouse footpad. In MVSchw immunized group (control), all mice were sacrificed at day 6 post-challenge, due to start of cerebral symptoms, which were ethical endpoints of the study. In rMV-*CSPf* immunized group, there was no induction of sterile protection, but a decreased and delayed parasitemia, whether for early (Fig. 4D) or late challenge (Fig. 4E). Mice started to present symptoms of cerebral malaria at day 7 and were sacrificed to avoid unnecessary suffering. This decreased parasitemia was therefore less important than the one observed for rMV-*CSPb*. We hypothesized that the observed difference was due to the challenge model with rGFP-*PbA*-*CSPf* repeat that allow only to study protection relying on neutralizing antibodies directed against the repeat sequence. We therefore evaluated the cellular response in the *Pf* model.

### 3.5. Induction of specific cellular immune response

Cell-mediating immune response (CMI) elicited by immunization with rMV-*CSPf* was assessed using IFN $\gamma$  Elispot assay and intracellular cytokine staining (IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ ) on freshly extracted splenocytes collected 7 days after a single immunization with  $1.10^5$  TCID $_{50}$  in 100 $\mu$ l i.p. (Fig. 5). Splenocytes were stimulated *ex vivo* with inactivated MV-Schwarz at an MOI of 1 or *CSPf* recombinant LPS-free protein at 50  $\mu$ g/ml. A moderate but significant ( $p < 0.01$ ) number of *CSPf*-specific cells (up to  $100/10^6$  splenocytes) were detected by the ELISPOT assay (Fig. 5A), which corresponds to 5-10% of the number of MV-specific spots. The phenotype of MV- and *CSPf*-specific cells induced by rMV-*CSPf* was analyzed by flow cytometry (Fig. 5B). The mean frequency of MV-specific T cells secreting IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  in CD4 $^+$  cells (B1 left panel) was respectively 1.5% and 0.2%. The mean frequency of MV-specific T cells secreting IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  in CD8 $^+$  cells (B1 right panel) was respectively 2.6% and 0.2%. The mean frequency of *CSPf*-specific T cells secreting IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  in CD4 $^+$  cells

(B2 left panel) was respectively 0.16% and 0.14%. The mean frequency of MV-specific T cells secreting IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  in CD8 $^+$  cells (B2 right panel) was respectively 0.3% and 0.18%. An induction of CD4 $^+$  cells secreting IFN $\gamma$  and CD8 $^+$  cells secreting IFN $\gamma$  or TNF $\alpha$  was observed, as compared to control group but statistically not significant ( $p=0.083$ ,  $p=0.088$  and  $p=0.057$  respectively). Even if no CD8 $^+$  epitopes of *CSPf* were described in C57BL/6 mouse, we showed the induction of a moderate but significant CMI as early as 7 days after a single immunization with rMV-*CSPf*, with CD4 $^+$  and CD8 $^+$  activated phenotype.

#### 4. Discussion

Following the moderate protection and short memory response induced by RTS,S vaccine candidate in phase III clinical trial (1), there is strong support for developing a second-generation malaria vaccine with higher efficacy and longer duration of protection. Because of its central place in infant vaccine schedules all over the world, measles provides a promising viral vector to deliver malaria antigens, either as a single delivery platform or in a prime boost strategy. We report here the first use of measles-based vaccine platform to deliver CS malaria antigen as a proof of concept of the feasibility and advantages of this vector, in a murine model. Importantly, we showed induction of cellular response and long-term memory with high antibody titers. These are the two main characteristics required for second-generation malaria vaccine candidates.

We first showed the possibility of stably expressing a malaria antigen using the measles virus as a delivery vector. *CSPb* and *CSPf* sequences were successfully inserted in MV-Schwarz genome and stably maintained after 10 passages in Vero cell culture, without any mutation. Nevertheless, we were unable to rescue a virus with CS native sequence (data not shown) and therefore mammalian codon-optimized sequence is required. The *P. falciparum* genome is AT rich (30) and polyA / polyU probably disturbed measles polymerase, either for replication or transcription. As MV-Schwarz vector is able to insert 6 kb in its additional transcription units, other antigens could be easily added to CS to improve vaccine efficacy.

Then we showed in the hCD46IFNAR mouse model the induction of high antibody titers that are maintained at least until 22 weeks post-prime in a two-immunization schedule with one-month interval. This maintenance of high antibody level was longer than the one observed with CS administered in a three doses regimen at 50  $\mu$ g with complete Freund's adjuvant in C57BL/6 mice (31), whereas rMV delivered only ng of heterologous antigens

(17). R16HBsAg, a precursor of RTS,S, induced high level of antibodies in mice when administered with alum in a three dose regimen, but was not assessed more than 5 weeks after the last immunization (32). In monkeys, RTS,S/AS01B formulation has shown a rapid decrease of CS antibodies 8 weeks after each boost (33). The long-term persistence of neutralizing antibodies against heterologous antigens vectored by rMV has already been described for an rMV expressing HIV antigens in both mouse (16) and non-human primate (NHP) models (19). Thus, the observed maintenance of high anti-CS antibody level is promising regarding MV efficiency to induce life-long memory. IgG sub-types were predominantly IgG2a, which was expected for a replicating viral vector. This subclass is cytophilic in mice (34), with complement fixation and pathogen opsonization. Moreover, induction of cytophilic CS antibodies has been associated with protection from re-infection in the field (35). Nevertheless, it is important to remember that the parasite itself escapes immunity by modulating immune responses (36). Thus, further investigations of memory B cells' survival (37) and dendritic cells' functionality (38) after infectious challenge would help identify predictive factors of long-term efficacy in human.

To evaluate protection, we used C57BL/6 mice and *PbA* model, which is a relevant model of liver stage immunity that closely resembles the situation in humans. In this model, sterile protection is not as easy as for Balb/c mice, where *CSPb* is target of immuno-dominant and protective CD8+ T cell response (39). Indeed, CS seems to contain no naturally processed and presented H-2<sup>b</sup> restricted epitopes (29). Sv129 hCD46IFNAR mice and C57BL/6 mice both expressed H-2<sup>b</sup> major histocompatibility complex. We showed that they were similarly sensitive to *PbA* challenge, with similar clinical features and no statistical difference in parasitemia on days 3, 4, 5 and 6 post-infection. Palomo et al. showed a slightly delayed experimental cerebral malaria development and prolonged survival of C57BL/6 IFNAR mice, as compared to wild-type mice (40). Nevertheless, we defined ethical endpoints at the beginning of the study that have imposed an early sacrifice at day 6 or 7 post-infection, and we did not wait for natural death to avoid unnecessary suffering. rMV-*CSPb* was able to elicit sterile protection in 33% of mice and to protect all of them from severe disease, with a reduced and delayed parasitemia, and no severe clinical symptoms. In the rGFP-*PbA-CSPf* repeat challenge model, there was no sterile protection and reduction in parasitemia was less compared to the *PbA* model. This suggests that sterile protection was not induced by neutralizing antibodies directed against the repeat sequence of *CSPf*, but may involve

antibodies against C and N-terminal domains of CS and cell-mediated immune responses. In fact, phagocytic activity of antibodies induced by RTS,S/AS01 malaria vaccine has been correlated with full-length CS and C-terminal specific antibody titer, but not to repeat region antibody titer (41). Accordingly, we showed a moderate but significant induction of cell-mediated immune response that appeared as early as 7 days after a single immunization, with an increase in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> specific T cells secreting IFN $\gamma$  or TNF $\alpha$ . As there is no described CD8<sup>+</sup> epitope for CSPf in H-2<sup>b</sup> mice, the increase observed, even if moderate, is of great interest. Indeed, protection against malaria has been correlated to CSPf CD8<sup>+</sup> T cell response in human immune system (HIS) mice harboring functional human CD8<sup>+</sup> T cells (42). This major role for CD8<sup>+</sup> T cells to induce protection was already shown by *in vivo* depletion of CD8<sup>+</sup> T cells that abrogated sporozoite-induced protective immunity in mice (43). Thus, even if the protection resulting from rGFP-PbA-CSPf repeated challenge model was not indicative of real protection, it brought indications of efficient immune mechanisms involved in protection.

To conclude, we demonstrated the promising potential of using measles vector to deliver malaria antigens by showing induction of cellular immune responses and long-term memory with high antibody titers in mice. These are two critical desired characteristics for second-generation malaria vaccines. As expected, expression of CS alone was not able to induce sterile protection in this mouse model and we have used it only as a 'gold standard' to validate our viral vector. Further recombinant measles-vectored malaria vaccine candidates expressing additional pre-erythrocytic and/or blood-stage antigens in combination with CS will be soon under evaluation. It remains to be seen if such combinations yield synergistic effects to provide protection with higher efficacy and for longer duration.

#### **Declaration of interest**

The authors declare no conflict of interest.

#### **Contributions**

M.M. and F.T. designed the study, in collaboration with C.E.C and R.A. M.M. and C.C. performed the vaccine constructions and viral rescues. M.M., C.R., P.F. and R.A. performed the mice experiments. R.A. and E.A. provided and maintained the transgenic parasites. M.M performed the immunology experiments, analyzed the data and prepared the manuscript. All authors contributed to final manuscript.



## Acknowledgements

The authors thank the team of the Centre of Production and Infection of Anopheles, Institut Pasteur, for providing mosquitoes.

## Funding

The Major Federating Program Vaccinology of Institut Pasteur, and the CNRS supported this work with an internal grant to C.E.C (PI), F.T. (co-PI) and R.A. (co-PI). M.M. was supported by the Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA).

## References

1. Aaby P, Rodrigues A, Kofoed PE, Benn CS. RTS,S/AS01 malaria vaccine and child mortality. *Lancet*. 2015;386(10005):1735-6.
2. Greenwood B, Doumbo OK. Implementation of the malaria candidate vaccine RTS,S/AS01. *Lancet*. 2016;387(10016):318-9.
3. Blasco B, Leroy D, Fidock DA. Antimalarial drug resistance: linking *Plasmodium falciparum* parasite biology to the clinic. *Nat Med*. 2017;23(8):917-28.
4. Riley EM, Stewart VA. Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development. *Nat Med*. 2013;19(2):168-78.
5. Triller G, Scally SW, Costa G, Pissarev M, Kreschel C, Bosch A, et al. Natural Parasite Exposure Induces Protective Human Anti-Malarial Antibodies. *Immunity*. 2017;47(6):1197-209 e10.
6. Cohen S, Mc GI, Carrington S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature*. 1961;192:733-7.
7. Ishizuka AS, Lyke KE, DeZure A, Berry AA, Richie TL, Mendoza FH, et al. Protection against malaria at 1 year and immune correlates following PfSPZ vaccination. *Nat Med*. 2016;22(6):614-23.
8. Ockenhouse CF, Sun PF, Lanar DE, Wellde BT, Hall BT, Kester K, et al. Phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy trial of NYVAC-Pf7, a pox-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis*. 1998;177(6):1664-73.
9. Stoute JA, Kester KE, Krzych U, Wellde BT, Hall T, White K, et al. Long-term efficacy and immune responses following immunization with the RTS,S malaria vaccine. *J Infect Dis*. 1998;178(4):1139-44.
10. Chuang I, Sedegah M, Cicitelli S, Spring M, Polhemus M, Tamminga C, et al. DNA prime/Adenovirus boost malaria vaccine encoding *P. falciparum* CSP and AMA1 induces sterile protection associated with cell-mediated immunity. *PLoS One*. 2013;8(2):e55571.
11. White MT, Bejon P, Olotu A, Griffin JT, Riley EM, Kester KE, et al. The relationship between RTS,S vaccine-induced antibodies, CD4(+) T cell responses and protection against *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS One*. 2013;8(4):e61395.
12. Radtke AJ, Kastenmuller W, Espinosa DA, Gerner MY, Tse SW, Sinnis P, et al. Lymph-node resident CD8alpha+ dendritic cells capture antigens from migratory malaria sporozoites and induce CD8+ T cell responses. *PLoS Pathog*. 2015;11(2):e1004637.
13. Ockenhouse CF, Regules J, Tosh D, Cowden J, Kathcart A, Cummings J, et al. Ad35.CS.01-RTS,S/AS01 Heterologous Prime Boost Vaccine Efficacy against Sporozoite Challenge in Healthy Malaria-Naive Adults. *PLoS One*. 2015;10(7):e0131571.

14. Dunachie SJ, Walther M, Vuola JM, Webster DP, Keating SM, Berthoud T, et al. A clinical trial of prime-boost immunisation with the candidate malaria vaccines RTS,S/AS02A and MVA-CS. *Vaccine*. 2006;24(15):2850-9.
15. Lorin C, Mollet L, Delebecque F, Combredet C, Hurtrel B, Charneau P, et al. A single injection of recombinant measles virus vaccines expressing human immunodeficiency virus (HIV) type 1 clade B envelope glycoproteins induces neutralizing antibodies and cellular immune responses to HIV. *J Virol*. 2004;78(1):146-57.
16. Guerbois M, Moris A, Combredet C, Najburg V, Ruffie C, Fevrier M, et al. Live attenuated measles vaccine expressing HIV-1 Gag virus like particles covered with gp160DeltaV1V2 is strongly immunogenic. *Virology*. 2009;388(1):191-203.
17. Brandler S, Lucas-Hourani M, Moris A, Frenkiel MP, Combredet C, Fevrier M, et al. Pediatric measles vaccine expressing a dengue antigen induces durable serotype-specific neutralizing antibodies to dengue virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2007;1(3):e96.
18. Liniger M, Zuniga A, Morin TN, Combardiére B, Marty R, Wiegand M, et al. Recombinant measles viruses expressing single or multiple antigens of human immunodeficiency virus (HIV-1) induce cellular and humoral immune responses. *Vaccine*. 2009;27(25-26):3299-305.
19. Stebbings R, Fevrier M, Li B, Lorin C, Koutsoukos M, Mee E, et al. Immunogenicity of a recombinant measles-HIV-1 clade B candidate vaccine. *PLoS One*. 2012;7(11):e50397.
20. Ramsauer K, Schwameis M, Firbas C, Mullner M, Putnak RJ, Thomas SJ, et al. Immunogenicity, safety, and tolerability of a recombinant measles-virus-based chikungunya vaccine: a randomised, double-blind, placebo-controlled, active-comparator, first-in-man trial. *Lancet Infect Dis*. 2015;15(5):519-27.
21. Combredet C, Labrousse V, Mollet L, Lorin C, Delebecque F, Hurtrel B, et al. A molecularly cloned Schwarz strain of measles virus vaccine induces strong immune responses in macaques and transgenic mice. *J Virol*. 2003;77(21):11546-54.
22. Radecke F, Spielhofer P, Schneider H, Kaelin K, Huber M, Dotsch C, et al. Rescue of measles viruses from cloned DNA. *EMBO J*. 1995;14(23):5773-84.
23. Parks CL, Lerch RA, Walpita P, Sidhu MS, Udem SA. Enhanced measles virus cDNA rescue and gene expression after heat shock. *J Virol*. 1999;73(5):3560-6.
24. Spaerman C. The Method of "Right and Wrong Cases" (Constant Stimuli) without Gauss's Formula. *Br J Psychol*. 1908(2):227-42.
25. Ishino T, Orito Y, Chinzei Y, Yuda M. A calcium-dependent protein kinase regulates Plasmodium ookinete access to the midgut epithelial cell. *Mol Microbiol*. 2006;59(4):1175-84.
26. Demarta-Gatsi C, Smith L, Thiberge S, Peronet R, Commere PH, Matondo M, et al. Protection against malaria in mice is induced by blood stage-arresting histamine-releasing factor (HRF)-deficient parasites. *J Exp Med*. 2016;213(8):1419-28.
27. Persson C, Oliveira GA, Sultan AA, Bhanot P, Nussenzweig V, Nardin E. Cutting edge: a new tool to evaluate human pre-erythrocytic malaria vaccines: rodent parasites bearing a hybrid Plasmodium falciparum circumsporozoite protein. *J Immunol*. 2002;169(12):6681-5.
28. Jaffe RI, Lowell GH, Gordon DM. Differences in susceptibility among mouse strains to infection with Plasmodium berghei (ANKA clone) sporozoites and its relationship to protection by gamma-irradiated sporozoites. *Am J Trop Med Hyg*. 1990;42(4):309-13.
29. Hafalla JC, Bauza K, Friesen J, Gonzalez-Aseguinolaza G, Hill AV, Matuschewski K. Identification of targets of CD8(+) T cell responses to malaria liver stages by genome-wide epitope profiling. *PLoS Pathog*. 2013;9(5):e1003303.

30. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2002;419(6906):498-511.
31. Wirtz RA, Ballou WR, Schneider I, Chedid L, Gross MJ, Young JF, et al. *Plasmodium falciparum*: immunogenicity of circumsporozoite protein constructs produced in *Escherichia coli*. *Exp Parasitol*. 1987;63(2):166-72.
32. Rutgers TD, D.; Gathoye A.M.; Hollingdale, M.; Hockmeyer, W.; Rosenberg, M.; De Wilde, M. Hepatitis B surface antigen as carrier matrix for the repetitive epitope of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. *Nat Biotechnol*. 1988;6:1065-70.
33. Mettens P, Dubois PM, Demoitie MA, Bayat B, Donner MN, Bourguignon P, et al. Improved T cell responses to *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in mice and monkeys induced by a novel formulation of RTS,S vaccine antigen. *Vaccine*. 2008;26(8):1072-82.
34. Waldmann H. Manipulation of T-cell responses with monoclonal antibodies. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:407-44.
35. John CC, Moormann AM, Pregibon DC, Sumba PO, McHugh MM, Narum DL, et al. Correlation of high levels of antibodies to multiple pre-erythrocytic *Plasmodium falciparum* antigens and protection from infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73(1):222-8.
36. Wykes MN. Why haven't we made an efficacious vaccine for malaria? *EMBO Rep*. 2013;14(8):661.
37. Liu XQ, Stacey KJ, Horne-Debets JM, Cridland JA, Fischer K, Narum D, et al. Malaria infection alters the expression of B-cell activating factor resulting in diminished memory antibody responses and survival. *Eur J Immunol*. 2012;42(12):3291-301.
38. Wykes MN, Good MF. What really happens to dendritic cells during malaria? *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(11):864-70.
39. Romero P, Maryanski JL, Corradin G, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Zavala F. Cloned cytotoxic T cells recognize an epitope in the circumsporozoite protein and protect against malaria. *Nature*. 1989;341(6240):323-6.
40. Palomo J, Fauconnier M, Coquard L, Gilles M, Meme S, Szeremeta F, et al. Type I interferons contribute to experimental cerebral malaria development in response to sporozoite or blood-stage *Plasmodium berghei* ANKA. *Eur J Immunol*. 2013;43(10):2683-95.
41. Chaudhury S, Ockenhouse CF, Regules JA, Dutta S, Wallqvist A, Jongert E, et al. The biological function of antibodies induced by the RTS,S/AS01 malaria vaccine candidate is determined by their fine specificity. *Malar J*. 2016;15:301.
42. Li X, Huang J, Zhang M, Funakoshi R, Sheetij D, Spaccapelo R, et al. Human CD8+ T cells mediate protective immunity induced by a human malaria vaccine in human immune system mice. *Vaccine*. 2016;34(38):4501-6.
43. Weiss WR, Sedegah M, Beaudoin RL, Miller LH, Good MF. CD8+ T cells (cytotoxic/suppressors) are required for protection in mice immunized with malaria sporozoites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(2):573-6.

## Figures legends

**Figure 1.** . rMV-CSPb and rMV CSPf. (A) Schematic representation of measles vector expressing CS protein from *Plasmodium berghei* ANKA (CSPb) and *Plasmodium falciparum* (CSPf). The synthetic sequence was mammalian codon-optimized and cloned into the Additional Transcription Unit (ATU) position 2 of pTM-Schwarz. The MV genes are indicated as follows: nucleoprotein (N), phosphoprotein (P), V and C accessory proteins, matrix (M), fusion (F), hemagglutinin (H) and polymerase (L). T7 RNA polymerase promoter (T7), T7 RNA polymerase terminator (T7t), hepatitis delta virus ribozyme ( $\delta$ ), hammerhead ribozyme (hh) are requested for viral rescue. (B) Growth curves of MV-Schwarz, rMV-CSPb and rMV-CSPf in Vero cells infected at an MOI of 0.1. Cell-associated virus titers are indicated in TCID<sub>50</sub>/ml. (C) Detection by western-blot of CSPb and CSPf in cell lysates (L) or supernatant (SN) of Vero cells infected by rMV-CSPb and rMV CSPf. (D) Immunofluorescence detection of CSPb and CSPf in Vero cells infected for 24 hours with rMV-CSPb and rMV-CSPf at an MOI of 0.1. Infected cells formed syncytia where are localized CS proteins.

**Figure 2.** Blood parasitemia of C57BL/6 and hCD46IFNAR mice after skin microinjection of 5,000 sporozoites of *Plasmodium berghei* ANKA. Percentage of infected red blood cells (iRBCs) at day 4, 5 and 6 post-infection (p.i.) was log transformed for parasitemia normalization before statistical analysis. No statistically significant difference was observed between both groups. N.I. threshold of parasitemia detection.

**Figure 3.** Immunogenicity and protective efficacy of rMV-CSPb. Antibody response induced in hCD46IFNAR mice immunized with rMV-CSPb at day 0 and 4 weeks later. The data show the reciprocal endpoint dilution titers of specific antibodies to MV (A) and CSPb (B). Percentage of asymptomatic (C) and non-infected (D) hCD46IFNAR mice (6 mice per group) immunized twice at one month of interval and challenged 3 weeks after with 5,000 *Pb* ANKA sporozoites intradermally. (E) Log of parasitemia at day 4, 5 and 6 post-infection (p.i.) (means +/- SD). Asterisks (\*) indicate significant mean differences (\*\* for  $p < 0.01$  ; \*\*\* for  $p < 0,001$ ). L.D. level of detection. N.I. threshold of parasitemia detection

**Figure 4.** Immunogenicity and protective efficacy of rMV-CSPf. (A-C) Antibody response induced in hCD46IFNAR mice immunized with rMV-CSPf at day 0 and 4 weeks later. Long-term memory was assessed at week 22 post-priming. The data show the reciprocal endpoint dilution titers of specific antibodies to MV (A) and CSPf (B). (C) IgG subtypes of CSPf antibodies elicited by rMV-CSPf 4 weeks after the second immunization. (D-E) Infectious challenge with 5,000 sporozoites of a recombinant PbA expressing CSPf repeat sequence 3 weeks (D) or 16 weeks (E) after the second immunization. Log of parasitemia at days 4, 5 and 6 post-infection (p.i.) (means +/-SD). Asterisks (\*) indicate significant mean differences (\* for  $p < 0.05$  ; \*\* for  $p < 0.01$ ). L.D. level of detection. N.I. threshold of parasitemia detection.

**Figure 5.** Cellular response to rMV-CSPf. (A) IFN $\gamma$  Elispot assay and (B) intracellular cytokine staining assay were done on freshly extracted splenocytes 7 days after one immunization i.p. with  $1.10^5$  TCID $_{50}$  of MV-Schwarz or rMV-CSPf. Splenocytes were restimulated with inactivated MV-Schwarz at an MOI of 1 or CSPf recombinant LPS-free protein at 50  $\mu$ g/ml. CD4 $^+$  and CD8 $^+$  T-cells were stained against IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ . Negative controls, cultured with media alone, showed less than 0.05% of positive cells (data not shown). Percentile IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  cytokine distribution for CD4 $^+$  and CD8 $^+$  T-cells reactive against MV-Schwarz (B1) and upon CSPf restimulation (B2). Asterisks (\*) indicate significant mean differences (\*\* for  $p < 0.01$ )

Figure 1

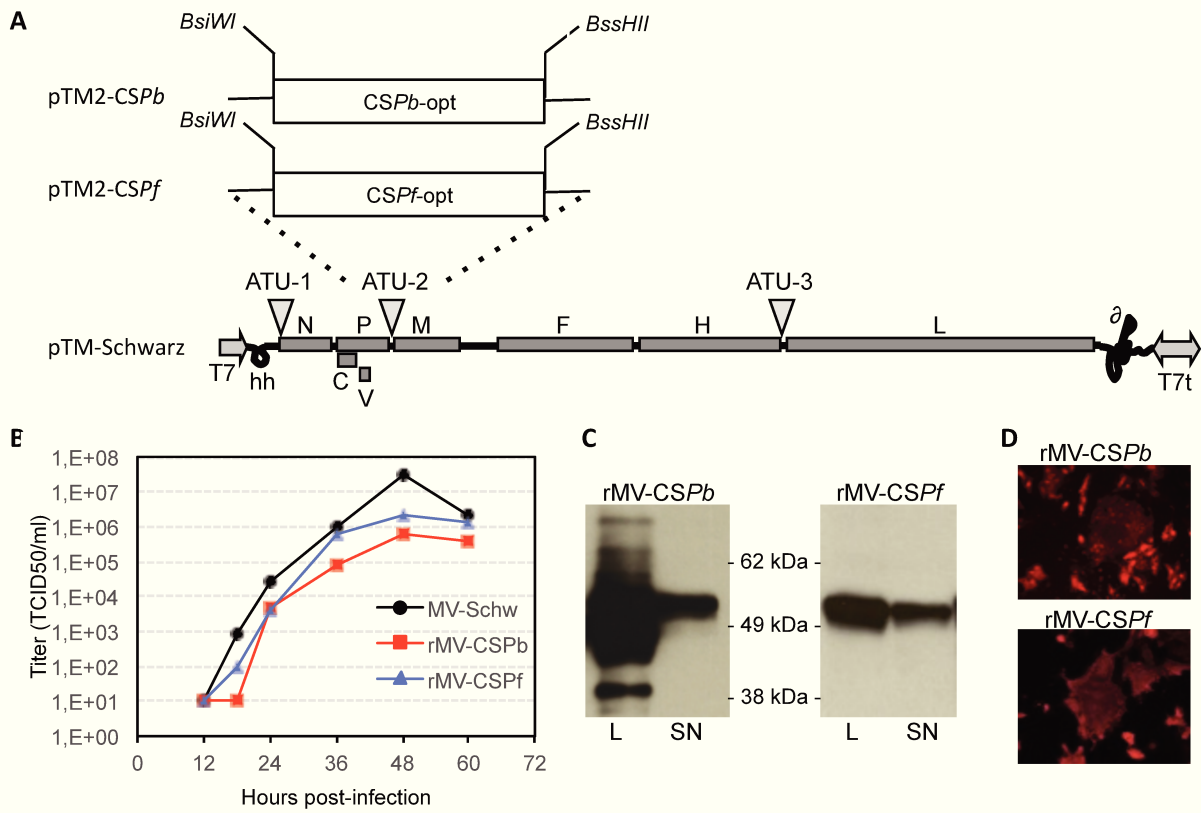


Figure 2

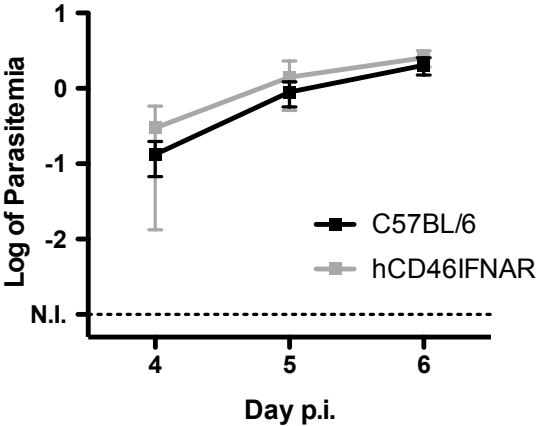


Figure 3

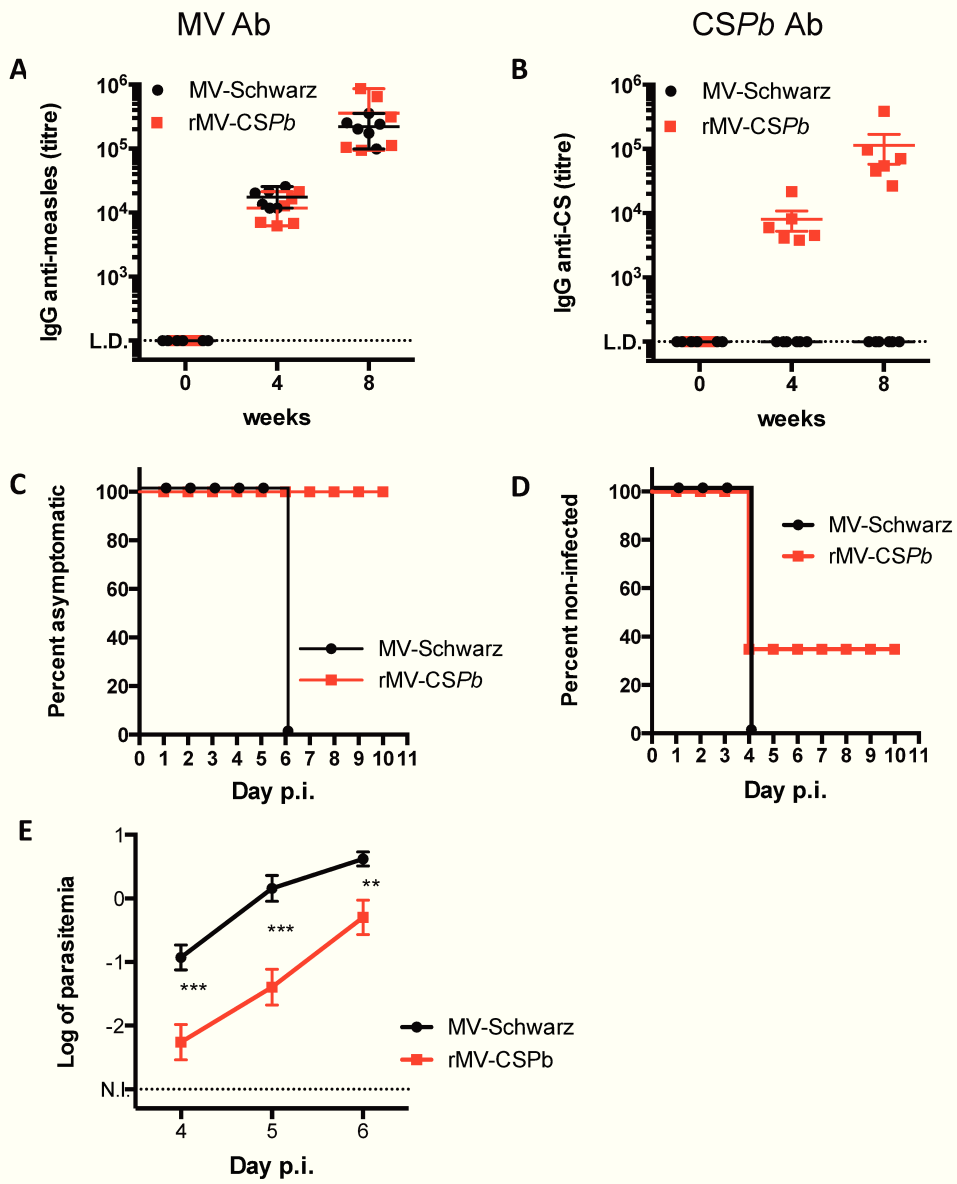




Figure 4

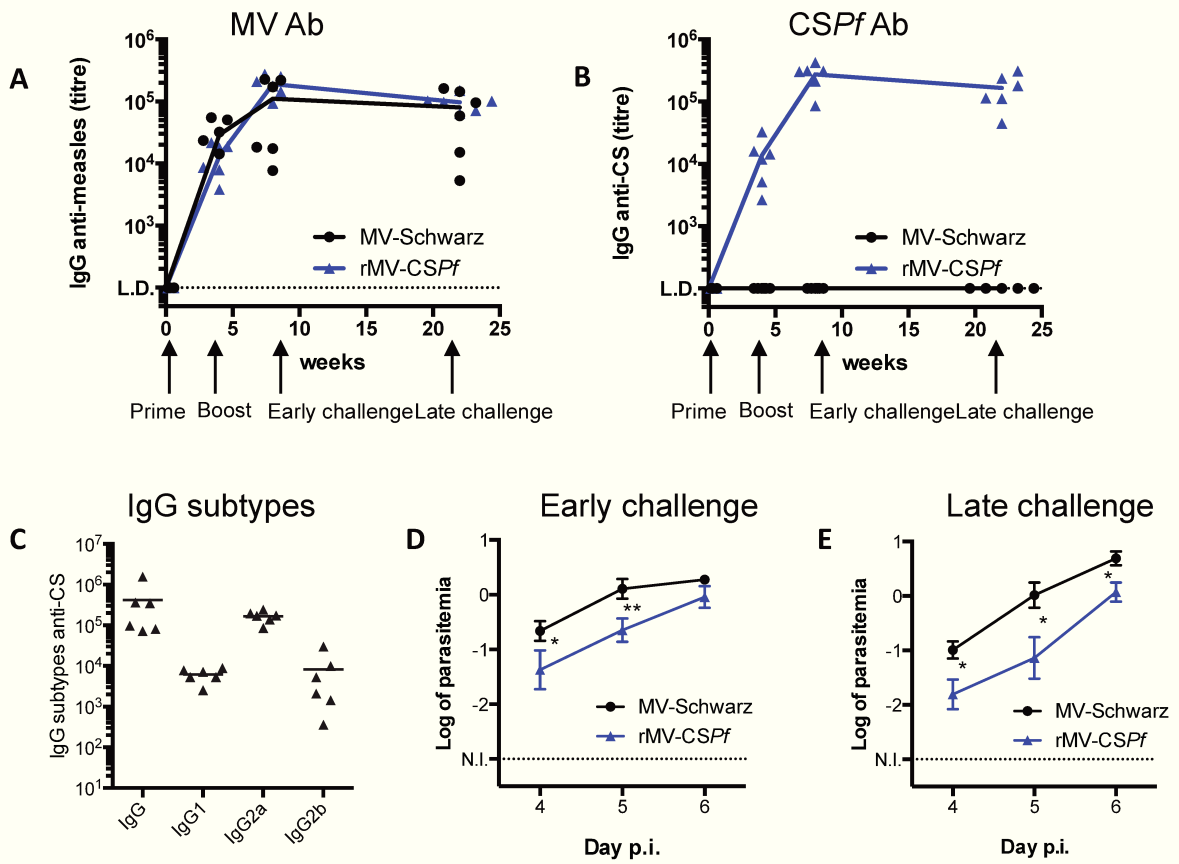
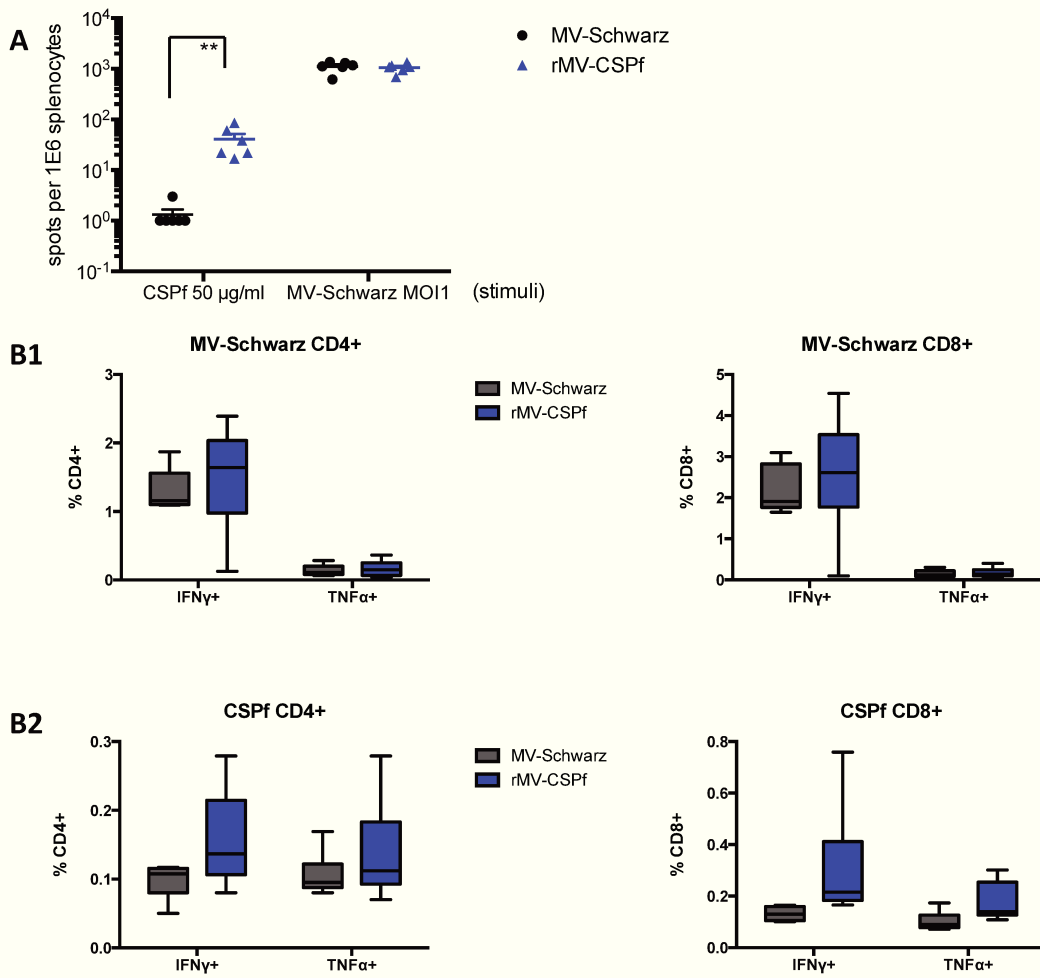


Figure 5



## 2. Production d'un vecteur vaccinal multi-stade / multi-antigénique

Dans l'objectif de produire un candidat vaccinal multi-stade, c'est-à-dire dirigé contre les stades pré-érythrocytaires et érythrocytaires de *Pf*, nous avons construit deux VacR recombinants exprimant les antigènes CS et RH5 sous forme soluble (rMV-Sol-FalVAX) ou transmembranaire (rMV-TM-FalVAX) (Figure 25A). Dans chaque cas, le peptide signal de la protéine F du VacR était ajouté en 5' de la séquence. Les protéines étaient exprimées sous une forme tronquée connue pour présenter une conformation identique à la protéine sous sa forme complète : acides aminés 140 à 526 pour RH5 (274), et acides aminés 19 à 369 pour la CS (délétion de la séquence codant pour l'ancre GPI qui favorise chez les eucaryotes la séquestration de la protéine dans le cytoplasme) (275). Pour exprimer ces protéines sous forme ancrée dans la membrane, nous avons ajouté la séquence transmembranaire et intracytoplasmique de la protéine F du VacR en 3' des deux séquences. Les séquences ont été optimisées pour l'expression chez les mammifères. Les virus recombinants produits présentaient une croissance correcte (Figure 25B), et exprimaient les protéines CS et RH5 (Figure 25C/D).

Les tests d'immunogénicité réalisés sur souris IFNARhCD46tg suivaient le même schéma vaccinal que précédemment, à savoir deux immunisations par  $10^5$  TCID<sub>50</sub> pour chaque virus, injecté par la voie intra péritonéale (100µl) à un mois d'intervalle. Trois groupes de 6 souris ont été immunisés par MV-Schwarz (contrôle négatif), rMV-Sol-FalVAX et rMV-TM-FalVAX. La réponse anticorps anti-CS était identique à celle observée dans l'article IV, à savoir des titres élevés superposables à la réponse anti-rougeole (Figure 25A). Par contre, la réponse anticorps anti-RH5 était faible pour rMV-TM-FalVAX et rMV-Sol-FalVAX (titres de  $10^3$ ) après deux immunisations, voire inexistante pour rMV-Sol-FalVAX après la première immunisation (Figure 26A). Le profil de réponse était orienté vers une polarisation Th1, avec la prédominance des IgG2a (Figure 26B), comme classiquement retrouvé pour le vecteur rougeole.

L'épreuve infectieuse a été réalisée par l'injection intradermique de 5 000 sporozoïtes de *Pb* exprimant la séquence répétée de la CS de *Pf*. Une réduction de la parasitémie a été observée, sans protection stérile (Figure 26C). Néanmoins, ce modèle d'épreuve infectieuse est imparfait car il mesure uniquement la réponse anticorps neutralisante dirigée contre la partie répétée de la CS, sans prendre en compte la réponse anticorps dirigée contre les parties N et C-terminales de la CS, ni

la réponse cellulaire. De plus, ce modèle ne prend pas en compte la réponse immunitaire contre la protéine RH5, non exprimée par *Pb*.

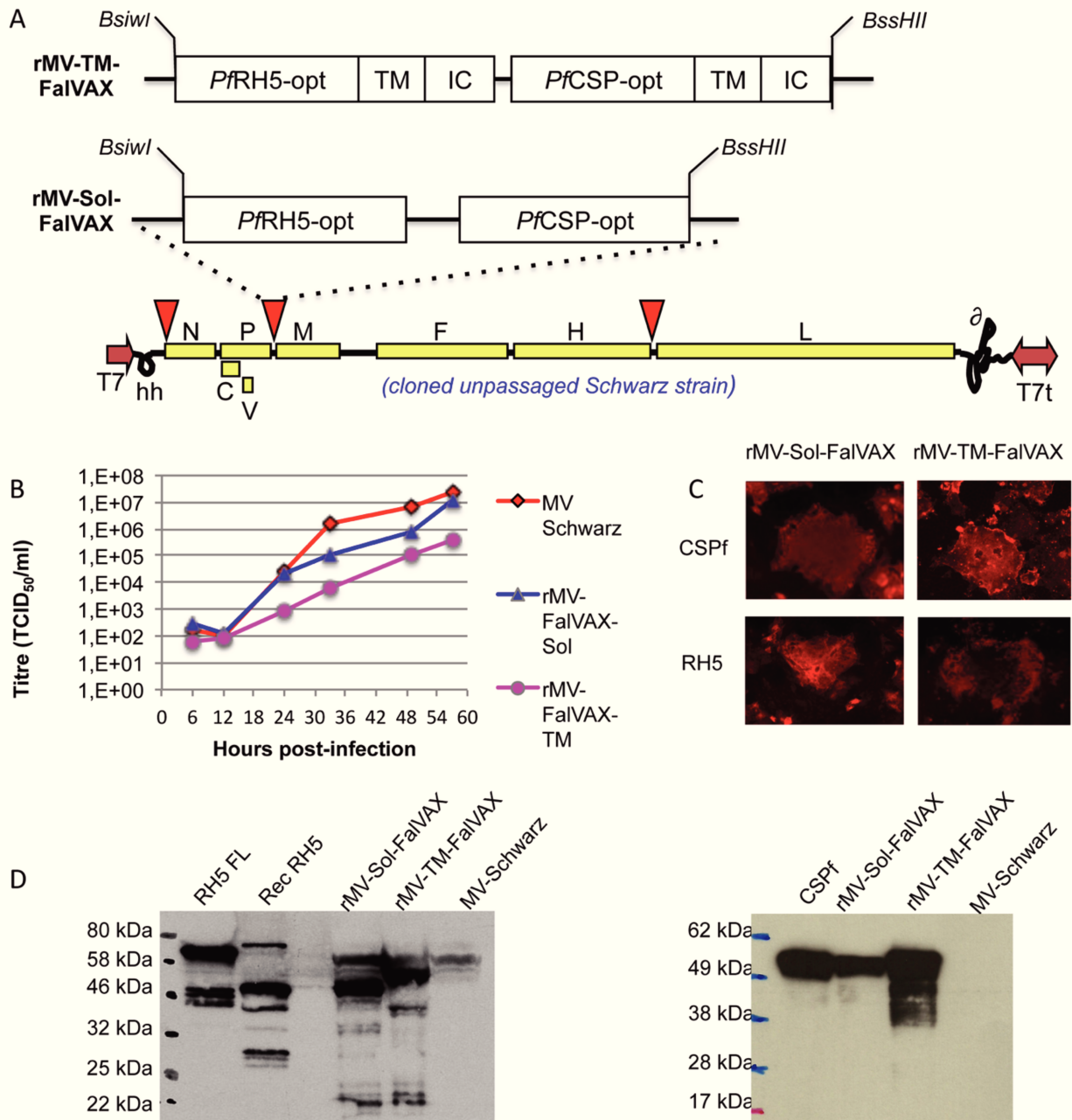


Figure 25 : Constructions des virus rougeole recombinants exprimant les protéines RH5 et CS de *Plasmodium falciparum*. (A) Schéma représentant les génomes des virus rMV-TM-FalVAX et rMV-Sol-FalVAX. (B) courbes de croissances virales. (C) Immunofluorescence des protéines CS et RH5 montrant la présence des protéines au sein des syncytia infectés. (D) Western Blot révélant la présence des protéines RH5 et CS dans le lysat cellulaire.

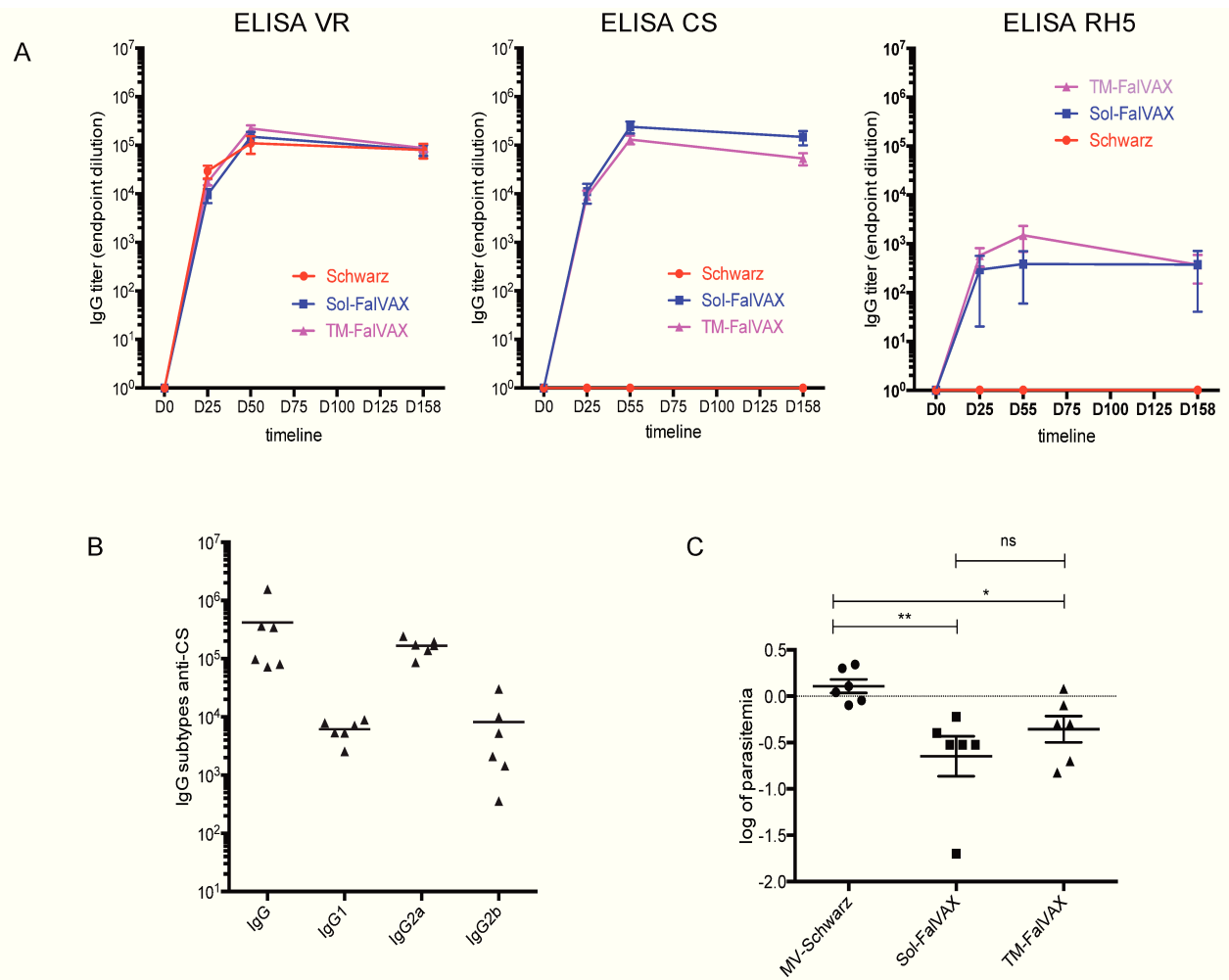


Figure 26 : Immunogénicité et protection contre l'épreuve infectieuse des vaccins rMV-Sol-FalVAX et rMV-TM-FalVAX. (A) Titres d'anticorps anti-VR, anti-CS et anti-RH5 après deux immunisations aux jours 0 (D0) et 28 (D28). (B) Sous classes d'IgG anti-CS du vaccin rMV-Sol-FalVAX montrant la prédominance des IgG2a (résultats identiques pour rMV-TM-FalVAX). (C) Parasitémie sanguine 5 jours après épreuve infectieuse par 5 000 sporozoïtes injectés par voie intradermique. Test non paramétrique de Mann-Whitney, \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ .

Afin de s'assurer que la faible immunogénicité de la protéine RH5 n'était pas due à l'immunodominance de la protéine CS très immunogène, un vecteur VacR exprimant la protéine RH5 seule sous forme transmembranaire a été produit et caractérisé. Le groupe contrôle positif a été immunisé avec la protéine RH5 entière (et non tronquée) administrée avec un adjuvant agoniste de TLR4 (GLA-SE). L'immunogénicité est restée là encore faible (Figure 27), en comparaison à l'immunogénicité induite dans le groupe contrôle positif. Aucune activité d'inhibition de la croissance parasitaire *in vitro* n'a pu être observée.

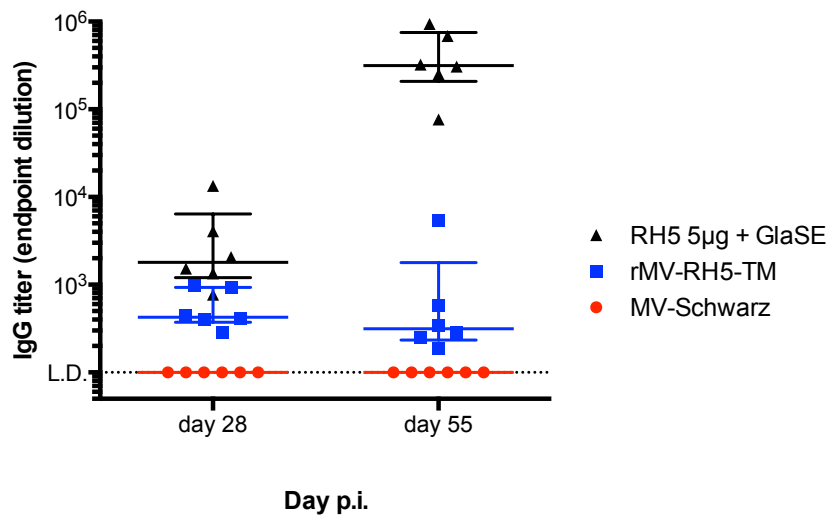


Figure 27 : Titres d'anticorps anti-RH5 du virus rMV-RH5 chez la souris IFNARhCD46tg immunisée par RH5 + GLA-SE (noir), rMV-RH5 (bleu), MV-Schwarz (rouge). L.D. limite de détection.

Ainsi, l'ajout d'un second antigène n'a pas perturbé la réponse immunitaire à l'antigène CS. Cependant, le choix de la protéine RH5 sous sa forme tronquée est discutable et nous reviendrons sur ce sujet dans la discussion.

### 3. Développement d'une stratégie vaccinale basée sur l'effet adjuvant des génomes défectifs produits par le vecteur rougeole

Malgré l'absence de modèle murin répondant totalement à notre cahier des charges pour tester l'hypothèse d'un effet adjuvant des DI-RNAs, nous avons tout de même souhaité tester cette hypothèse sur modèle C57BL/6, dont la voie IFN-I est fonctionnelle. En effet, une réplication locale ne peut être éliminée et suffirait à montrer un effet adjuvant.

Nous avons immunisé trois groupes de 6 souris en injectant la protéine CS seule (5µg), la protéine CS (5µg) en présence d'hydroxyde d'aluminium (alum), adjuvant classique, ou la protéine CS (5µg) co-administrée avec 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> du virus rMV-CHIKV, candidat vaccinal anti-chikungunya vectorisé par la rougeole (7). La présence du virus vivant atténué a permis d'induire une réponse anticorps au même niveau que la réponse observée avec l'alum et bien plus forte qu'avec la protéine seule (Figure 28). Ce résultat n'a pas pu être reproduit avec la protéine Ovalbumine, qui est une protéine « standard » mais qui ne présente pas elle-même de PAMPs. Par contre, un résultat identique a pu être récemment observé avec une protéine de

surface d'un coronavirus (protéine S du porcine epidemic diarrhea virus, PEDV). Ces résultats doivent bien sûr être confirmés sur un modèle PNH répondant au cahier des charges pour tester plus spécifiquement le rôle d'adjuvant dans un modèle réplicatif, et en comparant différentes quantité de DI-RNAs dans les compositions vaccinales utilisées. Nous montrons néanmoins qu'un virus vivant atténué est capable *in vivo* d'augmenter la réponse anticorps à un antigène issu d'un pathogène, et qu'il joue ainsi le rôle d'adjuvant. Cette découverte est protégée par un brevet international publié le 28/12/2017 sous le numéro WO2017221076.

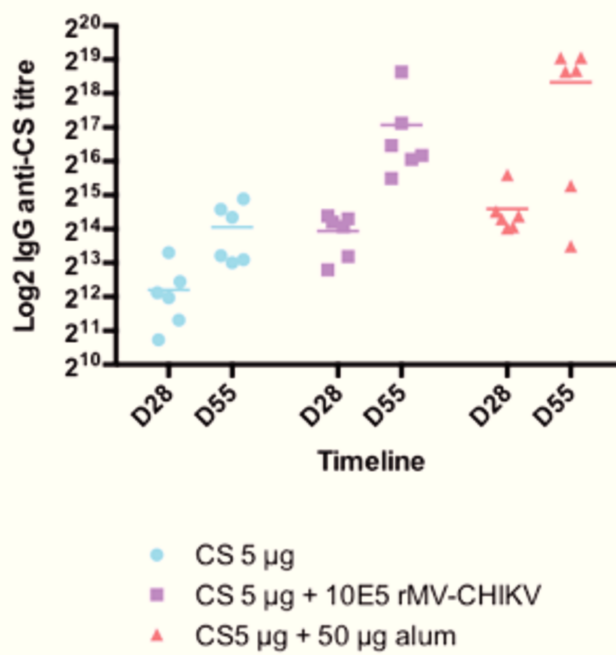


Figure 28: Titres d'anticorps anti-CS après deux immunisations séparées d'un intervalle de 4 semaines. Chaque point représente les résultats obtenus pour une souris (3 groupes de 6 souris C57BL/6) et la barre représente la moyenne.

Nous proposons alors une stratégie (Figure 29) pour délivrer de multiples antigènes du paludisme dans le cadre d'une composition vaccinale multi-stade multi-antigénique. Les antigènes majeurs seraient exprimés dans le vecteur rougeole, puis en cas de dépassement des capacités d'intégration du vecteur (6 kilobases), des protéines recombinantes pourraient être ajoutées dans la composition vaccinale et bénéficieraient d'un effet adjuvant du VacR recombinant. L'ATU 2 serait utilisé en priorité pour des antigènes du stade érythrocytaire afin de produire une charge

antigénique élevée, et induire des hauts titres d'anticorps. L'ATU 3 permettrait de délivrer la CS et une protéine fusion d'épitopes T du stade pré-érythrocytaire. A cette composition vaccinale comportant des DI-RNAs acquis au cours du processus d'amplification viral, seraient ajoutées des protéines recombinantes visant à cibler par exemple (i) des antigènes supplémentaires de chaque stade, (ii) des versions différentes de la même protéine pour prendre en compte la variabilité des souches circulantes, (iii) les antigènes déjà exprimés par le vecteur pour augmenter la charge antigénique lorsque cet antigène est faiblement immunogène. En fonction des zones géographiques et des données épidémiologiques, la composition finale pourrait être différente et réadaptable.

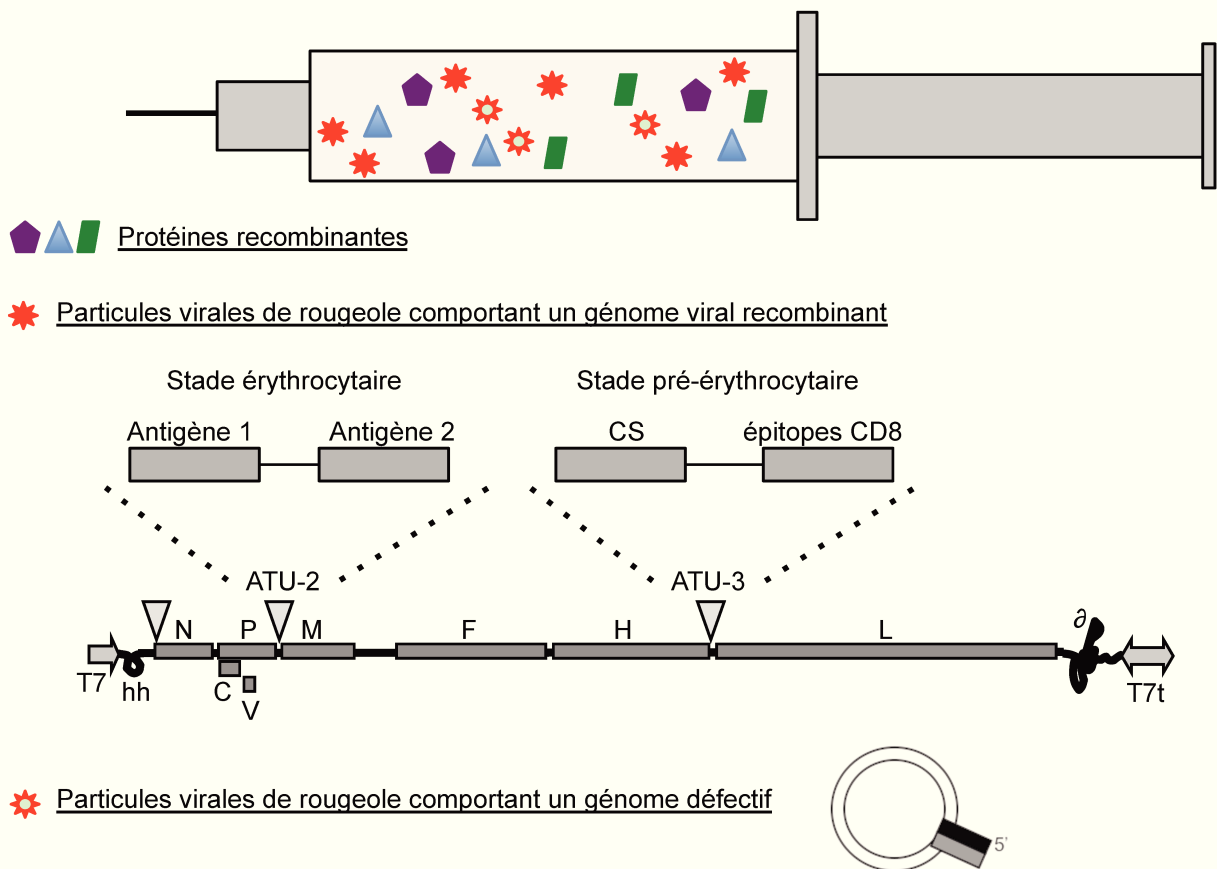


Figure 29: Schéma représentant la stratégie vaccinale pour développer un candidat vaccinal antipaludique multi-stade multi-antigénique délivré par le vecteur rougeole.



# DISCUSSION

# DISCUSSION

## A. Génomes défectifs interférents : biologie, fonction, évolution

Nous avons pour la première fois recherché et caractérisé de façon systématique les génomes défectifs produits par une plateforme vaccinale. Cette démarche vise à mieux comprendre les bases moléculaires de l'atténuation et de l'efficacité des vaccins vivants atténués, et permettra également de mieux standardiser et contrôler la production des lots vaccinaux. La majorité des virus produisent des DI-RNAs au cours de leur réplication. Les autres plateformes vaccinales virales (MVA, adénovirus, alphavirus) produisent certainement elles aussi des génomes défectifs dont le type et le rôle reste à caractériser.

Nous allons dans un premier temps discuter des différentes caractéristiques des 5'copy-back DI-RNAs que nous avons identifiés. Puis nous émettrons différentes hypothèses quant à la génération de ces DI-RNAs. Nous apporterons quelques éléments de réflexion relatifs à la balance bénéfique/risque de la présence de DI-RNAs dans les vaccins. Enfin, nous présenterons les hypothèses évolutives en discutant du rôle biologique des DI-RNAs au cours des infections virales.

### 1. Caractéristiques essentielles

Tout d'abord, il ressort de notre travail que tous les VacR recombinants testés produisent des DI-RNAs dont les séquences respectent la règle de six. Nous ne pouvons cependant affirmer que seuls des DI-RNAs multiples de six soient générés. En effet, il se peut qu'une encapsidation efficiente génère un avantage évolutif aux DI-RNAs respectant cette règle, alors que d'autres ne la respectant pas seraient produits mais non conservés au cours de l'amplification virale.

Ensuite, ce travail démontre clairement la variabilité de taille (de 402 à 2094 nt) et de séquence des DI-RNAs. La plus petite taille de la tige d'ARN double-brin retrouvée (93 nt) comporte l'ensemble des éléments relatifs à la réplication et l'encapsidation, nécessaires au maintien et la transmission du DI-RNAs. Les différentes tailles de la boucle et de la tige n'ont cependant pas d'impact sur les capacités immunostimulatrices des DI-RNAs, celles-ci apparaissant comme dépendantes de la structure et de l'extrémité 5'-triphosphate. Aucun élément informatif n'a pu être retrouvé sur les zones de décrochage et de réinitiation de la

polymérase (structure secondaire hypothétique, conservation de séquence, position au sein de l'hélice de nucléoprotéine, pourcentage en GC). Ainsi, bien que des DI-RNAs de taille et séquence identiques aient pu être identifiés, nous n'avons pas trouvé d'élément probant expliquant ou permettant de prédire les sites de décrochage de la polymérase.

La quantité de DI-RNAs produits était variable d'un virus recombinant à l'autre. Les virus recombinants produisant le plus de DI-RNAs étaient d'une part le virus déficient en protéine C et d'autre part le virus comportant deux copies du gène de la nucléoprotéine. Dans le premier cas, la protéine C est connue pour stabiliser le complexe polymérase. Son absence perturbe donc logiquement la transcription et la réplication (40). Dans le second cas, nous pouvons émettre l'hypothèse que la présence d'une forte quantité de nucléoprotéines permette une encapsidation massive d'ARN viral, dont les DI-RNAs.

Nous avons clairement établi le rôle immunostimulateur des DI-RNAs identifiés en démontrant que la stimulation de l'IFN-I était d'autant plus précoce que la composition virale était riche en DI-RNAs. De plus, nous avons montré la liaison spécifique des DI-RNAs aux récepteurs RIG-I et LGP2. Si l'implication de RIG-I dans la reconnaissance des DI-RNAs était déjà connue (115, 116), nous avons identifié pour la première fois l'interaction spécifique avec LGP2. Le rôle de LGP2 reste controversé mais ce récepteur agirait principalement comme activateur de MDA5 (120, 276) et répresseur de RIG-I (119). Les deux rôles pourraient être ici impliqués.

Enfin, un élément essentiel de notre travail a été de montrer la perte des capacités immunostimulatrices des DI-RNAs en présence de la nucléoprotéine et de la phosphoprotéine, nécessaires à l'encapsidation virale. Ces résultats ouvrent sur une question plus générale de virologie quant au rôle protecteur de la capsid virale pour cacher l'ARN viral à la cellule hôte. En effet, les récepteurs de l'immunité innée sont des sentinelles très efficaces pour détecter l'ARN étranger qui se retrouverait nu dans le cytoplasme.

## 2. Hypothèses pour la génération des 5' copy-back DI-RNAs

L'absence d'élément causal pourrait être en faveur de l'hypothèse d'une génération au hasard des DI-RNAs. Néanmoins, nous pouvons simplement affirmer que la polymérase se détache et se rattache pour des raisons non identifiées.

Nous proposons plusieurs hypothèses de génération des 5' copyback DI-RNAs (Figure 30). Dans un premier modèle intramoléculaire, nous suggérons que le brin naissant sert de matrice une fois que la polymérase s'est détachée de l'antigénome, soit par un « saut » comme classiquement décrit dans la littérature (Figure 30A), ou plus probablement par proximité spatiale avec l'extrémité 5' au cours du processus de réplication (Figure 30B). Dans un deuxième modèle intermoléculaire, nous suggérons que c'est un autre brin naissant qui sert de matrice à la polymérase, du fait d'une proximité spatiale (Figure 30C). Il reste à déterminer si un facteur cellulaire est impliqué dans le processus de génération des génomes défectifs ou s'il s'agit d'un phénomène purement viral. Le fait que des modifications des protéines virales influent la quantité de DI-RNAs produits semble pencher en faveur d'un phénomène purement viral. A l'inverse, l'absence de génération de DI-RNAs dans certains types cellulaires (166, 167) pencherait en faveur de l'implication d'un facteur cellulaire.

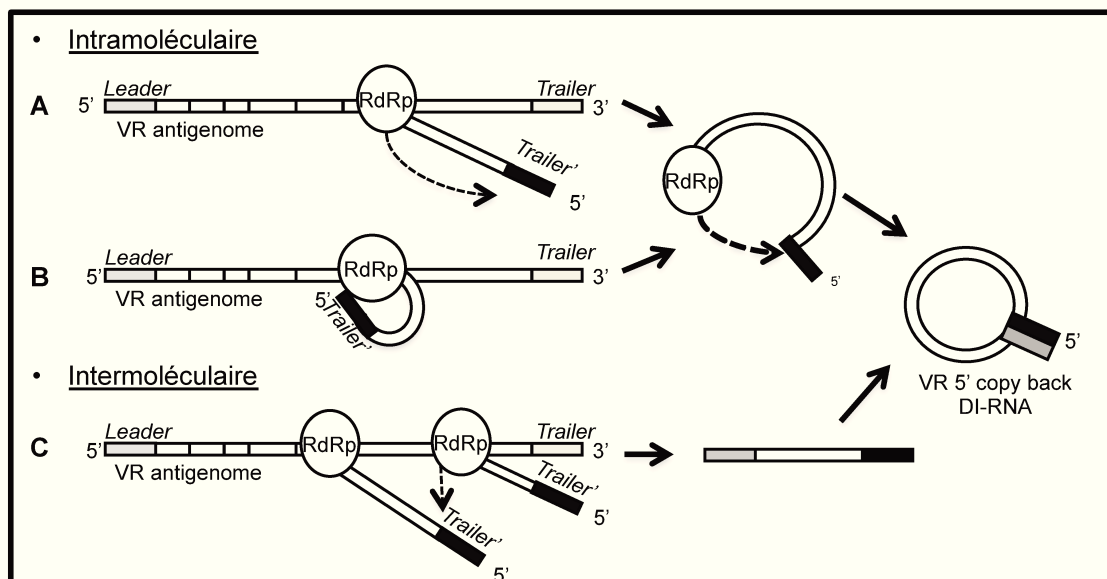


Figure 30 : Hypothèses de génération des DI-RNAs par la polymérase virale (RdRp) (277).

### 3. Fonctions immunostimulatrices : balance bénéfique/risque

La stimulation de l'IFN-I par les DI-RNAs semble aujourd'hui être un élément clé pour la résolution des infections virales pulmonaires chez l'homme. Une première étude portant sur le virus respiratoire syncytial (RSV) a montré une corrélation directe entre l'accumulation de DI-RNAs dans les tissus pulmonaires et la qualité de

la réponse antivirale (147). Une deuxième étude portant sur le virus grippal a montré une association directe entre une faible accumulation de DI-RNAs et une évolution sévère voire fatale de l'infection (148). Les DI-RNAs semblent donc apporter un élément bénéfique à l'hôte pour la stimulation efficace de la réponse immune, *via* l'IFN-I. Néanmoins, il faut garder à l'esprit que l'excès d'IFN-I est également associé aux infections chroniques persistantes (87). Il reste à définir un seuil quantitatif où se jouerait la bascule entre bénéfice et risque.

La présence de DI-RNAs a été identifiée au sein de stocks vaccinaux de virus vivants atténués : vaccin grippal Fluenz<sup>TM</sup> tetra (278), souche Hu-191 de vaccin rougeole (175). La présence de DI-RNAs dans des stocks vaccinaux utilisés, sans effets secondaires chez les sujets vaccinés, est un argument positif dans la balance bénéfice/risque. Cependant, une efficacité moindre de lots vaccinaux antigrippaux a déjà été observée. Il se pourrait qu'un trop grand nombre de DI-RNAs soit un frein à une réponse vaccinale optimale par interférence massive avec la réplication du virus vaccinal (278). Des études complémentaires manquent pour valider cette hypothèse. Le taux de DI-RNAs dans les stocks viraux de VacR pourrait-il avoir ainsi un impact négatif sur l'efficacité vaccinale chez l'homme ? Concernant les candidats vaccinaux recombinants testés au sein de la plateforme vaccinale rougeole, nous avons quantifié 3-4 log<sub>10</sub> de moins de DI-RNAs que de génome complet (Article I, Figure 4). Cette quantité semble dérisoire pour induire une interférence avec le virus répliquatif chez l'homme, mais est potentiellement suffisante pour induire un effet adjuvant. Néanmoins là aussi, des études complémentaires sont nécessaires pour définir un seuil, hypothétique, entre l'effet adjuvant et le risque d'interférence avec la réplication du virus vaccinal qui pourrait diminuer l'efficacité vaccinale.

Par ailleurs, les DI-RNAs ont été suspectés d'être associés à la persistance virale chez les mammifères et les insectes (279). En culture cellulaire, la persistance virale du virus RSV (280), du VR (281) et du virus Ebola (282, 283) est favorisée par la présence de DI-RNAs. Une étude réalisée chez l'homme en 1994 (284) a montré la présence de DI-RNAs dans des cerveaux d'enfants et de jeunes adultes décédés de panencéphalite sclérosante subaiguë (PESS). Cependant, le VacR produit lui aussi des DI-RNAs et aucun cas de PESS post-vaccination n'a pu être observé à ce jour alors que des milliards d'enfants ont été vaccinés dans le monde.

#### 4. Hypothèses évolutives et rôle biologique

Le rôle biologique des DI-RNAs n'est pas clair. Le fait que les DI-RNAs soient reconnus par le système immunitaire ne semble pas en faire un élément évolutif favorable au virus, et suggère un rôle de la cellule dans la génération des DI-RNAs. Néanmoins, la persistance chez l'hôte pourrait être envisagée comme un facteur négatif pour la survie des virus. Dans ce cas, la survenue des DI-RNAs au pic de réplication virale (147) serait un moyen pour le virus d'induire une réponse de l'hôte nécessaire à sa survie en permettant sa transmission à un autre hôte (150). Cette hypothèse apporterait un bénéfice évolutif dans le cas où la mort de l'hôte serait un obstacle à la transmission du virus.

La participation des DI-RNAs à la diversité des populations virales a été suggérée (279). La notion de quasi-espèces virales traduit l'existence d'une population virale hétérogène constituée par des séquences génomiques faiblement divergentes, reliées phylogénétiquement à un ascendant commun. Les ARN polymérases virales ARN dépendantes ne sont pas des enzymes très fidèles par l'absence d'activité de correction dite « *proof reading* ». Elles présentent ainsi un taux de mutation élevé favorisant une grande variabilité génomique et la génération de quasi-espèces virales. La comparaison des séquences ARN présentes dans la composition vaccinale du virus de la fièvre jaune 17D et de sa souche parentale non atténuée Asibi a par exemple permis de mettre en évidence une moindre variabilité de la souche vaccinale, pouvant être impliqué dans l'atténuation (285). Concernant le VR, le taux de mutation a été évalué à  $9.10^{-5}$  nucléotide par cycle répliatif, soit 1,43 mutations par cycle (286). Cependant, les observations faites à partir d'isolats cliniques montrent très peu de divergence nucléotidique, suggérant des conditions de pression sur les populations virales (287). Il n'est pas évident que les génomes défectifs participent à la diversité des populations circulantes, du fait justement de leur caractère défectif. Chez les coronavirus, des recombinaisons entre ARN génomique et DI-RNA ont été observées, participant à l'émergence de nouveaux pathogènes au sein de cette famille (288). A l'inverse, le VR est très stable et là encore, les 5' *copyback* DI-RNAs ne semblent pas présenter ce type de rôle.

Bien qu'observés depuis longtemps *in vitro*, la mise en évidence des DI-RNAs *in vivo* chez l'homme est relativement récente. Leur recherche se systématise grâce

aux outils de séquençage de nouvelle génération. Si quelques outils étaient déjà disponibles pour détecter les DI-RNAs présentant des délétions, aucun ne permettait à ce jour d'identifier les *copy-back* et *snap-back* DI-RNAs. L'outil gratuit en ligne, DI-tector, mis au point par Guillaume Beauclair dans notre unité, vise à aider les scientifiques à rechercher et caractériser de façon systématique la présence de DI-RNAs dans les échantillons infectieux et/ou vaccinaux. L'augmentation et la systématisation des données disponibles concernant les DI-RNAs nous permettront de mieux comprendre leurs caractéristiques, leurs fonctions, et leur rôle évolutif.

## B. Interféron de type I et restriction d'hôte

Notre travail de comparaison de modèles murins pour étudier le rôle immunostimulateur des DI-RNAs *in vivo* nous a conduit à redéfinir la notion de barrière d'espèce du VacR telle qu'elle était auparavant admise. Nous discuterons successivement du rôle de l'IFN-I dans la barrière d'espèce des virus, puis plus spécifiquement pour les VR/VacR, et de l'intérêt du modèle murin IFNAR en virologie.

### 1. Rôle des IFNs dans la barrière d'espèce des virus

Les virus sont des pathogènes intracellulaires stricts. Ils doivent donc établir de nombreuses interactions avec les protéines de l'hôte pour l'entrée et le transport au sein de la cellule, la transcription/réplication, la traduction des protéines, l'export à la membrane et la sortie de la cellule. De nombreux facteurs de l'hôte sont susceptibles de restreindre l'infection en bloquant une ou plusieurs étapes du cycle viral, et participent ainsi à la barrière d'espèce définissant un spectre d'hôte. Les facteurs de restriction jouent un rôle majeur par leur activité de suppression de la réplication virale. Au cours de leur coévolution avec l'hôte, les virus ont évidemment développé des stratégies de contournement de ces barrières et des protéines antagonistes capables d'interférer avec ces facteurs. Les facteurs de restriction appartiennent à la réponse immunitaire innée intrinsèque des cellules permettant de détecter puis de répondre à une infection virale en l'absence d'exposition préalable. Ils ont été définis (109) par leur activité antivirale comme fonction biologique principale, l'induction de leur expression par la reconnaissance du virus ou par les IFNs, l'antagonisation par

des protéines virales, et une signature génétique de conflit évolutif (sélection positive).

Les quasi-espèces virales sont un moyen évident des virus pour générer la diversité leur permettant d'échapper à la pression de sélection de l'hôte. Cependant, si les mutations ponctuelles étaient le seul mécanisme effecteur dans la coévolution hôte-virus, les virus auraient un avantage évolutif conséquent sur leurs hôtes. Tout d'abord, il existe des limitations à l'évolution virale qui sont liées aux contraintes virales elles-mêmes (encapsidation, emballage). Nous avons vu pour le VR que la stabilité du génome est étonnamment grande en comparaison du potentiel d'erreurs générées par la polymérase virale. Ensuite, le polymorphisme génétique et l'hétérozygotie des gènes codant pour des facteurs de restriction chez l'homme sont un avantage important à l'échelle de la population. De plus, la duplication de gènes est une stratégie évolutive classique des gènes de restriction pour accélérer l'adaptation de l'hôte à un virus. A titre d'exemple, les facteurs Mx1 (289) et IFITM (290) sont deux ISGs dont plusieurs paralogues existent chez la souris. Enfin, la voie IFN-I induit l'expression de plusieurs centaines de gènes pour établir un état antiviral cellulaire, dont les fonctions d'une grande partie d'entre eux restent encore à découvrir.

Un exemple de facteur de restriction bien connu et impliqué dans la barrière d'espèce des poxvirus est la protéine kinase PKR, un inhibiteur de la traduction protéique médié par la phosphorylation du facteur d'initiation eIF2 $\alpha$  : la protéine virale K3L du virus de la vaccine est capable d'inhiber PKR avec des différences majeurs selon l'hôte, présentant ainsi un spectre d'action spécifique d'espèce (291).

## 2. Rôle des IFNs dans la barrière d'espèce des virus rougeole

Nous avons vu dans l'introduction que la barrière d'espèce des *Morbillivirus* reposait à la fois sur le tropisme cellulaire CD150 et sur la réponse IFN-I. Chaque *Morbillivirus* a ainsi un spectre d'hôte restreint. Le *Canine Distemper Virus*, dont l'hôte principal est le chien, semble posséder le spectre d'hôte le plus large en étant capable d'infecter différentes espèces issues de plusieurs ordres de mammifères (carnivores, rongeurs, primates, artiodactyles, proboscidiens) (292). Cependant, l'arbre phylogénétique de CD150 montre chez ces espèces une grande similarité de séquence (293). Le spectre d'hôte du VR inclut l'homme et les PNH, deux espèces



phylogéniquement proches, aussi bien pour les gènes CD150 (293) que des IFNs (294). Sur modèle murin, à la fois l'expression du récepteur hCD150 et l'absence de voie IFN-I fonctionnelle (IFNAR KO ou STAT1 KO) sont indispensables pour reproduire une infection systémique par le VR. Dans le modèle murin IFNAR/hSLAM, la réplication systémique du VR a été observée dans les différents organes lymphoïdes, hormis le thymus (105). Dans le modèle murin STAT1/hSLAM, des résultats similaires ont pu être observés, avec cette fois la détection de virus dans le thymus également (106). La présence d'un seul de ces éléments (récepteur hCD150 ou KO de la voie IFN-I) ne suffisait pas pour permettre la réplication systémique du VR (105, 106). Nous n'avons pas non plus observé de réplication virale dans les rates des souris IFNAR infectées avec le VR. Le récepteur CD150/SLAM et l'IFN-I jouent donc un rôle primordial et complémentaire dans la barrière d'espèce du VR. Qu'en est-il des souches vaccinales ?

Nous avons vu dans l'introduction que les souches VacR avaient modifié leur tropisme cellulaire après de multiples passages en culture cellulaire, l'élargissant au-delà du récepteur CD150, au récepteur humain ubiquitaire CD46. Les récepteurs humains et murins CD46 divergent notablement et les modèles transgéniques IFNARhCD46tg sont utilisés comme modèles d'étude du VacR (68, 104). Notre étude a permis de démontrer que le VacR se réplique de façon systémique dans des souris IFNAR en absence du récepteur hCD46, ni d'aucun autre récepteur décrit du VR (hCD150, hNectin4). La propagation du VacR dans l'organisme peut donc se faire *in vivo* de façon complètement indépendante de la présence des récepteurs connus, soit par l'utilisation d'un récepteur ubiquitaire jusqu'ici non décrit *in vitro*, soit par un phénomène d'entrée indépendant d'un récepteur (endocytose, macropinocytose,...). Ainsi, l'IFN-I est la seule barrière d'espèce du VacR *in vivo* chez la souris. Il reste à définir les mécanismes moléculaires sous-jacents impliqués. Nous avons vu dans l'introduction les stratégies déployées par le VR pour échapper au système immunitaire humain grâce aux protéines V, P et C. Ces antagonistes viraux sont certainement inefficaces chez la souris et ne permettent pas de lever la pression déployée par la réponse de l'hôte. Chez l'homme, les rares cas de mutation du récepteur IFNAR2 (295) ou de STAT2 (296) ont développés des formes cliniques sévères dans les suites d'une vaccination par le vaccin rougeole-oreillon-rubéole. Ces observations soulignent l'importance de la réponse IFN dans l'atténuation des souches vaccinales et suggèrent l'existence d'une redondance de la réponse

antivirale puisqu'aucune vulnérabilité à l'infection virale n'avait été détectée auparavant chez ces enfants.

Il existe des différences majeures entre les observations faites *in vitro*, fatalement restreintes aux conditions testées, et *in vivo*, résultant d'une multitude de possibilités et de voies engagées. Le tropisme cellulaire du VacR s'est vraisemblablement bien plus modifié qu'il n'y paraît *in vitro*. La notion de récepteur du VacR est à remplacer par la notion plus large de réceptome, définissant l'ensemble des différentes cellules de l'organisme sensibles au virus et constituant un des sous-ensembles moléculaires définissant le tropisme (297). Si le lymphotropisme cellulaire du VR est connu de longue date avec la description de cellules géantes dans les organes lymphoïdes (298), le VacRc, *in vivo*, est lui aussi lymphotropique. Après injection intramusculaire chez le PNH, le VacR n'est pas détecté dans les cellules musculaires adjacentes exprimant le récepteur CD46, mais bien dans les cellules dendritiques et les macrophages exprimant le récepteur CD150/SLAM (71, 299). De même, une étude de biodistribution du VacR après injection intramusculaire chez le PNH a montré une distribution exclusivement limitée aux organes lymphoïdes (300). Le récepteur hCD46 joue un rôle indéniable *in vitro*, mais son rôle *in vivo* est plus que discutable. Nous montrons dans ce travail que d'autres modes de propagation du virus *in vivo* sont possibles, une fois la barrière de l'IFN-I levée.

### 3. Intérêt du modèle murin IFNAR

L'élevage des souris IFNARhCD46tg impose des contraintes liées au maintien du statut hétérozygote du transgène hCD46 pour éviter l'obésité et l'agressivité des mâles. Nos résultats montrent en plus de la réplication systémique observée dans le modèle IFNAR que l'immunogénicité (réponse humorale et cellulaire) est identique à celle obtenue dans le modèle IFNARhCD46tg. Contrairement à l'étude de Marty *et al* (107) encourageant l'utilisation du modèle hCD46tg pour caractériser le profil de réponse immunologique des candidats vaccins rougeole recombinants, nous affirmons que le profil de réponse au VacR chez les souris IFNAR est plus proche de la réponse immunitaire développée chez l'homme. La simplification du modèle d'étude murin par l'utilisation d'un modèle IFNAR permettra de lever les contraintes d'élevage en évitant le sacrifice de nombreuses souris, en accord avec les règles d'éthique de simplification.

Le modèle murin IFNAR s'installe par ailleurs comme un modèle de référence en virologie pour l'étude des virus humains émergents. Ce modèle a permis ainsi de cribler la virulence d'arénavirus de l'ancien monde puisque celle-ci corrèle avec la virulence chez l'homme et le PNH (301). Ce modèle est également utile à l'étude des arbovirus émergents. Il a par exemple permis de développer rapidement des études de physiopathogénèse du virus Zika puis de tester des candidats vaccinaux (302, 303).

## C. Stratégie vaccinale antipaludique utilisant le vecteur rougeole

### 1. Place de la stratégie vaccinale sous-unitaire

Les sporozoïtes irradiés représentent actuellement le vaccin antipaludique de référence grâce à l'induction d'une protection stérile avec plus de 98% d'efficacité (261). Néanmoins, malgré d'importantes améliorations, il reste de nombreux obstacles logistiques et techniques pour implémenter ce candidat vaccin sur le terrain avec une production de masse. Du fait de ces contraintes majeures, un vaccin sous-unitaire reste préférable à un vaccin entier atténué. Le vaccin recombinant RTS,S/AS01 a montré lors d'essais cliniques de phase III son efficacité pendant plusieurs mois mais a malheureusement échoué à induire une protection à long terme contre des infections répétées (253, 304). Le parasite est habile à contourner l'immunité de l'hôte en modulant les réponses immunes, et tout particulièrement en perturbant la fonctionnalité des cellules dendritiques (305) et en affectant la survie des cellules B mémoires (306). Ainsi, le pool de cellules mémoires doit être conséquent pour permettre une protection à des expositions répétées.

Plusieurs critères sont importants pour l'utilisation d'antigènes paludiques comme candidats vaccinaux à insérer dans un vaccin vectorisé par un virus : la conservation de la séquence protéique au sein des différentes souches de parasite, la taille de la séquence nucléotidique à insérer, et l'immunogénicité de la protéine. Néanmoins, ces trois aspects peuvent être discutés. En effet, (i) la conservation d'une séquence protéique prouve qu'elle joue un rôle essentiel au sein des espèces. L'induction d'une réponse immune contre cet antigène majeur serait donc un atout essentiel pour induire une protection croisée entre les différentes souches circulantes. Cependant, la conservation d'une séquence indique également que l'antigène est protégé de la pression du système immunitaire et n'induit pas naturellement de

réponse immune efficace. Il n'est donc pas acquis qu'une réponse induite par la vaccination puisse atteindre sa cible *in vivo*. (ii) La taille réduite de la séquence nucléotidique est un atout pour pouvoir insérer plusieurs antigènes dans un même vecteur. Néanmoins, les formes tronquées peuvent induire des modifications de structure qui risquent de perturber les épitopes conformationnels, ou être toxiques pour la cellule en formant des agrégats protéiques. (iii) les protéines présentant naturellement des PAMPs doivent favoriser l'induction d'une réponse immune. Cependant, nous avons vu qu'une protéine recombinante pouvait bénéficier de l'effet adjuvant du vaccin vivant atténué. Ainsi une protéine, même peu immunogène, peut en théorie bénéficier d'un effet adjuvant du vecteur rougeole.

L'utilisation du vecteur rougeole vise en effet à faire bénéficier aux antigènes paludique des avantages indiscutables au plan de la fabrication industrielle et de la réglementation d'un vaccin vivant déjà largement utilisé chez l'homme, mais aussi des critères d'efficacité majeurs du vaccin rougeole : une protection de longue durée avec l'induction d'anticorps au long cours et d'une réponse cellulaire se développant rapidement après une seule injection. Ces deux critères ont pu être démontrés sur modèle murin avec les candidats vaccinaux exprimant la protéine CS seule ou les protéines CS et RH5. Néanmoins, la protéine CS seule n'est pas suffisante pour induire une protection stérile de 100% sur notre modèle murin. Et la réponse humorale à la protéine RH5 sous sa forme tronquée est restée très faible.

## 2. Pertinence des antigènes choisis et découverte de nouveaux antigènes candidats

Les deux antigènes choisis (CS et RH5) ont pu être insérés dans le vecteur rougeole et ont été efficacement produits après optimisation de leur séquence nucléotidique pour mammifères. La séquence native nucléotidique d'un pathogène est connue pour avoir un impact sur la réponse du système immunitaire (307). Malheureusement, il n'a pas été possible de produire un virus exprimant les séquences natives de CS et RH5, probablement du fait de la richesse en A/T de ces séquences qui est un obstacle au fonctionnement optimal de la polymérase virale du VR.

Au stade pré-érythrocytaire, il est évident que la CS doit faire partie de la composition vaccinale, mais qu'elle ne suffit pas à elle seule à induire une protection

stérile de 100% des individus. Une des difficultés de l'utilisation de cet antigène est le choix de la longueur de la séquence répétée. En effet, les séquences répétées offrent une variabilité antigénique au parasite, qui est un moyen d'échapper au système immunitaire lorsque le nombre de répétition change et influe la conformation protéique. Il serait intéressant de produire plusieurs constructions vaccinales avec des variabilités de séquence pour couvrir un champ plus large de reconnaissance. Nous avons choisi par défaut la séquence de la protéine CS de la souche 3D7, qui est une souche de laboratoire de référence mais qui ne reflète pas la variabilité des souches circulantes en zone d'endémie. De plus, le point faible de la protéine CS est l'induction d'une réponse cellulaire faible. Ainsi, notre projet se poursuit en collaboration avec l'équipe de Rogerio Amino (Unité « infection plasmodiale et immunité », Institut Pasteur) pour tester une protéine de fusion consistant en l'addition d'épitopes CD8 conservés de différentes protéines pré-érythrocytaires nouvellement identifiées par son équipe. L'ajout de cette protéine fusion à la CS permet d'obtenir une protection de près de 100% de souris C57BL/6 dans le modèle *Pb Anka* en utilisant un lentivecteur (R. Amino, données non publiées).

Au stade érythrocytaire, nous avons choisi la protéine RH5 pour sa séquence conservée, l'induction d'anticorps ayant une excellente activité d'inhibition de l'invasion des globules rouges *in vitro*, et la protection contre une souche hétérologue sur modèle NHP. Afin de réduire la séquence à insérer dans le vecteur rougeole, nous nous étions basés sur un article paru dans la revue Nature (274) démontrant qu'une forme tronquée de la protéine présentait une structure tridimensionnelle adéquate exposant les épitopes d'intérêt. Malheureusement, nos résultats ne montrent qu'une induction faible d'anticorps n'ayant pas d'activité d'inhibition de croissance *in vitro*. Cette faible immunogénicité a été confirmée avec un vecteur rougeole exprimant la protéine RH5 seule, et n'est donc pas le fait d'une immunodominance de la CS. L'expression initiale de la protéine sous sa forme complète et non tronquée aurait été plus judicieuse pour valider l'immunogénicité dans notre vecteur. En effet, RH5 semble naturellement peu immunogène. Lorsqu'elle est administrée avec un adjuvant de type GlA5E (groupe contrôle), trois injections sont nécessaires à induire un taux d'anticorps efficace. Au cours de l'essai clinique de phase I chez l'homme, des doses de  $10^8$  particules virales de vecteur MVA et  $10^{10}$  particules virales de vecteur adénoviral étaient nécessaires pour induire

une réponse anticorps modérée avec une activité d'inhibition de croissance *in vitro* de l'ordre de 40-50% seulement (273).

Ces résultats soulignent l'importance du travail en amont de découverte de nouveaux antigènes candidats pour améliorer l'efficacité des vaccins sous-unitaires, au-delà du choix du type de plateforme vaccinale. Il semble évident que le meilleur candidat vaccinal sous-unitaire sera une combinaison des meilleurs antigènes associés au vecteur le plus efficace chez l'homme.

### 3. Avantages et limites de l'utilisation du vecteur rougeole

Notre travail apporte une preuve de concept de l'utilisation du vecteur rougeole dans une stratégie de développement d'un vaccin antipaludique.

Tout d'abord, la stabilité des séquences insérées dans le vecteur a pu être démontrée après dix passages en culture cellulaire. Le VR est un virus à ARN de polarité négative très stable. Les séquences insérées ne présentaient aucune mutation à l'issue des dix passages sur cellules Véro à une MOI de 0.1. Le vecteur rougeole est capable d'insérer jusque 6 kb de séquences supplémentaires au sein des différents ATU. Ainsi, il est possible d'associer des séquences codant pour différents antigènes paludiques. Néanmoins, les capacités d'intégration ne sont pas illimitées. Nous proposons alors une stratégie complémentaire en démontrant qu'une protéine recombinante associée à la composition vaccinale du virus vivant atténué bénéficie d'un effet adjuvant, médié en partie par les DI-RNAs. La démonstration formelle nécessitera bien sûr une validation sur modèle PNH.

Ensuite, nous avons montré sur modèle murin hCD46IFNAR l'induction d'anticorps anti-CS à des titres élevés persistant jusqu'à au moins 22 semaines après la primo-immunisation. Cette persistance des anticorps est plus longue que celle observée après l'administration de trois doses de CS à 50 µg avec adjuvant complet de Freund sur des souris C57BL/6 (308), alors que le vecteur rougeole ne délivre que des ng d'antigène hétérologue (309). Sur modèle PNH, le vaccin RTS,S/AS01 montrait déjà une chute rapide des titres d'anticorps huit semaines après chaque rappel (310). La persistance des anticorps neutralisants dirigés contre l'antigène hétérologue vectorisé par le VacR a déjà été démontré pour un candidat vaccinal recombinant rougeole-HIV sur modèle murin (85) et PNH (84). Ainsi, les

résultats obtenus dans notre travail sont prometteurs pour l'induction d'une mémoire à long terme, élément crucial dans la conception d'un vaccin antipaludique.

La sous-classe d'IgG prédominante induite par le vecteur rougeole est l'IgG2a. Cette sous-classe, de type Th1 chez la souris, est cytophilique, avec la fixation du complément et l'opsonisation des pathogènes (311). L'induction d'anticorps cytophiliques anti-CS a été associée à la protection contre la réinfection dans une étude de terrain (312) et souligne ainsi la polarisation adaptée de la réponse immune après reconnaissance du vecteur rougeole.

Enfin, le vecteur rougeole est capable d'induire rapidement une réponse cellulaire T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Nous avons ainsi montré l'induction d'une réponse T modérée mais significative dès sept jours après une immunisation unique, avec la présence de cellules spécifiques CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> dirigées contre la CS. Aucun épitope T n'est décrit dans le modèle murin H-2<sup>b</sup>. Ainsi, nos résultats, bien que modérés, sont tout à fait encourageants. De plus, la protection antipaludique a été récemment corrélée à la réponse T CD8<sup>+</sup> anti-CSPf dans un modèle de souris humanisées (313).

Ainsi, le vecteur rougeole est prometteur pour les raisons mentionnées ci-dessus (stabilité, mémoire, titres élevés d'anticorps, polarisation Th1, réponse cellulaire CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>), auxquelles viennent s'ajouter la facilité de production à bas coût, une validation aisée du vecteur chez l'homme, et l'intégration facile au calendrier vaccinal.

# PERSPECTIVES



# PERSPECTIVES

## A. Virus vivants atténués et adjuvants naturels

### 1. Mieux maîtriser les compositions vaccinales

Les vaccins vivants atténués ont été obtenus de façon empirique, mais nous commençons seulement à comprendre les différents mécanismes moléculaires responsables de l'atténuation et de l'efficacité vaccinale. Dans ce travail, nous avons fait le choix de nous concentrer sur la caractérisation des DI-RNAs dans la suite logique des travaux réalisés au sein de l'unité de Génomique Virale et Vaccination de l'Institut Pasteur (74, 115) et de démontrer leur rôle dans la plateforme vaccinale mise au point par le laboratoire. Les données disponibles sur les DI-RNAs dans la littérature soulignaient le rôle potentiel d'adjuvant de ces molécules. Dans un contexte sociétal où la vaccination fait débat, il nous a semblé opportun d'étudier ce mécanisme intrinsèque des vaccins vivants atténués pouvant jouer le rôle d'adjuvant naturel. Nous confirmons ce rôle dans notre travail, mais également l'existence d'une grande diversité quantitative. Afin de mieux contrôler les quantités de DI-RNAs présents dans les compositions vaccinales des VacR recombinants, nous travaillons actuellement sur la mise au point d'un protocole d'homogénéisation des stocks vaccinaux. Ces données devraient apporter des éléments nouveaux pour un meilleur contrôle de l'efficacité vaccinale des lots vaccinaux.

### 2. Adjuvant : une nécessité vaccinale qui s'oppose à un rejet sociétal

De nouveaux vaccins sont nécessaires, non seulement pour lutter contre les infections pour lesquelles aucun vaccin efficace n'existe à ce jour (VIH, paludisme, dengue), mais aussi pour remplacer les vaccins actuels par des formulations mieux tolérées et plus efficaces (par exemple, remplacement du vaccin RotaShield® retiré du marché en 1999 du fait d'effets secondaires importants (314)). Pour atteindre un haut niveau d'efficacité vaccinale avec une excellente tolérance clinique, les nouveaux candidats vaccinaux requièrent la présence de puissants immunostimulateurs, les adjuvants. En effet, peu d'antigènes sont intrinsèquement

immunogéniques, et virtuellement tous les vaccins requièrent des adjuvants pour être efficaces, qu'ils soient endogènes ou exogènes.

Du fait de l'élimination de nombreuses maladies infectieuses dans les pays industrialisés grâce à la vaccination, le grand public a oublié l'impact de ces maladies sur la santé individuelle et la société. En retour, le discours public s'est modifié pour ne plus parler des effets bénéfiques des vaccins mais de leurs risques potentiels, en comparaison négligeables pourtant. Les attentes envers la sécurité et la tolérance des vaccins préventifs continuent de croître, et conduisent au développement de nouveaux adjuvants réduisant au maximum l'inflammation locale, sans pour autant éliminer l'activation de l'immunité innée : une véritable épreuve de force !

Notre travail a permis de mettre en avant le potentiel immunostimulateur des DI-RNAs *in vitro*, mais nous avons également montré *in vivo* que les vaccins recombinants dérivés du VacR étaient capables de jouer un rôle d'adjuvant en association à une protéine recombinante. Nous ne pouvons à ce stade affirmer que les molécules adjuvantes responsables de cet effet *in vivo* sont les DI-RNAs, du fait de l'absence de modèle murin présentant l'ensemble des caractéristiques nécessaires à l'étude de leurs effets (à savoir une voie IFN-I fonctionnelle et une réplication systémique du VacR). D'autant plus que le VacR stimule l'immunité par de nombreuses voies d'activation différentes après reconnaissance par plusieurs PRRs. De même, les signaux de dangers (DAMPs pour « damage associated molecular patterns ») jouent un rôle évident dans la stimulation de la réponse immunitaire. Il est toutefois évident que les virus vivants atténués produisent intrinsèquement des molécules puissamment immunostimulatrices, dont font partie les DI-RNAs, et nous montrons qu'une protéine recombinante peut bénéficier de cet effet. L'idée que nous développons à l'issue de ce travail n'est pas d'isoler les DI-RNAs pour en faire un adjuvant synthétique, mais bien de profiter d'un effet adjuvant naturel dont la sécurité et la tolérance clinique sont déjà démontrées. Dans le contexte sociétal actuel, nous pensons qu'un adjuvant naturel aurait un impact beaucoup plus positif sur l'acceptation publique qu'une nouvelle molécule chimique.

### 3. Usage vétérinaire potentiel de la plateforme vaccinale rougeole

Dans les modèles murins non KO pour le récepteur IFNAR, nous avons observé la présence d'une réponse immunitaire adaptative, principalement humorale. En

effet, les titres d'anticorps mesurés par ELISA atteignaient des niveaux élevés, identiques à ceux observés pour les souris IFNAR, après deux injections. Des résultats similaires étaient observés pour le candidat vaccinal rougeole-chikungunya. Les virus rougeole recombinants ne se répliquant pas de façon systémique dans ces modèles, la réponse observée n'est certainement que la conséquence d'une charge protéique bénéficiant d'un effet adjuvant du vecteur rougeole. Néanmoins, une faible réplication locale du virus ne peut être exclue, suffisante pour induire des niveaux de réponse adaptés. La réponse cellulaire observée dans ce modèle était presque nulle à des temps précoces, soit sept jours après une seule injection. Mais elle semblait se maturer avec le temps et une deuxième injection. Ainsi, nous suggérons que le vecteur rougeole puisse être utilisé pour le développement de vaccins à usage vétérinaire, comme une plateforme vaccinale virale non répliquative. Bien sûr, des études complémentaires avec un pathogène animal restent nécessaires pour apporter une preuve de concept.

## B. Perspectives vaccinales antipaludiques vectorisées par la rougeole

Le projet se poursuit actuellement au sein de l'unité de Génomique Virale et Vaccination par la construction de vecteurs rougeole exprimant la CS ainsi qu'une protéine de fusion contenant plusieurs épitopes T CD8<sup>+</sup> du sporozoïte (R. Amino, données personnelles) de *P. berghei*. La validation de ce candidat vaccinal du stade pré-érythrocytaire sur modèle murin classique ne sera néanmoins qu'une étape. En effet, les parasites *P. berghei* et *P. falciparum* présentent de nombreuses différences et les épitopes T CD8<sup>+</sup> reconnus chez la souris ou chez l'homme sont eux aussi très différents. Les modèles intermédiaires utiliseront préférentiellement des souris humanisées. En effet, le modèle PNH macaque nécessiterait une étape supplémentaire de construction de la protéine fusion avec des épitopes du parasite primate *P. Cynomolgus*. Enfin, la possibilité de tester rapidement chez l'homme les candidats vaccinaux antipaludiques avec épreuve infectieuse contrôlée est un atout considérable aujourd'hui pour une décision rapide de développement (stratégie du « Go / No go ») (315).

En parallèle, la construction d'un vecteur rougeole délivrant la protéine RH5 sous sa forme complète paraît essentielle. S'il semble logique d'induire plus facilement

une protection stérile au stade pré-érythrocytaire au vu du nombre plus restreint de parasites, il reste nécessaire d'induire des anticorps dirigés contre le stade sanguin. En effet, l'échappement de quelques parasites du foie vers le compartiment sanguin suffirait à déclencher un accès de paludisme. La présence d'anticorps du stade érythrocytaire permettrait de réduire cet impact. Enfin, la découverte de nouveaux antigènes d'intérêt pourrait ensuite compléter la formulation par l'ajout de protéines recombinantes à la composition vaccinale, en profitant de l'effet adjuvant naturel du VacR. Il pourrait être envisagé de produire différents virus exprimant des séquences répétées de la CS de taille différente, en gardant à l'esprit le risque de compétition dès lors que plusieurs virus vivants sont injectés simultanément.

# BIBLIOGRAPHIE

# BIBLIOGRAPHIE

1. **Plotkin S.** 2014. History of vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:12283-12287.
2. **O'Brien KL, Millar EV, Zell ER, Bronsdon M, Weatherholtz R, Reid R, Becenti J, Kvamme S, Whitney CG, Santosham M.** 2007. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal colonization among immunized and unimmunized children in a community-randomized trial. *J Infect Dis* **196**:1211-1220.
3. **Fleming-Dutra KE, Conklin L, Loo JD, Knoll MD, Park DE, Kirk J, Goldblatt D, Whitney CG, O'Brien KL.** 2014. Systematic review of the effect of pneumococcal conjugate vaccine dosing schedules on vaccine-type nasopharyngeal carriage. *Pediatr Infect Dis J* **33 Suppl 2**:S152-160.
4. **Liu MA, Ulmer JB.** 2005. Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. *Adv Genet* **55**:25-40.
5. **Bahl K, Senn JJ, Yuzhakov O, Bulychev A, Brito LA, Hassett KJ, Laska ME, Smith M, Almarsson O, Thompson J, Ribeiro AM, Watson M, Zaks T, Ciaramella G.** 2017. Preclinical and Clinical Demonstration of Immunogenicity by mRNA Vaccines against H10N8 and H7N9 Influenza Viruses. *Mol Ther* **25**:1316-1327.
6. **Guy B, Guirakhoo F, Barban V, Higgs S, Monath TP, Lang J.** 2010. Preclinical and clinical development of YFV 17D-based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses. *Vaccine* **28**:632-649.
7. **Brandler S, Ruffie C, Combredet C, Brault JB, Najburg V, Prevost MC, Habel A, Tauber E, Despres P, Tangy F.** 2013. A recombinant measles vaccine expressing chikungunya virus-like particles is strongly immunogenic and protects mice from lethal challenge with chikungunya virus. *Vaccine* **31**:3718-3725.
8. **Ramsauer K, Schwameis M, Firbas C, Mullner M, Putnak RJ, Thomas SJ, Despres P, Tauber E, Jilma B, Tangy F.** 2015. Immunogenicity, safety, and tolerability of a recombinant measles-virus-based chikungunya vaccine: a randomised, double-blind, placebo-controlled, active-comparator, first-in-man trial. *Lancet Infect Dis* **15**:519-527.
9. **Bergmann-Leitner ES, Leitner WW.** 2014. Adjuvants in the Driver's Seat: How Magnitude, Type, Fine Specificity and Longevity of Immune Responses Are Driven by Distinct Classes of Immune Potentiators. *Vaccines (Basel)* **2**:252-296.
10. **Wen Y, Shi Y.** 2016. Alum: an old dog with new tricks. *Emerg Microbes Infect* **5**:e25.
11. **Iwasaki A, Medzhitov R.** 2015. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol* **16**:343-353.

12. **Nambulli S, Sharp CR, Acciardo AS, Drexler JF, Duprex WP.** 2016. Mapping the evolutionary trajectories of morbilliviruses: what, where and whither. *Curr Opin Virol* **16**:95-105.
13. **Kolakofsky D, Pelet T, Garcin D, Hausmann S, Curran J, Roux L.** 1998. Paramyxovirus RNA synthesis and the requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited. *J Virol* **72**:891-899.
14. **Calain P, Roux L.** 1993. The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J Virol* **67**:4822-4830.
15. **Tapparel C, Maurice D, Roux L.** 1998. The activity of Sendai virus genomic and antigenomic promoters requires a second element past the leader template regions: a motif (GNNNNN)<sub>3</sub> is essential for replication. *J Virol* **72**:3117-3128.
16. **Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y.** 2000. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* **406**:893-897.
17. **Seki F, Ono N, Yamaguchi R, Yanagi Y.** 2003. Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in Vero cells expressing canine SLAM (CD150) and their adaptability to marmoset B95a cells. *J Virol* **77**:9943-9950.
18. **Baron MD.** 2005. Wild-type Rinderpest virus uses SLAM (CD150) as its receptor. *J Gen Virol* **86**:1753-1757.
19. **Nanda SK, Baron J, Royall E, Robinson L, Falciani F, Baron MD.** 2009. Infection of bovine dendritic cells by rinderpest or measles viruses induces different changes in host transcription. *Virology* **395**:223-231.
20. **Keeling MJ, Grenfell BT.** 1997. Disease extinction and community size: modeling the persistence of measles. *Science* **275**:65-67.
21. **Roeder PL.** 2011. Rinderpest: the end of cattle plague. *Prev Vet Med* **102**:98-106.
22. **Lund GA, Tyrrell DL, Bradley RD, Scraba DG.** 1984. The molecular length of measles virus RNA and the structural organization of measles nucleocapsids. *J Gen Virol* **65 ( Pt 9)**:1535-1542.
23. **Udem SA, Cook KA.** 1984. Isolation and characterization of measles virus intracellular nucleocapsid RNA. *J Virol* **49**:57-65.
24. **Parks CL, Lerch RA, Walpita P, Wang HP, Sidhu MS, Udem SA.** 2001. Analysis of the noncoding regions of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage. *J Virol* **75**:921-933.
25. **Rota PA, Brown K, Mankertz A, Santibanez S, Shulga S, Muller CP, Hubschen JM, Siqueira M, Beirnes J, Ahmed H, Triki H, Al-Busaidy S, Dosseh A, Byabamazima C, Smit S, Akoua-Koffi C, Bwogi J, Bukonya H, Wairagkar N, Ramamurty N, Incomserb P, Pattamadilok S, Jee Y, Lim W, Xu W, Komase K, Takeda M, Tran T, Castillo-Solorzano C, Chenoweth P, Brown D, Mulders MN,**

**Bellini WJ, Featherstone D.** 2011. Global distribution of measles genotypes and measles molecular epidemiology. *J Infect Dis* **204 Suppl 1**:S514-523.

26. **Beaty SM, Lee B.** 2016. Constraints on the Genetic and Antigenic Variability of Measles Virus. *Viruses* **8**:109.

27. **Muhlebach MD, Mateo M, Sinn PL, Prufer S, Uhlig KM, Leonard VH, Navaratnarajah CK, Frenzke M, Wong XX, Sawatsky B, Ramachandran S, McCray PB, Jr., Cichutek K, von Messling V, Lopez M, Cattaneo R.** 2011. Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature* **480**:530-533.

28. **Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, Rabourdin-Combe C, Gerlier D.** 1993. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* **67**:6025-6032.

29. **Dorig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD.** 1993. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* **75**:295-305.

30. **Bartz R, Brinckmann U, Dunster LM, Rima B, Ter Meulen V, Schneider-Schaulies J.** 1996. Mapping amino acids of the measles virus hemagglutinin responsible for receptor (CD46) downregulation. *Virology* **224**:334-337.

31. **Erlenhofer C, Duprex WP, Rima BK, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J.** 2002. Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus. *J Gen Virol* **83**:1431-1436.

32. **Liszewski MK, Post TW, Atkinson JP.** 1991. Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol* **9**:431-455.

33. **Cocks BG, Chang CC, Carballido JM, Yssel H, de Vries JE, Aversa G.** 1995. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* **376**:260-263.

34. **Ono N, Tatsuo H, Tanaka K, Minagawa H, Yanagi Y.** 2001. V domain of human SLAM (CDw150) is essential for its function as a measles virus receptor. *J Virol* **75**:1594-1600.

35. **Mendelsohn CL, Wimmer E, Racaniello VR.** 1989. Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* **56**:855-865.

36. **Rota PA, Moss WJ, Takeda M, de Swart RL, Thompson KM, Goodson JL.** 2016. Measles. *Nat Rev Dis Primers* **2**:16049.

37. **Noyce RS, Richardson CD.** 2012. Nectin 4 is the epithelial cell receptor for measles virus. *Trends Microbiol* **20**:429-439.

38. **Gubbay O, Curran J, Kolakofsky D.** 2001. Sendai virus genome synthesis and assembly are coupled: a possible mechanism to promote viral RNA polymerase processivity. *J Gen Virol* **82**:2895-2903.



39. **Plumet S, Duprex WP, Gerlier D.** 2005. Dynamics of viral RNA synthesis during measles virus infection. *J Virol* **79**:6900-6908.
40. **Pfaller CK, Mastorakos GM, Matchett WE, Ma X, Samuel CE, Cattaneo R.** 2015. Measles Virus Defective Interfering RNAs Are Generated Frequently and Early in the Absence of C Protein and Can Be Destabilized by Adenosine Deaminase Acting on RNA-1-Like Hypermethylations. *J Virol* **89**:7735-7747.
41. **Iwasaki M, Takeda M, Shirogane Y, Nakatsu Y, Nakamura T, Yanagi Y.** 2009. The matrix protein of measles virus regulates viral RNA synthesis and assembly by interacting with the nucleocapsid protein. *J Virol* **83**:10374-10383.
42. **Runkler N, Pohl C, Schneider-Schaulies S, Klenk HD, Maisner A.** 2007. Measles virus nucleocapsid transport to the plasma membrane requires stable expression and surface accumulation of the viral matrix protein. *Cell Microbiol* **9**:1203-1214.
43. **Salditt A, Koethe S, Pohl C, Harms H, Kolesnikova L, Becker S, Schneider-Schaulies S.** 2010. Measles virus M protein-driven particle production does not involve the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) system. *J Gen Virol* **91**:1464-1472.
44. **Griffin DE, Pan CH, Moss WJ.** 2008. Measles vaccines. *Front Biosci* **13**:1352-1370.
45. **Griffin DE, Lin WH, Pan CH.** 2012. Measles virus, immune control, and persistence. *FEMS Microbiol Rev* **36**:649-662.
46. **Perry RT, Halsey NA.** 2004. The clinical significance of measles: a review. *J Infect Dis* **189 Suppl 1**:S4-16.
47. **Griffin DE.** 2014. Measles virus and the nervous system. *Handb Clin Neurol* **123**:577-590.
48. **Enders JF, Peebles TC.** 1954. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc Soc Exp Biol Med* **86**:277-286.
49. **Krugman S.** 1971. Experiments at the Willowbrook State School. *Lancet* **1**:966-967.
50. **Katz SL, Kempe CH, Black FL, Lepow ML, Krugman S, Haggerty RJ, Enders JF.** 1960. Studies on an attenuated measles-virus vaccine. VIII. General summary and evaluation of the results of vaccine. *N Engl J Med* **263**:180-184.
51. **Bankamp B, Takeda M, Zhang Y, Xu W, Rota PA.** 2011. Genetic characterization of measles vaccine strains. *J Infect Dis* **204 Suppl 1**:S533-548.
52. **Chen RT, Markowitz LE, Albrecht P, Stewart JA, Mofenson LM, Preblud SR, Orenstein WA.** 1990. Measles antibody: reevaluation of protective titers. *J Infect Dis* **162**:1036-1042.

53. **Haralambieva IH, Simon WL, Kennedy RB, Ovsyannikova IG, Warner ND, Grill DE, Poland GA.** 2015. Profiling of measles-specific humoral immunity in individuals following two doses of MMR vaccine using proteome microarrays. *Viruses* **7**:1113-1133.
54. **Giraudon P, Wild TF.** 1985. Correlation between epitopes on hemagglutinin of measles virus and biological activities: passive protection by monoclonal antibodies is related to their hemagglutination inhibiting activity. *Virology* **144**:46-58.
55. **Malvoisin E, Wild F.** 1990. Contribution of measles virus fusion protein in protective immunity: anti-F monoclonal antibodies neutralize virus infectivity and protect mice against challenge. *J Virol* **64**:5160-5162.
56. **Samb B, Aaby P, Whittle HC, Seck AM, Rahman S, Bennett J, Markowitz L, Simondon F.** 1995. Serologic status and measles attack rates among vaccinated and unvaccinated children in rural Senegal. *Pediatr Infect Dis J* **14**:203-209.
57. **Burnet FM.** 1968. Measles as an index of immunological function. *Lancet* **2**:610-613.
58. **Markowitz LE, Chandler FW, Roldan EO, Saldana MJ, Roach KC, Hutchins SS, Preblud SR, Mitchell CD, Scott GB.** 1988. Fatal measles pneumonia without rash in a child with AIDS. *J Infect Dis* **158**:480-483.
59. **Permar SR, Klumpp SA, Mansfield KG, Kim WK, Gorgone DA, Lifton MA, Williams KC, Schmitz JE, Reimann KA, Axthelm MK, Polack FP, Griffin DE, Letvin NL.** 2003. Role of CD8(+) lymphocytes in control and clearance of measles virus infection of rhesus monkeys. *J Virol* **77**:4396-4400.
60. World Health Organization. WHO/IVB/13.01.
61. Bi-annual measles and rubella monitoring report. European centre for disease control. October 2017.
62. Bulletin hebdomadaire de la rougeole. Santé Publique France. Semaine 10/2018.
63. **Schnell MJ, Mebatsion T, Conzelmann KK.** 1994. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J* **13**:4195-4203.
64. **Lawson ND, Stillman EA, Whitt MA, Rose JK.** 1995. Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:4477-4481.
65. **Radecke F, Spielhofer P, Schneider H, Kaelin K, Huber M, Dotsch C, Christiansen G, Billeter MA.** 1995. Rescue of measles viruses from cloned DNA. *EMBO J* **14**:5773-5784.
66. **Parks CL, Lerch RA, Walpita P, Sidhu MS, Udem SA.** 1999. Enhanced measles virus cDNA rescue and gene expression after heat shock. *J Virol* **73**:3560-3566.

67. **Kolakofsky D, Roux L, Garcin D, Ruigrok RW.** 2005. Paramyxovirus mRNA editing, the "rule of six" and error catastrophe: a hypothesis. *J Gen Virol* **86**:1869-1877.
68. **Combredet C, Labrousse V, Mollet L, Lorin C, Delebecque F, Hurtrel B, McClure H, Feinberg MB, Brahic M, Tangy F.** 2003. A molecularly cloned Schwarz strain of measles virus vaccine induces strong immune responses in macaques and transgenic mice. *J Virol* **77**:11546-11554.
69. **Rima BK, Duprex WP.** 2009. The measles virus replication cycle. *Curr Top Microbiol Immunol* **329**:77-102.
70. **Duprex WP, McQuaid S, Hangartner L, Billeter MA, Rima BK.** 1999. Observation of measles virus cell-to-cell spread in astrocytoma cells by using a green fluorescent protein-expressing recombinant virus. *J Virol* **73**:9568-9575.
71. **Rennick LJ, de Vries RD, Carsillo TJ, Lemon K, van Amerongen G, Ludlow M, Nguyen DT, Yuksel S, Verburgh RJ, Haddock P, McQuaid S, Duprex WP, de Swart RL.** 2015. Live-attenuated measles virus vaccine targets dendritic cells and macrophages in muscle of nonhuman primates. *J Virol* **89**:2192-2200.
72. **Sato Y, Watanabe S, Fukuda Y, Hashiguchi T, Yanagi Y, Ohno S.** 2018. Cell-to-Cell Measles Virus Spread between Human Neurons Is Dependent on Hemagglutinin and Hyperfusogenic Fusion Protein. *J Virol* **92**.
73. **Komarova AV, Combredet C, Meyniel-Schicklin L, Chapelle M, Caignard G, Camadro JM, Lotteau V, Vidalain PO, Tangy F.** 2011. Proteomic analysis of virus-host interactions in an infectious context using recombinant viruses. *Mol Cell Proteomics* **10**:M110 007443.
74. **Komarova AV, Combredet C, Sismeiro O, Dillies MA, Jagla B, Sanchez David RY, Vabret N, Coppee JY, Vidalain PO, Tangy F.** 2013. Identification of RNA partners of viral proteins in infected cells. *RNA Biol* **10**:944-956.
75. **Richetta C, Gregoire IP, Verlhac P, Azocar O, Baguet J, Flacher M, Tangy F, Roubardin-Combe C, Faure M.** 2013. Sustained autophagy contributes to measles virus infectivity. *PLoS Pathog* **9**:e1003599.
76. **Komune N, Ichinohe T, Ito M, Yanagi Y.** 2011. Measles virus V protein inhibits NLRP3 inflammasome-mediated interleukin-1beta secretion. *J Virol* **85**:13019-13026.
77. **Muhlebach MD.** 2017. Vaccine platform recombinant measles virus. *Virus Genes* **53**:733-740.
78. **Fonteneau JF, Guillerme JB, Tangy F, Gregoire M.** 2013. Attenuated measles virus used as an oncolytic virus activates myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Oncoimmunology* **2**:e24212.
79. **Guillerme JB, Boisgerault N, Roulois D, Menager J, Combredet C, Tangy F, Fonteneau JF, Gregoire M.** 2013. Measles virus vaccine-infected tumor cells

induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Clin Cancer Res* **19**:1147-1158.

80. **Bautista-Lopez N, Ward BJ, Mills E, McCormick D, Martel N, Ratnam S.** 2000. Development and durability of measles antigen-specific lymphoproliferative response after MMR vaccination. *Vaccine* **18**:1393-1401.

81. **Pabst HF, Spady DW, Carson MM, Stelfox HT, Beeler JA, Krezolek MP.** 1997. Kinetics of immunologic responses after primary MMR vaccination. *Vaccine* **15**:10-14.

82. **del Valle JR, Devaux P, Hodge G, Wegner NJ, McChesney MB, Cattaneo R.** 2007. A vectored measles virus induces hepatitis B surface antigen antibodies while protecting macaques against measles virus challenge. *J Virol* **81**:10597-10605.

83. **Lorin C, Mollet L, Delebecque F, Combredet C, Hurtrel B, Charneau P, Brahic M, Tangy F.** 2004. A single injection of recombinant measles virus vaccines expressing human immunodeficiency virus (HIV) type 1 clade B envelope glycoproteins induces neutralizing antibodies and cellular immune responses to HIV. *J Virol* **78**:146-157.

84. **Stebbing R, Fevrier M, Li B, Lorin C, Koutsoukos M, Mee E, Rose N, Hall J, Page M, Almond N, Voss G, Tangy F.** 2012. Immunogenicity of a recombinant measles-HIV-1 clade B candidate vaccine. *PLoS One* **7**:e50397.

85. **Guerbois M, Moris A, Combredet C, Najburg V, Ruffie C, Fevrier M, Cayet N, Brandler S, Schwartz O, Tangy F.** 2009. Live attenuated measles vaccine expressing HIV-1 Gag virus like particles covered with gp160DeltaV1V2 is strongly immunogenic. *Virology* **388**:191-203.

86. **Isaacs A, Lindenmann J.** 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **147**:258-267.

87. **McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A.** 2015. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* **15**:87-103.

88. **Ivashkiv LB, Donlin LT.** 2014. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* **14**:36-49.

89. **Witte K, Witte E, Sabat R, Wolk K.** 2010. IL-28A, IL-28B, and IL-29: promising cytokines with type I interferon-like properties. *Cytokine Growth Factor Rev* **21**:237-251.

90. **Durbin RK, Kotenko SV, Durbin JE.** 2013. Interferon induction and function at the mucosal surface. *Immunol Rev* **255**:25-39.

91. **Montoya M, Schiavoni G, Mattei F, Gresser I, Belardelli F, Borrow P, Tough DF.** 2002. Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood* **99**:3263-3271.

92. **Le Bon A, Etchart N, Rossmann C, Ashton M, Hou S, Gewert D, Borrow P, Tough DF.** 2003. Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat Immunol* **4**:1009-1015.
93. **Rouzaut A, Garasa S, Teijeira A, Gonzalez I, Martinez-Forero I, Suarez N, Larrea E, Alfaro C, Palazon A, Dubrot J, Hervas-Stubbs S, Melero I.** 2010. Dendritic cells adhere to and transmigrate across lymphatic endothelium in response to IFN-alpha. *Eur J Immunol* **40**:3054-3063.
94. **Wilson EB, Yamada DH, Elsaesser H, Herskovitz J, Deng J, Cheng G, Aronow BJ, Karp CL, Brooks DG.** 2013. Blockade of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection. *Science* **340**:202-207.
95. **Herbeuval JP, Nilsson J, Boasso A, Hardy AW, Kruhlak MJ, Anderson SA, Dolan MJ, Dy M, Andersson J, Shearer GM.** 2006. Differential expression of IFN-alpha and TRAIL/DR5 in lymphoid tissue of progressor versus nonprogressor HIV-1-infected patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:7000-7005.
96. **Hall WC, Kovatch RM, Herman PH, Fox JG.** 1971. Pathology of measles in rhesus monkeys. *Vet Pathol* **8**:307-319.
97. **El Mubarak HS, Yuksel S, van Amerongen G, Mulder PG, Mukhtar MM, Osterhaus AD, de Swart RL.** 2007. Infection of cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) and rhesus macaques (*Macaca mulatta*) with different wild-type measles viruses. *J Gen Virol* **88**:2028-2034.
98. **Wyde PR, Ambrose MW, Voss TG, Meyer HL, Gilbert BE.** 1992. Measles virus replication in lungs of hispid cotton rats after intranasal inoculation. *Proc Soc Exp Biol Med* **201**:80-87.
99. **Wyde PR, Moore-Poveda DK, Daley NJ, Oshitani H.** 1999. Replication of clinical measles virus strains in hispid cotton rats. *Proc Soc Exp Biol Med* **221**:53-62.
100. **Horvat B, Rivaller P, Varior-Krishnan G, Cardoso A, Gerlier D, Rabourdin-Combe C.** 1996. Transgenic mice expressing human measles virus (MV) receptor CD46 provide cells exhibiting different permissivities to MV infections. *J Virol* **70**:6673-6681.
101. **Rall GF, Manchester M, Daniels LR, Callahan EM, Belman AR, Oldstone MB.** 1997. A transgenic mouse model for measles virus infection of the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:4659-4663.
102. **Hahm B, Arbour N, Naniche D, Homann D, Manchester M, Oldstone MB.** 2003. Measles virus infects and suppresses proliferation of T lymphocytes from transgenic mice bearing human signaling lymphocytic activation molecule. *J Virol* **77**:3505-3515.
103. **Yanagi Y, Takeda M, Ohno S.** 2006. Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J Gen Virol* **87**:2767-2779.

104. **Sellin CI, Davoust N, Guillaume V, Baas D, Belin MF, Buckland R, Wild TF, Horvat B.** 2006. High pathogenicity of wild-type measles virus infection in CD150 (SLAM) transgenic mice. *J Virol* **80**:6420-6429.
105. **Ohno S, Ono N, Seki F, Takeda M, Kura S, Tsuzuki T, Yanagi Y.** 2007. Measles virus infection of SLAM (CD150) knockin mice reproduces tropism and immunosuppression in human infection. *J Virol* **81**:1650-1659.
106. **Welstead GG, Iorio C, Draker R, Bayani J, Squire J, Vongpunsawad S, Cattaneo R, Richardson CD.** 2005. Measles virus replication in lymphatic cells and organs of CD150 (SLAM) transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:16415-16420.
107. **Marty RR, Knuchel MC, Morin TN, Naim HY.** 2015. An immune competent mouse model for the characterization of recombinant measles vaccines. *Hum Vaccin Immunother* **11**:83-90.
108. **Sansonetti P.** 2006. [How to define the species barrier to pathogen transmission?]. *Bull Acad Natl Med* **190**:611-622; discussion 623, 625-617.
109. **Duggal NK, Emerman M.** 2012. Evolutionary conflicts between viruses and restriction factors shape immunity. *Nat Rev Immunol* **12**:687-695.
110. **Iwasaki M, Yanagi Y.** 2011. Expression of the Sendai (murine parainfluenza) virus C protein alleviates restriction of measles virus growth in mouse cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:15384-15389.
111. **Griffin DE.** 2017. Measles Vaccine. *Viral Immunol* doi:10.1089/vim.2017.0143.
112. **Druelle J, Sellin CI, Waku-Kouomou D, Horvat B, Wild FT.** 2008. Wild type measles virus attenuation independent of type I IFN. *Virol J* **5**:22.
113. **Jiang Y, Qin Y, Chen M.** 2016. Host-Pathogen Interactions in Measles Virus Replication and Anti-Viral Immunity. *Viruses* **8**.
114. **Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Foy E, Loo YM, Gale M, Jr., Akira S, Yonehara S, Kato A, Fujita T.** 2005. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* **175**:2851-2858.
115. **Sanchez David RY, Combredet C, Sismeiro O, Dillies MA, Jagla B, Coppee JY, Mura M, Guerbois Galla M, Despres P, Tangy F, Komarova AV.** 2016. Comparative analysis of viral RNA signatures on different RIG-I-like receptors. *Elife* **5**:e11275.
116. **Runge S, Sparrer KM, Lassig C, Hembach K, Baum A, Garcia-Sastre A, Soding J, Conzelmann KK, Hopfner KP.** 2014. In vivo ligands of MDA5 and RIG-I in measles virus-infected cells. *PLoS Pathog* **10**:e1004081.

117. **Ikegame S, Takeda M, Ohno S, Nakatsu Y, Nakanishi Y, Yanagi Y.** 2010. Both RIG-I and MDA5 RNA helicases contribute to the induction of alpha/beta interferon in measles virus-infected human cells. *J Virol* **84**:372-379.
118. **Rothenfusser S, Goutagny N, DiPerna G, Gong M, Monks BG, Schoenemeyer A, Yamamoto M, Akira S, Fitzgerald KA.** 2005. The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol* **175**:5260-5268.
119. **Saito T, Hirai R, Loo YM, Owen D, Johnson CL, Sinha SC, Akira S, Fujita T, Gale M, Jr.** 2007. Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:582-587.
120. **Bruns AM, Horvath CM.** 2015. LGP2 synergy with MDA5 in RLR-mediated RNA recognition and antiviral signaling. *Cytokine* **74**:198-206.
121. **Aoshi T, Koyama S, Kobiyama K, Akira S, Ishii KJ.** 2011. Innate and adaptive immune responses to viral infection and vaccination. *Curr Opin Virol* **1**:226-232.
122. **Loo YM, Gale M, Jr.** 2011. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* **34**:680-692.
123. **Schlender J, Hornung V, Finke S, Gunthner-Biller M, Marozin S, Brzozka K, Moghim S, Endres S, Hartmann G, Conzelmann KK.** 2005. Inhibition of toll-like receptor 7- and 9-mediated alpha/beta interferon production in human plasmacytoid dendritic cells by respiratory syncytial virus and measles virus. *J Virol* **79**:5507-5515.
124. **Bieback K, Lien E, Klagge IM, Avota E, Schneider-Schaulies J, Duprex WP, Wagner H, Kirschning CJ, Ter Meulen V, Schneider-Schaulies S.** 2002. Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J Virol* **76**:8729-8736.
125. **tenOever BR, Servant MJ, Grandvaux N, Lin R, Hiscott J.** 2002. Recognition of the measles virus nucleocapsid as a mechanism of IRF-3 activation. *J Virol* **76**:3659-3669.
126. **Andrejeva J, Childs KS, Young DF, Carlos TS, Stock N, Goodbourn S, Randall RE.** 2004. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:17264-17269.
127. **Childs K, Stock N, Ross C, Andrejeva J, Hilton L, Skinner M, Randall R, Goodbourn S.** 2007. mda-5, but not RIG-I, is a common target for paramyxovirus V proteins. *Virology* **359**:190-200.
128. **Irie T, Kiyotani K, Igarashi T, Yoshida A, Sakaguchi T.** 2012. Inhibition of interferon regulatory factor 3 activation by paramyxovirus V protein. *J Virol* **86**:7136-7145.
129. **Schuhmann KM, Pfaller CK, Conzelmann KK.** 2011. The measles virus V protein binds to p65 (RelA) to suppress NF-kappaB activity. *J Virol* **85**:3162-3171.

130. **Caignard G, Bourai M, Jacob Y, Infection MpIMAP, Tangy F, Vidalain PO.** 2009. Inhibition of IFN-alpha/beta signaling by two discrete peptides within measles virus V protein that specifically bind STAT1 and STAT2. *Virology* **383**:112-120.
131. **Devaux P, Priniski L, Cattaneo R.** 2013. The measles virus phosphoprotein interacts with the linker domain of STAT1. *Virology* **444**:250-256.
132. **Caignard G, Guerbois M, Labernardiere JL, Jacob Y, Jones LM, Infectious Mapping Project IM, Wild F, Tangy F, Vidalain PO.** 2007. Measles virus V protein blocks Jak1-mediated phosphorylation of STAT1 to escape IFN-alpha/beta signaling. *Virology* **368**:351-362.
133. **Devaux P, von Messling V, Songsunthong W, Springfield C, Cattaneo R.** 2007. Tyrosine 110 in the measles virus phosphoprotein is required to block STAT1 phosphorylation. *Virology* **360**:72-83.
134. **Yokota S, Okabayashi T, Fujii N.** 2011. Measles virus C protein suppresses gamma-activated factor formation and virus-induced cell growth arrest. *Virology* **414**:74-82.
135. **Sparrer KM, Pfaller CK, Conzelmann KK.** 2012. Measles virus C protein interferes with Beta interferon transcription in the nucleus. *J Virol* **86**:796-805.
136. **Naniche D, Yeh A, Eto D, Manchester M, Friedman RM, Oldstone MB.** 2000. Evasion of host defenses by measles virus: wild-type measles virus infection interferes with induction of Alpha/Beta interferon production. *J Virol* **74**:7478-7484.
137. **Shingai M, Ebihara T, Begum NA, Kato A, Honma T, Matsumoto K, Saito H, Ogura H, Matsumoto M, Seya T.** 2007. Differential type I IFN-inducing abilities of wild-type versus vaccine strains of measles virus. *J Immunol* **179**:6123-6133.
138. **Kessler JR, Kremer JR, Muller CP.** 2011. Interplay of measles virus with early induced cytokines reveals different wild type phenotypes. *Virus Res* **155**:195-202.
139. **Shivakoti R, Siwek M, Hauer D, Schultz KL, Griffin DE.** 2013. Induction of dendritic cell production of type I and type III interferons by wild-type and vaccine strains of measles virus: role of defective interfering RNAs. *J Virol* **87**:7816-7827.
140. **Zilliox MJ, Moss WJ, Griffin DE.** 2007. Gene expression changes in peripheral blood mononuclear cells during measles virus infection. *Clin Vaccine Immunol* **14**:918-923.
141. **Shiozawa S, Yoshikawa N, Iijima K, Negishi K.** 1988. A sensitive radioimmunoassay for circulating alpha-interferon in the plasma of healthy children and patients with measles virus infection. *Clin Exp Immunol* **73**:366-369.
142. **Yu XL, Cheng YM, Shi BS, Qian FX, Wang FB, Liu XN, Yang HY, Xu QN, Qi TK, Zha LJ, Yuan ZH, Ghildyal R.** 2008. Measles virus infection in adults induces production of IL-10 and is associated with increased CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* **181**:7356-7366.



143. **Bolt G, Berg K, Blixenkrone-Moller M.** 2002. Measles virus-induced modulation of host-cell gene expression. *J Gen Virol* **83**:1157-1165.
144. **Petralli JK, Merigan TC, Wilbur JR.** 1965. Circulating Interferon after Measles Vaccination. *N Engl J Med* **273**:198-201.
145. **Shivakoti R, Hauer D, Adams RJ, Lin WH, Duprex WP, de Swart RL, Griffin DE.** 2015. Limited in vivo production of type I or type III interferon after infection of macaques with vaccine or wild-type strains of measles virus. *J Interferon Cytokine Res* **35**:292-301.
146. **Van Nguyen N, Kato SI, Nagata K, Takeuchi K.** 2016. Differential induction of type I interferons in macaques by wild-type measles virus alone or with the hemagglutinin protein of the Edmonston vaccine strain. *Microbiol Immunol* **60**:501-505.
147. **Tapia K, Kim WK, Sun Y, Mercado-Lopez X, Dunay E, Wise M, Adu M, Lopez CB.** 2013. Defective viral genomes arising in vivo provide critical danger signals for the triggering of lung antiviral immunity. *PLoS Pathog* **9**:e1003703.
148. **Vasilijevic J, Zamarreno N, Oliveros JC, Rodriguez-Frandsen A, Gomez G, Rodriguez G, Perez-Ruiz M, Rey S, Barba I, Pozo F, Casas I, Nieto A, Falcon A.** 2017. Reduced accumulation of defective viral genomes contributes to severe outcome in influenza virus infected patients. *PLoS Pathog* **13**:e1006650.
149. **Lazzarini RA, Keene JD, Schubert M.** 1981. The origins of defective interfering particles of the negative-strand RNA viruses. *Cell* **26**:145-154.
150. **Dimmock NJ, Easton AJ.** 2014. Defective interfering influenza virus RNAs: time to reevaluate their clinical potential as broad-spectrum antivirals? *J Virol* **88**:5217-5227.
151. **Lopez CB.** 2014. Defective viral genomes: critical danger signals of viral infections. *J Virol* **88**:8720-8723.
152. **Ke R, Aaskov J, Holmes EC, Lloyd-Smith JO.** 2013. Phylodynamic analysis of the emergence and epidemiological impact of transmissible defective dengue viruses. *PLoS Pathog* **9**:e1003193.
153. **Finke S, Conzelmann KK.** 1999. Virus promoters determine interference by defective RNAs: selective amplification of mini-RNA vectors and rescue from cDNA by a 3' copy-back ambisense rabies virus. *J Virol* **73**:3818-3825.
154. **Von Magnus P.** 1954. Incomplete forms of influenza virus. *Adv Virus Res* **2**:59-79.
155. **Huang AS.** 1973. Defective interfering viruses. *Annu Rev Microbiol* **27**:101-117.
156. **Huang AS, Baltimore D.** 1970. Defective viral particles and viral disease processes. *Nature* **226**:325-327.

157. **Strahle L, Garcin D, Kolakofsky D.** 2006. Sendai virus defective-interfering genomes and the activation of interferon-beta. *Virology* **351**:101-111.
158. **Mercado-Lopez X, Cotter CR, Kim WK, Sun Y, Munoz L, Tapia K, Lopez CB.** 2013. Highly immunostimulatory RNA derived from a Sendai virus defective viral genome. *Vaccine* **31**:5713-5721.
159. **Rao DD, Huang AS.** 1982. Interference among defective interfering particles of vesicular stomatitis virus. *J Virol* **41**:210-221.
160. **Perrault J, Holland J.** 1972. Variability of vesicular stomatitis virus autointerference with different host cells and virus serotypes. *Virology* **50**:148-158.
161. **Kolakofsky D.** 1976. Isolation and characterization of Sendai virus DI-RNAs. *Cell* **8**:547-555.
162. **Johnston MD.** 1981. The characteristics required for a Sendai virus preparation to induce high levels of interferon in human lymphoblastoid cells. *J Gen Virol* **56**:175-184.
163. **Isken B, Genzel Y, Reichl U.** 2012. Productivity, apoptosis, and infection dynamics of influenza A/PR/8 strains and A/PR/8-based reassortants. *Vaccine* **30**:5253-5261.
164. **Frensing T, Pflugmacher A, Bachmann M, Peschel B, Reichl U.** 2014. Impact of defective interfering particles on virus replication and antiviral host response in cell culture-based influenza vaccine production. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**:8999-9008.
165. **Whistler T, Bellini WJ, Rota PA.** 1996. Generation of defective interfering particles by two vaccine strains of measles virus. *Virology* **220**:480-484.
166. **Stark C, Kennedy SI.** 1978. The generation and propagation of defective-interfering particles of Semliki Forest virus in different cell types. *Virology* **89**:285-299.
167. **Kingsbury DW, Portner A.** 1970. On the genesis of incomplete Sendai virions. *Virology* **42**:872-879.
168. **Fodor E, Mingay LJ, Crow M, Deng T, Brownlee GG.** 2003. A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase promotes the generation of defective interfering RNAs. *J Virol* **77**:5017-5020.
169. **Duhaut SD, McCauley JW.** 1996. Defective RNAs inhibit the assembly of influenza virus genome segments in a segment-specific manner. *Virology* **216**:326-337.
170. **Saira K, Lin X, DePasse JV, Halpin R, Twaddle A, Stockwell T, Angus B, Cozzi-Lepri A, Delfino M, Dugan V, Dwyer DE, Freiberg M, Horban A, Losso M, Lynfield R, Wentworth DN, Holmes EC, Davey R, Wentworth DE, Ghedin E, Group IFS, Group IFS.** 2013. Sequence analysis of in vivo defective interfering-like RNA of influenza A H1N1 pandemic virus. *J Virol* **87**:8064-8074.

171. **Li D, Lott WB, Lowry K, Jones A, Thu HM, Aaskov J.** 2011. Defective interfering viral particles in acute dengue infections. *PLoS One* **6**:e19447.
172. **Prince AM, Huima-Byron T, Parker TS, Levine DM.** 1996. Visualization of hepatitis C virions and putative defective interfering particles isolated from low-density lipoproteins. *J Viral Hepat* **3**:11-17.
173. **Sun Y, Jain D, Koziol-White CJ, Genoyer E, Gilbert M, Tapia K, Panettieri RA, Jr., Hodinka RL, Lopez CB.** 2015. Immunostimulatory Defective Viral Genomes from Respiratory Syncytial Virus Promote a Strong Innate Antiviral Response during Infection in Mice and Humans. *PLoS Pathog* **11**:e1005122.
174. **Pfaller CK, Radeke MJ, Cattaneo R, Samuel CE.** 2014. Measles virus C protein impairs production of defective copyback double-stranded viral RNA and activation of protein kinase R. *J Virol* **88**:456-468.
175. **Ho TH, Kew C, Lui PY, Chan CP, Satoh T, Akira S, Jin DY, Kok KH.** 2016. PACT- and RIG-I-Dependent Activation of Type I Interferon Production by a Defective Interfering RNA Derived from Measles Virus Vaccine. *J Virol* **90**:1557-1568.
176. **Plumet S, Herschke F, Bourhis JM, Valentin H, Longhi S, Gerlier D.** 2007. Cytosolic 5'-triphosphate ended viral leader transcript of measles virus as activator of the RIG I-mediated interferon response. *PLoS One* **2**:e279.
177. **Xu J, Mercado-Lopez X, Grier JT, Kim WK, Chun LF, Irvine EB, Del Toro Duany Y, Kell A, Hur S, Gale M, Jr., Raj A, Lopez CB.** 2015. Identification of a Natural Viral RNA Motif That Optimizes Sensing of Viral RNA by RIG-I. *MBio* **6**:e01265-01215.
178. **Baum A, Sachidanandam R, Garcia-Sastre A.** 2010. Preference of RIG-I for short viral RNA molecules in infected cells revealed by next-generation sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:16303-16308.
179. **Yount JS, Kraus TA, Horvath CM, Moran TM, Lopez CB.** 2006. A novel role for viral-defective interfering particles in enhancing dendritic cell maturation. *J Immunol* **177**:4503-4513.
180. **Doyle M, Holland JJ.** 1973. Prophylaxis and immunization in mice by use of virus-free defective T particles to protect against intracerebral infection by vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**:2105-2108.
181. **Barrett AD, Dimmock NJ.** 1986. Defective interfering viruses and infections of animals. *Curr Top Microbiol Immunol* **128**:55-84.
182. **Dimmock NJ, Kennedy SI.** 1978. Prevention of death in Semliki Forest virus-infected mice by administration of defective-interfering Semliki Forest virus. *J Gen Virol* **39**:231-242.
183. **Ginsberg HS.** 1954. Formation of non-infectious influenza virus in mouse lungs: its dependence upon extensive pulmonary consolidation initiated by the viral inoculum. *J Exp Med* **100**:581-603.

184. **Gamboa ET, Harter DH, Duffy PE, Hsu KC.** 1976. Murine influenza virus encephalomyelitis. III. Effect of defective interfering virus particles. *Acta Neuropathol* **34**:157-169.
185. **Martinez-Gil L, Goff PH, Hai R, Garcia-Sastre A, Shaw ML, Palese P.** 2013. A Sendai virus-derived RNA agonist of RIG-I as a virus vaccine adjuvant. *J Virol* **87**:1290-1300.
186. **Beljanski V, Chiang C, Kirchenbaum GA, Olganier D, Bloom CE, Wong T, Haddad EK, Trautmann L, Ross TM, Hiscott J.** 2015. Enhanced Influenza Virus-Like Particle Vaccination with a Structurally Optimized RIG-I Agonist as Adjuvant. *J Virol* **89**:10612-10624.
187. **Nye ER.** 2002. Alphonse Laveran (1845-1922): discoverer of the malarial parasite and Nobel laureate, 1907. *J Med Biogr* **10**:81-87.
188. **Naing C, Whittaker MA, Nyunt Wai V, Mak JW.** 2014. Is *Plasmodium vivax* malaria a severe malaria?: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* **8**:e3071.
189. **Ahmed MA, Cox-Singh J.** 2015. *Plasmodium knowlesi* - an emerging pathogen. *ISBT Sci Ser* **10**:134-140.
190. **Anonymous.** World Health Organization. Millennium development goals **2015** report.
191. **Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Suon S, Sreng S, Anderson JM, Mao S, Sam B, Sopha C, Chuor CM, Nguon C, Sovannaroeth S, Pukrittayakamee S, Jittamala P, Chotivanich K, Chutasmit K, Suchatsoonthorn C, Runchaoen R, Hien TT, Thuy-Nhien NT, Thanh NV, Phu NH, Htut Y, Han KT, Aye KH, Mokuolu OA, Olaosebikan RR, Folaranmi OO, Mayxay M, Khanthavong M, Hongvanthong B, Newton PN, Onyamboko MA, Fanello CI, Tshefu AK, Mishra N, Valecha N, Phyo AP, Nosten F, Yi P, Tripura R, Borrmann S, Bashraheil M, Peshu J, Faiz MA, Ghose A, Hossain MA, Samad R, et al.** 2014. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* **371**:411-423.
192. **Velut G, Dia A, Briolant S, Javelle E, Pommier de Santi V, Berger F, Savini H, Simon F, Michel R, Pradines B.** 2018. Le paludisme : toujours d'actualité dans les armées françaises. *Médecine et armées* **in press**.
193. **Rapp C, Aoun O, Ficko C, Andriamanantena D, Flateau C.** 2014. Infectious diseases related aeromedical evacuation of French soldiers in a level 4 military treatment facility: a ten year retrospective analysis. *Travel Med Infect Dis* **12**:355-359.
194. **Madamet M, Gaillard T, Velut G, Ficko C, Houze P, Bylicki C, Merat S, Houze S, Taudon N, Michel R, Pasquier P, Rapp C, Pradines B.** 2015. Malaria Prophylaxis Failure with Doxycycline, Central African Republic, 2014. *Emerg Infect Dis* **21**:1485-1486.

195. **Kappe S, Bruderer T, Gantt S, Fujioka H, Nussenzweig V, Menard R.** 1999. Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites. *J Cell Biol* **147**:937-944.
196. **Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K.** 2016. Malaria: Biology and Disease. *Cell* **167**:610-624.
197. **Nussenzweig V, Nussenzweig RS.** 1989. Circumsporozoite proteins of malaria parasites. *Bull Mem Acad R Med Belg* **144**:493-504.
198. **Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT.** 2006. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* **313**:1287-1290.
199. **White NJ.** 2016. Why Do Some Primate Malaras Relapse? *Trends Parasitol* **32**:918-920.
200. **Weiss GE, Gilson PR, Taechalerpaisarn T, Tham WH, de Jong NW, Harvey KL, Fowkes FJ, Barlow PN, Rayner JC, Wright GJ, Cowman AF, Crabb BS.** 2015. Revealing the sequence and resulting cellular morphology of receptor-ligand interactions during *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. *PLoS Pathog* **11**:e1004670.
201. **Tham WH, Healer J, Cowman AF.** 2012. Erythrocyte and reticulocyte binding-like proteins of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol* **28**:23-30.
202. **Crosnier C, Bustamante LY, Bartholdson SJ, Bei AK, Theron M, Uchikawa M, Mboup S, Ndir O, Kwiatkowski DP, Duraisingh MT, Rayner JC, Wright GJ.** 2011. Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nature* **480**:534-537.
203. **Reddy KS, Amlabu E, Pandey AK, Mitra P, Chauhan VS, Gaur D.** 2015. Multiprotein complex between the GPI-anchored CyRPA with PfRH5 and PfRipr is crucial for *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**:1179-1184.
204. **Besteiro S, Dubremetz JF, Lebrun M.** 2011. The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. *Cell Microbiol* **13**:797-805.
205. **Kafsack BF, Rovira-Graells N, Clark TG, Bancells C, Crowley VM, Campino SG, Williams AE, Drought LG, Kwiatkowski DP, Baker DA, Cortes A, Llinas M.** 2014. A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria parasites. *Nature* **507**:248-252.
206. **Schofield L.** 2007. Rational approaches to developing an anti-disease vaccine against malaria. *Microbes Infect* **9**:784-791.
207. **Kalantari P.** 2018. The Emerging Role of Pattern Recognition Receptors in the Pathogenesis of Malaria. *Vaccines (Basel)* **6**.

208. **Liehl P, Zuzarte-Luis V, Chan J, Zillinger T, Baptista F, Carapau D, Konert M, Hanson KK, Carret C, Lassnig C, Muller M, Kalinke U, Saeed M, Chora AF, Golenbock DT, Strobl B, Prudencio M, Coelho LP, Kappe SH, Superti-Furga G, Pichlmair A, Vigario AM, Rice CM, Fitzgerald KA, Barchet W, Mota MM.** 2014. Host-cell sensors for Plasmodium activate innate immunity against liver-stage infection. *Nat Med* **20**:47-53.
209. **Hisaeda H, Yasutomo K, Himeno K.** 2005. Malaria: immune evasion by parasites. *Int J Biochem Cell Biol* **37**:700-706.
210. **Soni R, Sharma D, Rai P, Sharma B, Bhatt TK.** 2017. Signaling Strategies of Malaria Parasite for Its Survival, Proliferation, and Infection during Erythrocytic Stage. *Front Immunol* **8**:349.
211. **Gazzinelli RT, Kalantari P, Fitzgerald KA, Golenbock DT.** 2014. Innate sensing of malaria parasites. *Nat Rev Immunol* **14**:744-757.
212. **Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, Latz E, Monks BG, Visintin A, Halmen KA, Lamphier M, Olivier M, Bartholomeu DC, Gazzinelli RT, Golenbock DT.** 2007. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:1919-1924.
213. **Barrera V, Skorokhod OA, Baci D, Gremo G, Arese P, Schwarzer E.** 2011. Host fibrinogen stably bound to hemozoin rapidly activates monocytes via TLR-4 and CD11b/CD18-integrin: a new paradigm of hemozoin action. *Blood* **117**:5674-5682.
214. **Baccarella A, Fontana MF, Chen EC, Kim CC.** 2013. Toll-like receptor 7 mediates early innate immune responses to malaria. *Infect Immun* **81**:4431-4442.
215. **Gowda DC.** 2007. TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs. *Trends Parasitol* **23**:596-604.
216. **Erdman LK, Finney CA, Liles WC, Kain KC.** 2008. Inflammatory pathways in malaria infection: TLRs share the stage with other components of innate immunity. *Mol Biochem Parasitol* **162**:105-111.
217. **Love MS, Millholland MG, Mishra S, Kulkarni S, Freeman KB, Pan W, Kavash RW, Costanzo MJ, Jo H, Daly TM, Williams DR, Kowalska MA, Bergman LW, Poncz M, DeGrado WF, Sinnis P, Scott RW, Greenbaum DC.** 2012. Platelet factor 4 activity against *P. falciparum* and its translation to nonpeptidic mimics as antimalarials. *Cell Host Microbe* **12**:815-823.
218. **Roetynck S, Baratin M, Johansson S, Lemmers C, Vivier E, Ugolini S.** 2006. Natural killer cells and malaria. *Immunol Rev* **214**:251-263.
219. **Silver KL, Higgins SJ, McDonald CR, Kain KC.** 2010. Complement driven innate immune response to malaria: fuelling severe malarial diseases. *Cell Microbiol* **12**:1036-1045.

220. **Perkins DJ, Were T, Davenport GC, Kempaiah P, Hittner JB, Ong'echa JM.** 2011. Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis. *Int J Biol Sci* **7**:1427-1442.
221. **Mooney JP, Wassmer SC, Hafalla JC.** 2017. Type I Interferon in Malaria: A Balancing Act. *Trends Parasitol* **33**:257-260.
222. **Rodrigues M, Nussenzweig RS, Zavala F.** 1993. The relative contribution of antibodies, CD4+ and CD8+ T cells to sporozoite-induced protection against malaria. *Immunology* **80**:1-5.
223. **Bergmann-Leitner ES, Scheiblhofer S, Weiss R, Duncan EH, Leitner WW, Chen D, Angov E, Khan F, Williams JL, Winter DB, Thalhamer J, Lyon JA, Tsokos GC.** 2005. C3d binding to the circumsporozoite protein carboxy-terminus deviates immunity against malaria. *Int Immunol* **17**:245-255.
224. **Regules JA, Cummings JF, Ockenhouse CF.** 2011. The RTS,S vaccine candidate for malaria. *Expert Rev Vaccines* **10**:589-599.
225. **Bergmann-Leitner ES, Duncan EH, Mease RM, Angov E.** 2012. Impact of pre-existing MSP1(42)-allele specific immunity on potency of an erythrocytic *Plasmodium falciparum* vaccine. *Malar J* **11**:315.
226. **Carter R, Mendis KN.** 1991. Immune responses against sexual stages of *Plasmodium vivax* during human malarial infections in Sri Lanka. *Parassitologia* **33**:67-70.
227. **Duah NO, Miles DJ, Whittle HC, Conway DJ.** 2010. Acquisition of antibody isotypes against *Plasmodium falciparum* blood stage antigens in a birth cohort. *Parasite Immunol* **32**:125-134.
228. **Elliott SR, Kuns RD, Good MF.** 2005. Heterologous immunity in the absence of variant-specific antibodies after exposure to subpatent infection with blood-stage malaria. *Infect Immun* **73**:2478-2485.
229. **Jafarshad A, Dziegiel MH, Lundquist R, Nielsen LK, Singh S, Druilhe PL.** 2007. A novel antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism involved in defense against malaria requires costimulation of monocytes FcγR2b and FcγR3. *J Immunol* **178**:3099-3106.
230. **Schieck E, Poole EJ, Rippert A, Peshu J, Sasi P, Borrmann S, Bull PC.** 2017. *Plasmodium falciparum* variant erythrocyte surface antigens: a pilot study of antibody acquisition in recurrent natural infections. *Malar J* **16**:450.
231. **Malik A, Egan JE, Houghten RA, Sadoff JC, Hoffman SL.** 1991. Human cytotoxic T lymphocytes against the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:3300-3304.
232. **Hill AV, Elvin J, Willis AC, Aidoo M, Allsopp CE, Gotch FM, Gao XM, Takiguchi M, Greenwood BM, Townsend AR, et al.** 1992. Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature* **360**:434-439.

233. **Chakravarty S, Cockburn IA, Kuk S, Overstreet MG, Sacci JB, Zavala F.** 2007. CD8+ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. *Nat Med* **13**:1035-1041.
234. **Overstreet MG, Chen YC, Cockburn IA, Tse SW, Zavala F.** 2011. CD4+ T cells modulate expansion and survival but not functional properties of effector and memory CD8+ T cells induced by malaria sporozoites. *PLoS One* **6**:e15948.
235. **Freitas do Rosario AP, Lamb T, Spence P, Stephens R, Lang A, Roers A, Muller W, O'Garra A, Langhorne J.** 2012. IL-27 promotes IL-10 production by effector Th1 CD4+ T cells: a critical mechanism for protection from severe immunopathology during malaria infection. *J Immunol* **188**:1178-1190.
236. **Walther M, Jeffries D, Finney OC, Njie M, Ebonyi A, Deininger S, Lawrence E, Ngwa-Amambua A, Jayasooriya S, Cheeseman IH, Gomez-Escobar N, Okebe J, Conway DJ, Riley EM.** 2009. Distinct roles for FOXP3 and FOXP3 CD4 T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Pathog* **5**:e1000364.
237. **Scholzen A, Mittag D, Rogerson SJ, Cooke BM, Plebanski M.** 2009. *Plasmodium falciparum*-mediated induction of human CD25Foxp3 CD4 T cells is independent of direct TCR stimulation and requires IL-2, IL-10 and TGFbeta. *PLoS Pathog* **5**:e1000543.
238. **Kirchgatter K, Del Portillo HA.** 2005. Clinical and molecular aspects of severe malaria. *An Acad Bras Cienc* **77**:455-475.
239. **Coppi A, Pinzon-Ortiz C, Hutter C, Sinnis P.** 2005. The *Plasmodium* circumsporozoite protein is proteolytically processed during cell invasion. *J Exp Med* **201**:27-33.
240. **Baum J, Chen L, Healer J, Lopaticki S, Boyle M, Triglia T, Ehlgren F, Ralph SA, Beeson JG, Cowman AF.** 2009. Reticulocyte-binding protein homologue 5 - an essential adhesin involved in invasion of human erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol* **39**:371-380.
241. **Smith JD, Chitnis CE, Craig AG, Roberts DJ, Hudson-Taylor DE, Peterson DS, Pinches R, Newbold CI, Miller LH.** 1995. Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell* **82**:101-110.
242. **Kyes SA, Rowe JA, Kriek N, Newbold CI.** 1999. Rifins: a second family of clonally variant proteins expressed on the surface of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:9333-9338.
243. **Preiser PR, Jarra W, Capiod T, Snounou G.** 1999. A rhoptry-protein-associated mechanism of clonal phenotypic variation in rodent malaria. *Nature* **398**:618-622.
244. **Anders RF, Brown GV, Coppel RL, Kemp DJ.** 1986. Repeat structures in malaria antigens. *P N G Med J* **29**:87-93.



245. **Ramasamy R.** 1998. Molecular basis for evasion of host immunity and pathogenesis in malaria. *Biochim Biophys Acta* **1406**:10-27.
246. **Leitner WW, Krzych U.** 1997. Plasmodium falciparum malaria blood stage parasites preferentially inhibit macrophages with high phagocytic activity. *Parasite Immunol* **19**:103-110.
247. **Wykes MN, Horne-Debets JM, Leow CY, Karunarathne DS.** 2014. Malaria drives T cells to exhaustion. *Front Microbiol* **5**:249.
248. **Achtman AH, Bull PC, Stephens R, Langhorne J.** 2005. Longevity of the immune response and memory to blood-stage malaria infection. *Curr Top Microbiol Immunol* **297**:71-102.
249. **Greenwood B, Doumbo OK.** 2016. Implementation of the malaria candidate vaccine RTS,S/AS01. *Lancet* **387**:318-319.
250. **Riley EM, Stewart VA.** 2013. Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development. *Nat Med* **19**:168-178.
251. **Gordon DM, McGovern TW, Krzych U, Cohen JC, Schneider I, LaChance R, Heppner DG, Yuan G, Hollingdale M, Slaoui M, et al.** 1995. Safety, immunogenicity, and efficacy of a recombinantly produced Plasmodium falciparum circumsporozoite protein-hepatitis B surface antigen subunit vaccine. *J Infect Dis* **171**:1576-1585.
252. **Kester KE, Cummings JF, Ofori-Anyinam O, Ockenhouse CF, Krzych U, Moris P, Schwenk R, Nielsen RA, Debebe Z, Pinelis E, Juompan L, Williams J, Dowler M, Stewart VA, Wirtz RA, Dubois MC, Lievens M, Cohen J, Ballou WR, Heppner DG, Jr., Rts SVEG.** 2009. Randomized, double-blind, phase 2a trial of falciparum malaria vaccines RTS,S/AS01B and RTS,S/AS02A in malaria-naive adults: safety, efficacy, and immunologic associates of protection. *J Infect Dis* **200**:337-346.
253. **Agnandji ST, Fernandes JF, Bache EB, Ramharter M.** 2015. Clinical development of RTS,S/AS malaria vaccine: a systematic review of clinical Phase I-III trials. *Future Microbiol* **10**:1553-1578.
254. **Aaby P, Rodrigues A, Kofoed PE, Benn CS.** 2015. RTS,S/AS01 malaria vaccine and child mortality. *Lancet* **386**:1735-1736.
255. **Kazmin D, Nakaya HI, Lee EK, Johnson MJ, van der Most R, van den Berg RA, Ballou WR, Jongert E, Wille-Reece U, Ockenhouse C, Aderem A, Zak DE, Sadoff J, Hendriks J, Wrammert J, Ahmed R, Pulendran B.** 2017. Systems analysis of protective immune responses to RTS,S malaria vaccination in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**:2425-2430.
256. **Rydzynski C, Daniels KA, Karmele EP, Brooks TR, Mahl SE, Moran MT, Li C, Sutiwisesak R, Welsh RM, Waggoner SN.** 2015. Generation of cellular immune memory and B-cell immunity is impaired by natural killer cells. *Nat Commun* **6**:6375.

257. **Nussenzweig RS, Vanderberg J, Most H, Orton C.** 1967. Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of plasmodium berghei. *Nature* **216**:160-162.
258. **Epstein JE, Tewari K, Lyke KE, Sim BK, Billingsley PF, Laurens MB, Gunasekera A, Chakravarty S, James ER, Sedegah M, Richman A, Velmurugan S, Reyes S, Li M, Tucker K, Ahumada A, Ruben AJ, Li T, Stafford R, Eappen AG, Tamminga C, Bennett JW, Ockenhouse CF, Murphy JR, Komisar J, Thomas N, Loyevsky M, Birkett A, Plowe CV, Loucq C, Edelman R, Richie TL, Seder RA, Hoffman SL.** 2011. Live attenuated malaria vaccine designed to protect through hepatic CD8(+) T cell immunity. *Science* **334**:475-480.
259. **Clyde DF, McCarthy VC, Miller RM, Hornick RB.** 1973. Specificity of protection of man immunized against sporozoite-induced falciparum malaria. *Am J Med Sci* **266**:398-403.
260. **Rieckmann KH, Carson PE, Beaudoin RL, Cassells JS, Sell KW.** 1974. Letter: Sporozoite induced immunity in man against an Ethiopian strain of Plasmodium falciparum. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **68**:258-259.
261. **Hoffman SL, Goh LM, Luke TC, Schneider I, Le TP, Doolan DL, Sacchi J, de la Vega P, Dowler M, Paul C, Gordon DM, Stoute JA, Church LW, Sedegah M, Heppner DG, Ballou WR, Richie TL.** 2002. Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated Plasmodium falciparum sporozoites. *J Infect Dis* **185**:1155-1164.
262. **Hoffman SL, Vekemans J, Richie TL, Duffy PE.** 2015. The March Toward Malaria Vaccines. *Am J Prev Med* **49**:S319-333.
263. **Zaidi I, Diallo H, Conteh S, Robbins Y, Kolasny J, Orr-Gonzalez S, Carter D, Butler B, Lambert L, Brickley E, Morrison R, Sissoko M, Healy SA, Sim BKL, Doumbo OK, Hoffman SL, Duffy PE.** 2017. gammadelta T Cells Are Required for the Induction of Sterile Immunity during Irradiated Sporozoite Vaccinations. *J Immunol* **199**:3781-3788.
264. **Phares TW, May AD, Genito CJ, Hoyt NA, Khan FA, Porter MD, DeBot M, Waters NC, Saudan P, Dutta S.** 2017. Rhesus macaque and mouse models for down-selecting circumsporozoite protein based malaria vaccines differ significantly in immunogenicity and functional outcomes. *Malar J* **16**:115.
265. **Miura K.** 2016. Progress and prospects for blood-stage malaria vaccines. *Expert Rev Vaccines* **15**:765-781.
266. **Demarta-Gatsi C, Smith L, Thiberge S, Peronet R, Commere PH, Matondo M, Apetoh L, Bruhns P, Menard R, Mecheri S.** 2016. Protection against malaria in mice is induced by blood stage-arresting histamine-releasing factor (HRF)-deficient parasites. *J Exp Med* **213**:1419-1428.
267. **Sauerwein RW, Bousema T.** 2015. Transmission blocking malaria vaccines: Assays and candidates in clinical development. *Vaccine* **33**:7476-7482.

268. **Nussenzweig V, Nussenzweig RS.** 1985. Circumsporozoite proteins of malaria parasites. *Cell* **42**:401-403.
269. **Kumar KA, Baxter P, Tarun AS, Kappe SH, Nussenzweig V.** 2009. Conserved protective mechanisms in radiation and genetically attenuated uis3(-) and uis4(-) *Plasmodium* sporozoites. *PLoS One* **4**:e4480.
270. **Pinzon-Ortiz C, Friedman J, Esko J, Sinnis P.** 2001. The binding of the circumsporozoite protein to cell surface heparan sulfate proteoglycans is required for *Plasmodium* sporozoite attachment to target cells. *J Biol Chem* **276**:26784-26791.
271. **Singh AP, Buscaglia CA, Wang Q, Levay A, Nussenzweig DR, Walker JR, Winzeler EA, Fujii H, Fontoura BM, Nussenzweig V.** 2007. *Plasmodium* circumsporozoite protein promotes the development of the liver stages of the parasite. *Cell* **131**:492-504.
272. **Tran TM, Ongoiba A, Coursen J, Crosnier C, Diouf A, Huang CY, Li S, Doumbo S, Doumbo D, Kone Y, Bathily A, Dia S, Niangaly M, Dara C, Sangala J, Miller LH, Doumbo OK, Kayentao K, Long CA, Miura K, Wright GJ, Traore B, Crompton PD.** 2014. Naturally acquired antibodies specific for *Plasmodium falciparum* reticulocyte-binding protein homologue 5 inhibit parasite growth and predict protection from malaria. *J Infect Dis* **209**:789-798.
273. **Payne RO, Silk SE, Elias SC, Miura K, Diouf A, Galaway F, de Graaf H, Brendish NJ, Poulton ID, Griffiths OJ, Edwards NJ, Jin J, Labbe GM, Alanine DG, Siani L, Di Marco S, Roberts R, Green N, Berrie E, Ishizuka AS, Nielsen CM, Bardelli M, Partey FD, Ofori MF, Barfod L, Wambua J, Murungi LM, Osier FH, Biswas S, McCarthy JS, Minassian AM, Ashfield R, Viebig NK, Nugent FL, Douglas AD, Vekemans J, Wright GJ, Faust SN, Hill AV, Long CA, Lawrie AM, Draper SJ.** 2017. Human vaccination against RH5 induces neutralizing antimalarial antibodies that inhibit RH5 invasion complex interactions. *JCI Insight* **2**.
274. **Wright KE, Hjerrild KA, Bartlett J, Douglas AD, Jin J, Brown RE, Illingworth JJ, Ashfield R, Clemmensen SB, de Jongh WA, Draper SJ, Higgins MK.** 2014. Structure of malaria invasion protein RH5 with erythrocyte basigin and blocking antibodies. *Nature* **515**:427-430.
275. **Scheibelhofer S, Chen D, Weiss R, Khan F, Mostbock S, Fegeding K, Leitner WW, Thalhamer J, Lyon JA.** 2001. Removal of the circumsporozoite protein (CSP) glycosylphosphatidylinositol signal sequence from a CSP DNA vaccine enhances induction of CSP-specific Th2 type immune responses and improves protection against malaria infection. *Eur J Immunol* **31**:692-698.
276. **Miyamoto M, Komuro A.** 2017. PACT is required for MDA5-mediated immunoresponses triggered by Cardiovirus infection via interaction with LGP2. *Biochem Biophys Res Commun* **494**:227-233.
277. **Mura M, Combredet C, Najburg V, Sanchez David RY, Tangy F, Komarova AV.** 2017. Nonencapsidated 5' Copy-Back Defective Interfering Genomes Produced by Recombinant Measles Viruses Are Recognized by RIG-I and LGP2 but Not MDA5. *J Virol* **91**.

278. **Gould PS, Easton AJ, Dimmock NJ.** 2017. Live Attenuated Influenza Vaccine contains Substantial and Unexpected Amounts of Defective Viral Genomic RNA. *Viruses* **9**.
279. **Poirier EZ, Vignuzzi M.** 2017. Virus population dynamics during infection. *Curr Opin Virol* **23**:82-87.
280. **Xu J, Sun Y, Li Y, Ruthel G, Weiss SR, Raj A, Beiting D, Lopez CB.** 2017. Replication defective viral genomes exploit a cellular pro-survival mechanism to establish paramyxovirus persistence. *Nat Commun* **8**:799.
281. **Fernandez-Munoz R, Celma ML.** 1992. Measles virus from a long-term persistently infected human T lymphoblastoid cell line, in contrast to the cytocidal parental virus, establishes an immediate persistence in the original cell line. *J Gen Virol* **73 ( Pt 9)**:2195-2202.
282. **Calain P, Monroe MC, Nichol ST.** 1999. Ebola virus defective interfering particles and persistent infection. *Virology* **262**:114-128.
283. **Calain P, Roux L, Kolakofsky D.** 2016. Defective interfering genomes and Ebola virus persistence. *Lancet* **388**:659-660.
284. **Sidhu MS, Crowley J, Lowenthal A, Karcher D, Menonna J, Cook S, Udem S, Dowling P.** 1994. Defective measles virus in human subacute sclerosing panencephalitis brain. *Virology* **202**:631-641.
285. **Beck A, Tesh RB, Wood TG, Widen SG, Ryman KD, Barrett AD.** 2014. Comparison of the live attenuated yellow fever vaccine 17D-204 strain to its virulent parental strain Asibi by deep sequencing. *J Infect Dis* **209**:334-344.
286. **Schrag SJ, Rota PA, Bellini WJ.** 1999. Spontaneous mutation rate of measles virus: direct estimation based on mutations conferring monoclonal antibody resistance. *J Virol* **73**:51-54.
287. **Rima BK, Earle JA, Baczko K, ter Meulen V, Liebert UG, Carstens C, Carabana J, Caballero M, Celma ML, Fernandez-Munoz R.** 1997. Sequence divergence of measles virus haemagglutinin during natural evolution and adaptation to cell culture. *J Gen Virol* **78 ( Pt 1)**:97-106.
288. **Brian DA, Spaan WJM.** 1997. Recombination and coronavirus defective interfering RNAs. *Seminars in Virology* **8**:101-111.
289. **Staheli P, Sutcliffe JG.** 1988. Identification of a second interferon-regulated murine Mx gene. *Mol Cell Biol* **8**:4524-4528.
290. **Siegrist F, Ebeling M, Certa U.** 2011. The small interferon-induced transmembrane genes and proteins. *J Interferon Cytokine Res* **31**:183-197.
291. **Elde NC, Child SJ, Geballe AP, Malik HS.** 2009. Protein kinase R reveals an evolutionary model for defeating viral mimicry. *Nature* **457**:485-489.

292. **Martinez-Gutierrez M, Ruiz-Saenz J.** 2016. Diversity of susceptible hosts in canine distemper virus infection: a systematic review and data synthesis. *BMC Vet Res* **12**:78.
293. **Sarkar J, Balamurugan V, Sen A, Saravanan P, Sahay B, Rajak KK, Rasool TJ, Bhanuprakash V, Singh RK.** 2009. Sequence analysis of morbillivirus CD150 receptor-Signaling Lymphocyte Activation Molecule (SLAM) of different animal species. *Virus Genes* **39**:335-341.
294. **Hughes AL.** 1995. The evolution of the type I interferon gene family in mammals. *J Mol Evol* **41**:539-548.
295. **Duncan CJ, Mohamad SM, Young DF, Skelton AJ, Leahy TR, Munday DC, Butler KM, Morfopoulou S, Brown JR, Hubank M, Connell J, Gavin PJ, McMahon C, Dempsey E, Lynch NE, Jacques TS, Valappil M, Cant AJ, Breuer J, Engelhardt KR, Randall RE, Hambleton S.** 2015. Human IFNAR2 deficiency: Lessons for antiviral immunity. *Sci Transl Med* **7**:307ra154.
296. **Hambleton S, Goodbourn S, Young DF, Dickinson P, Mohamad SM, Valappil M, McGovern N, Cant AJ, Hackett SJ, Ghazal P, Morgan NV, Randall RE.** 2013. STAT2 deficiency and susceptibility to viral illness in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:3053-3058.
297. **Gerlier D.** 2011. Abundance of cellular receptors and functions: Viral receptome? *Virologie* **15**:283-285.
298. **Bunting CH.** 1950. The giant-cells of measles. *Yale J Biol Med* **22**:513-519.
299. **Takeuchi K, Nagata N, Kato SI, Ami Y, Suzaki Y, Suzuki T, Sato Y, Tsunetsugu-Yokota Y, Mori K, Van Nguyen N, Kimura H, Nagata K.** 2012. Wild-type measles virus with the hemagglutinin protein of the edmonston vaccine strain retains wild-type tropism in macaques. *J Virol* **86**:3027-3037.
300. **Lorin C, Segal L, Mols J, Morelle D, Bourguignon P, Rovira O, Mettens P, Silvano J, Dumey N, Le Goff F, Koutsoukos M, Voss G, Tangy F.** 2012. Toxicology, biodistribution and shedding profile of a recombinant measles vaccine vector expressing HIV-1 antigens, in cynomolgus macaques. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **385**:1211-1225.
301. **Rieger T, Merkler D, Gunther S.** 2013. Infection of type I interferon receptor-deficient mice with various old world arenaviruses: a model for studying virulence and host species barriers. *PLoS One* **8**:e72290.
302. **Xie X, Shan C, Shi PY.** 2016. Restriction of Zika Virus by Host Innate Immunity. *Cell Host Microbe* **19**:566-567.
303. **Larocca RA, Abbink P, Peron JP, Zanutto PM, Iampietro MJ, Badamchi-Zadeh A, Boyd M, Ng'ang'a D, Kirilova M, Nityanandam R, Mercado NB, Li Z, Moseley ET, Bricault CA, Borducchi EN, Giglio PB, Jetton D, Neubauer G, Nkolola JP, Maxfield LF, De La Barrera RA, Jarman RG, Eckels KH, Michael NL, Thomas SJ, Barouch DH.** 2016. Vaccine protection against Zika virus from Brazil. *Nature* **536**:474-478.

304. **Stoute JA, Kester KE, Krzych U, Welde BT, Hall T, White K, Glenn G, Ockenhouse CF, Garcon N, Schwenk R, Lanar DE, Sun P, Momin P, Wirtz RA, Golenda C, Slaoui M, Wortmann G, Holland C, Dowler M, Cohen J, Ballou WR.** 1998. Long-term efficacy and immune responses following immunization with the RTS,S malaria vaccine. *J Infect Dis* **178**:1139-1144.
305. **Wykes MN, Good MF.** 2008. What really happens to dendritic cells during malaria? *Nat Rev Microbiol* **6**:864-870.
306. **Liu XQ, Stacey KJ, Horne-Debets JM, Cridland JA, Fischer K, Narum D, Mackay F, Pierce SK, Wykes MN.** 2012. Malaria infection alters the expression of B-cell activating factor resulting in diminished memory antibody responses and survival. *Eur J Immunol* **42**:3291-3301.
307. **Vabret N, Bailly-Bechet M, Lepelley A, Najburg V, Schwartz O, Verrier B, Tangy F.** 2014. Large-scale nucleotide optimization of simian immunodeficiency virus reduces its capacity to stimulate type I interferon in vitro. *J Virol* **88**:4161-4172.
308. **Wirtz RA, Ballou WR, Schneider I, Chedid L, Gross MJ, Young JF, Hollingdale M, Diggs CL, Hockmeyer WT.** 1987. Plasmodium falciparum: immunogenicity of circumsporozoite protein constructs produced in Escherichia coli. *Exp Parasitol* **63**:166-172.
309. **Brandler S, Lucas-Hourani M, Moris A, Frenkiel MP, Combredet C, Fevrier M, Bedouelle H, Schwartz O, Despres P, Tangy F.** 2007. Pediatric measles vaccine expressing a dengue antigen induces durable serotype-specific neutralizing antibodies to dengue virus. *PLoS Negl Trop Dis* **1**:e96.
310. **Mettens P, Dubois PM, Demoitie MA, Bayat B, Donner MN, Bourguignon P, Stewart VA, Heppner DG, Jr., Garcon N, Cohen J.** 2008. Improved T cell responses to Plasmodium falciparum circumsporozoite protein in mice and monkeys induced by a novel formulation of RTS,S vaccine antigen. *Vaccine* **26**:1072-1082.
311. **Waldmann H.** 1989. Manipulation of T-cell responses with monoclonal antibodies. *Annu Rev Immunol* **7**:407-444.
312. **John CC, Moormann AM, Pregibon DC, Sumba PO, McHugh MM, Narum DL, Lanar DE, Schluchter MD, Kazura JW.** 2005. Correlation of high levels of antibodies to multiple pre-erythrocytic Plasmodium falciparum antigens and protection from infection. *Am J Trop Med Hyg* **73**:222-228.
313. **Li X, Huang J, Zhang M, Funakoshi R, Sheetij D, Spaccapelo R, Crisanti A, Nussenzweig V, Nussenzweig RS, Tsuji M.** 2016. Human CD8+ T cells mediate protective immunity induced by a human malaria vaccine in human immune system mice. *Vaccine* **34**:4501-4506.
314. **Schwartz JL.** 2012. The first rotavirus vaccine and the politics of acceptable risk. *Milbank Q* **90**:278-310.
315. **Spring M, Polhemus M, Ockenhouse C.** 2014. Controlled human malaria infection. *J Infect Dis* **209 Suppl 2**:S40-45.

# ANNEXES

# ANNEXE



# Comparative analysis of viral RNA signatures on different RIG-I-like receptors

Raul Y Sanchez David<sup>1,2</sup>, Chantal Combredet<sup>1</sup>, Odile Sismeiro<sup>3</sup>, Marie-Agnès Dillies<sup>3</sup>, Bernd Jagla<sup>3</sup>, Jean-Yves Coppée<sup>3</sup>, Marie Mura<sup>1,4</sup>, Mathilde Guerbois Galla<sup>1†</sup>, Philippe Despres<sup>5</sup>, Frédéric Tangy<sup>1\*</sup>, Anastassia V Komarova<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Unité de Génomique Virale et Vaccination, Institut Pasteur, CNRS UMR-3569, Paris, France; <sup>2</sup>Ecole doctorale, Biochimie, Biothérapies, Biologie Moléculaire et Infectiologie (B3MI), Université Paris Diderot - Paris 7, Paris, France; <sup>3</sup>Transcriptome and Epigenome, BioMics Pole, Center for Innovation and Technological Research, Institut Pasteur, Paris, France; <sup>4</sup>Unité Interactions Hôte-Agents Pathogènes, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Brétigny-sur-Orge, France; <sup>5</sup>Technology Platform CYROI, University of Reunion Island, Saint-Clotilde, France

**Abstract** The RIG-I-like receptors (RLRs) play a major role in sensing RNA virus infection to initiate and modulate antiviral immunity. They interact with particular viral RNAs, most of them being still unknown. To decipher the viral RNA signature on RLRs during viral infection, we tagged RLRs (RIG-I, MDA5, LGP2) and applied tagged protein affinity purification followed by next-generation sequencing (NGS) of associated RNA molecules. Two viruses with negative- and positive-sense RNA genome were used: measles (MV) and chikungunya (CHIKV). NGS analysis revealed that distinct regions of MV genome were specifically recognized by distinct RLRs: RIG-I recognized defective interfering genomes, whereas MDA5 and LGP2 specifically bound MV nucleoprotein-coding region. During CHIKV infection, RIG-I associated specifically to the 3' untranslated region of viral genome. This study provides the first comparative view of the viral RNA ligands for RIG-I, MDA5 and LGP2 in the presence of infection.

DOI: [10.7554/eLife.11275.001](https://doi.org/10.7554/eLife.11275.001)

\*For correspondence: ftangy@pasteur.fr (FT); stasy@pasteur.fr (AVK)

Present address: <sup>†</sup>University of Texas Medical Branch, Galveston, United States

Competing interests: The authors declare that no competing interests exist.

Funding: See page 23

Received: 01 September 2015

Accepted: 24 March 2016

Published: 24 March 2016

Reviewing editor: Xuetao Cao, Zhejiang University School of Medicine, China

© Copyright Sanchez David et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

## Introduction

Because of increasing global population and worldwide exchanges, infections by RNA viruses are expanding with a huge impact on public health. New infections are emerging almost every year (pandemic flu, West Nile encephalitis, Severe Acute Respiratory Syndrome, Middle East Respiratory Syndrome, chikungunya, Ebola), tropical fevers are expanding (dengue, zika) and even previously controlled diseases are re-emerging (measles, poliomyelitis). Although several efficient vaccines against RNA viruses are used in human medicine, we still lack potent therapeutic treatments for the majority of viral infections as well as rational strategies to create efficient new vaccines. Recent progress in our understanding of cellular pathways controlling viral replication suggests that modulating host cell functions early upon viral infection could inhibit a large panel of RNA viruses ([Cheng et al., 2011](#); [Shirey et al., 2011](#); [Es-Saad et al., 2012](#); [Guo et al., 2012](#); [Lucas-Hourani et al., 2013](#)). The RIG-I-like receptors (RLRs) appear to be located at the frontline of the evolutionary race between viruses and the host immune system ([Vasseur et al., 2011](#)). These are cellular proteins that detect invasion of viral nucleic acid species inside the cytoplasm and initiate innate immune responses against viral infections that limit virus replication and trigger an adequate adaptive immune response

**eLife digest** An immune system can protect against disease-causing microbes such as viruses. Human cells contain three different receptors that can recognize and respond when a virus enters and begins to replicate inside. These receptors include RIG-I, MDA5 and LGP2, and they are collectively known as the RIG-I-like receptors. RIG-I-like receptors specifically recognize viruses that store their genetic material in the form of molecules of RNA. However, the specific viral parts that trigger RIG-I-like receptors to respond remain almost completely unknown.

RNA viruses include well-known and re-emerging viruses such as polio and measles, as well as chikungunya – a virus that is spread by mosquitoes and causes illness worldwide. This means that understanding how RIG-I-like receptors identify RNA viruses and then trigger an immune response to eradicate them has the potential to inform the development of vaccines and antiviral therapies for many diseases.

Sanchez David et al. now describe and validate a new experimental approach to determine the distinct viral regions that are recognized by human RIG-I-like receptors. The approach involves purifying the RIG-I-like receptors out of infected cells and then working out the sequence of RNA fragments that bind to the receptors. This approach revealed that each of the three human RIG-I-like receptors detected different viral RNA sequences during a measles infection. On the other hand, only RIG-I could recognize a specific part of the chikungunya virus genome.

All together, the experiments illustrate how to identify the RNA sequences recognized by any of the three human RIG-I-like receptors during infection by a RNA virus. With the ability to gain this kind of insight, it may soon be possible to develop ways of using the RIG-I-like receptor pathway to control viral infections and enhance the body's immune response to vaccination.

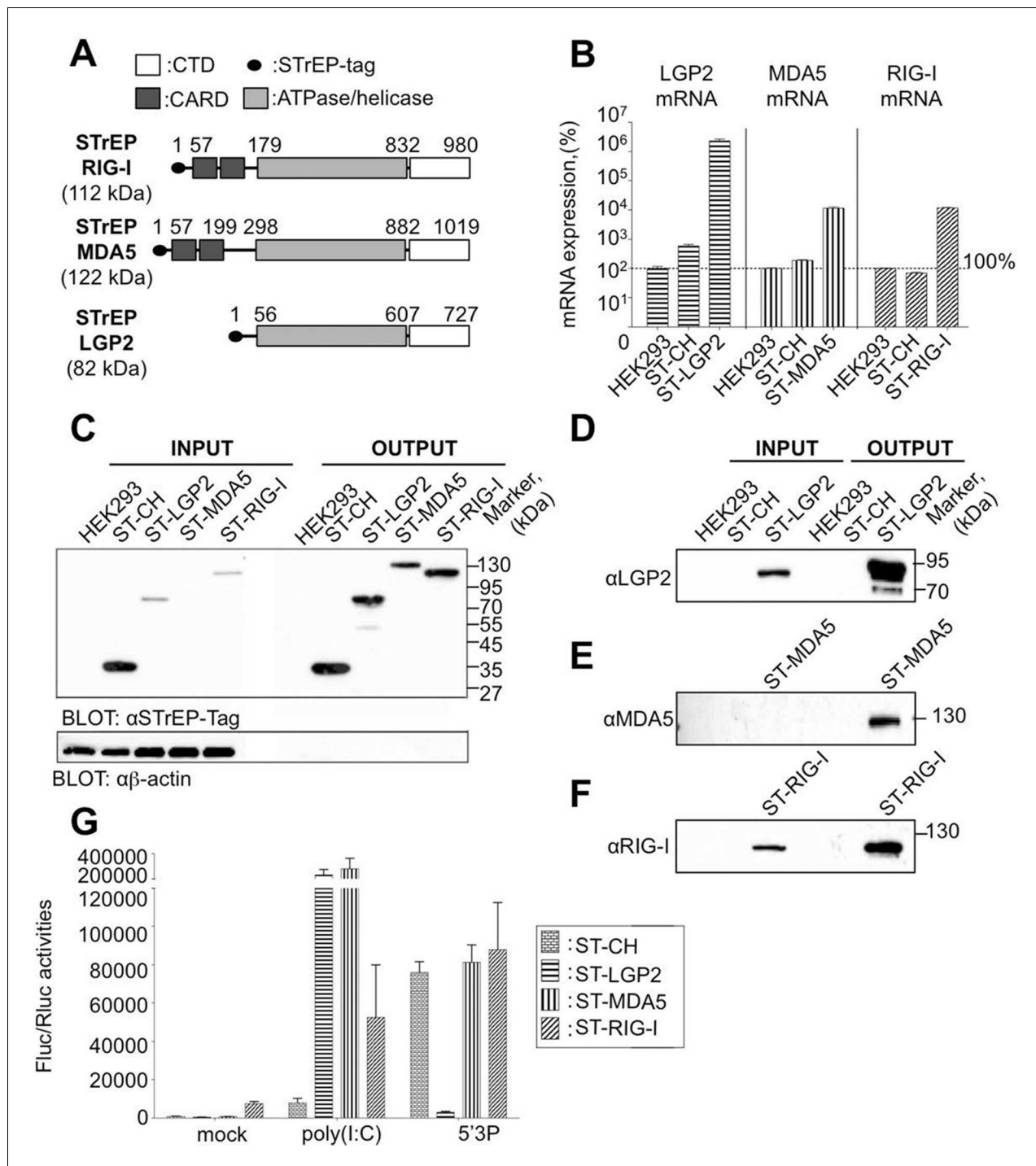
DOI: [10.7554/eLife.11275.002](https://doi.org/10.7554/eLife.11275.002)

---

(**Errett and Gale, 2015**). RLR signalling operates ubiquitously. Hence, RLRs represent attractive strategies for antiviral therapy and vaccine development.

The RLR family of pattern recognition receptors (PRRs) is a group of cytosolic RNA helicases that can identify viral RNA as non-self *via* binding to pathogen-associated molecular pattern (PAMP) motifs. To date three RLR members have been identified: RIG-I (Retinoic acid-Inducible Gene-I), MDA5 (Melanoma-Differentiation-Associated gene 5), and LGP2 (Laboratory of Genetics and Physiology 2) (reviewed in [**Loo and Gale, 2011; Dixit and Kagan, 2013**]). They share a number of structural similarities including their organization into three distinct domains (**Figure 1A**): i) an N-terminal region consisting of tandem caspase activation and recruitment domains (CARD), ii) a central DExD/H box RNA helicase domain with the capacity to hydrolyze ATP and to bind RNA, and iii) a repressor domain (RD) embedded within the carboxy-terminal domain (CTD). These RNA helicases interact with particular signatures of viral RNA, most of which are still unknown. Upon ligand recognition, RLRs bearing the CARD domain (MDA5 and RIG-I), undergo a conformational change that permits the CARD domain to be recruited and to oligomerize with MAVS either in the peroxisome or the mitochondrion. This activates signalling pathways leading to translocation of the transcription factors IRF3, IRF7 and NF- $\kappa$ B into the nucleus to initiate expression and secretion of type I IFNs and other proinflammatory cytokines. Secreted type I IFNs bind to their receptors and activate the JAK/STAT signalling pathway inducing the expression of more than 300 IFN-stimulated genes (ISGs) bearing IFN-stimulated response elements (ISREs) (**de Veer et al., 2001**). If the virus has no means for subverting the interferon pathway, the infected tissue turns into an antiviral state leading to i) apoptosis of the infected cells, ii) limited propagation of the virus by the expression of ISGs in neighbouring cells and iii) generation of a cytokine storm that triggers the specific adaptive immune response as well as favouring immune cell infiltration from the cardiovascular system.

Members of the RLR family have been implicated in the recognition of a variety of viruses (**Dixit and Kagan, 2013; Goubau et al., 2013; Patel and Garcia-Sastre, 2014**). RIG-I confers recognition of hepaciviruses and of members of the *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, and *Orthomyxoviridae* families. For example, 5'copy-back defective-interfering (DI) genomes produced by numerous negative-sense RNA viruses specifically associate with RIG-I and activate IFN induction (**Strahle et al., 2006; Baum et al., 2010; Komarova et al., 2013; Runge et al., 2014**). MDA5



**Figure 1.** Rlg-I Like Receptor (RLR) gene expression in stable cell lines encompassing ST-RLRs. (A) Schematic representation of the protein domains for each RLR. Domain boundaries are indicated for human RIG-I, MDA5, and LGP2 proteins according to InterPro (www.ebi.ac.uk/interpro). (B) LGP2, MDA5 and RIG-I mRNA levels in ST-RLR cells. RLR mRNA expression were calculated by relative RT-qPCR using specific probes for LGP2, MDA5 or RIG-I (on 100 ng of total RNA). Ct were normalized using a specific probe against GAPDH house keeping gene. Percentage of mRNA expression was done by setting HEK293 cells as 100% of gene expression for each probe. Samples were analyzed in triplicates with standard deviation represented on the figure. (C–F) Analysis of RLR protein expression in ST-RLR cells and efficiency of tagged RLR purification by affinity chromatography. ST-RLR cell lysates (INPUT) were affinity-purified using STrEP-Tactin beads (OUTPUT). Western blot analysis was performed using (C) α-StrEP-Tag, (D) anti-LGP2, (E) anti-MDA5 or (F) anti-RIG-I antibodies. (G) IFNβ promoter activity assay in ST-RLR cells. Cells were transfected with pIFNβ-FLuc, pTK-Rluc and either mock, poly(I:C) or 5'3P.

DOI: 10.7554/eLife.11275.003

detects members of the *Picornaviridae*, *Caliciviridae*, and *Coronaviridae*. *Flaviviridae*, *Reoviridae*, and *Arenaviridae* are detected by both MDA5 and RIG-I. LGP2 can act both positively or negatively upon activation by different viruses (Moresco and Beutler, 2010; Deddouche et al., 2014). Several DNA viruses have also been reported to activate the RLR pathway, including Herpes simplex virus-1, Adenovirus, Epstein-Barr virus, Vaccinia virus and Hepatitis B virus (Choi et al., 2009; Sato et al., 2014). In the case of DNA viruses, poly dA:dT DNA sequences trigger IFN responses after RNA polymerase III transcription and detection by RIG-I (Ablasser et al., 2009; Chiu et al., 2009). Surprisingly, intracellular bacteria, *Listeria monocytogenes*, *Legionella pneumophila*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* also activate type I IFN responses through RIG-I signalling and *Plasmodium* RNAs are sensed by MDA5 during malaria infection (Chiu et al., 2009; Monroe et al., 2009; Liehl et al., 2013; Patel and Garcia-Sastre, 2014).

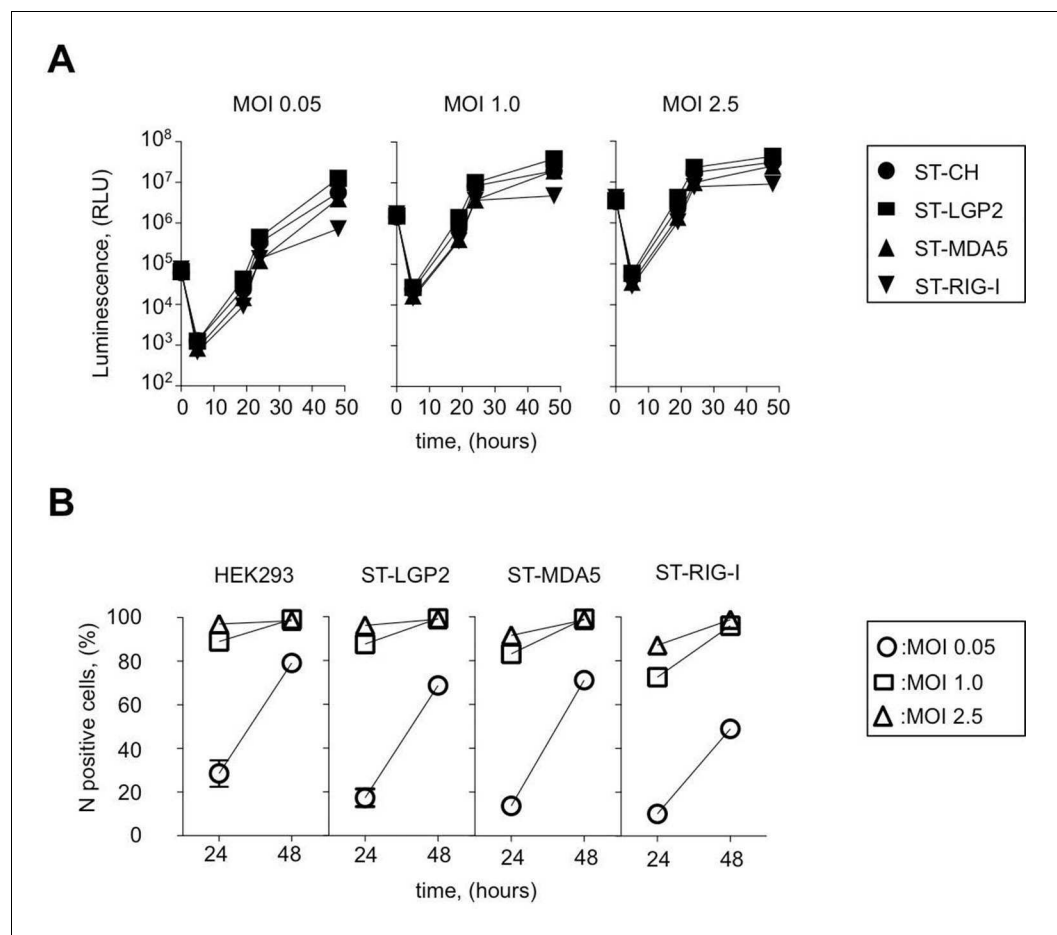
Although human RLRs have recently received considerable attention, to our knowledge, nobody has yet simultaneously explored viral RNA partners that bind the three known RLRs under the same experimental conditions. In addition, only few studies characterised molecular features of the RLR ligands in the presence of viral infection (Baum et al., 2010; Deddouche et al., 2014; Runge et al., 2014). Thus, it is difficult from existing observations to get a clear picture of i) the biological ligands for each of the RLRs and ii) the functional differences between RLRs.

To study virus-host RNA-protein interactions during viral infection, we previously developed and validated a high-throughput riboproteomic approach based on One-STrEP-tagged protein affinity purification and next-generation sequencing (NGS) (Komarova et al., 2013). This protocol allows exploring biologically active macromolecular complexes within infected cells. Here, we applied this method to study viral RNA signatures sensed by RIG-I, MDA5 and LGP2 cytosolic receptors upon infection with both negative- and positive-sense RNA viruses. Such study provides a better understanding of the mechanisms and roles of RLR associated RNAs. It helps to conceive new therapeutic approaches such as modulators of innate immunity or new vaccine adjuvants.

## Results

### Generation of stable cell lines expressing One-STrEP-tagged RIG-I, MDA5 and LGP2

To identify and compare RLRs viral RNA partners upon infection with different viruses, we generated human HEK293 cell lines stably expressing One-STrEP-tagged LGP2, or MDA5, or RIG-I proteins (Figure 1A). One-STrEP tag provides a reliable, rapid and efficient protocol for ribonucleoprotein (RNP) and protein complexes purification (Komarova et al., 2011; 2013). We tagged the RLRs N-terminally since previous studies have shown that adding N-terminal tags to RLRs had no negative effect on functional interactions with their RNA ligands (Pichlmair et al., 2009; Rehwinkel et al., 2010; Zhang et al., 2013a; Deddouche et al., 2014). These cell lines were assigned ST-RLR cells (ST-LGP2, ST-MDA5 and ST-RIG-I, respectively). In addition, a stable cell line (assigned ST-CH) expressing the Cherry protein instead of tagged RLRs was generated as a negative control to allow subtraction of non-specific RNA binding. Using RT-qPCR analysis and affinity purification followed by western blot analysis we validated the expression of tagged RLRs by each stable cell line (Figure 1B–F). We then analysed the functional profiles of the ST-RLR cell lines upon transfection with RIG-I and MDA5 agonists by using a classical IFN- $\beta$  promoter activity assay (Figure 1G). We observed that transfection of ST-MDA5 and ST-LGP2 cells with MDA5 agonist poly(I:C) elicited an increased IFN-I response. In contrast, transfection of ST-LGP2 cells with the RIG-I agonist 5'triphosphate-RNA (5'3P) masked the IFN-I response (Figure 1G). These observations are in accordance with previous studies showing that over-expression of MDA5 or simultaneous co-expression of MDA5 and LGP2 synergize type I IFN response upon activation with MDA-specific agonists or upon infection with encephalomyocarditis virus (EMCV) (Brunns et al., 2013). LGP2 over-expression has also been previously found to inhibit RIG-I signalling (Moresco and Beutler, 2010). Altogether this demonstrates that the three stable cell-lines that we established express tagged RLRs that are functional and can be purified by affinity chromatography.



**Figure 2.** Efficiency of ST-RLR cells infection by negative-sense RNA virus (MV). (A) Efficiency of Fluc (rMV2/Fluc) expressing MV replication in ST-RLR cells. ST-RLR cells were infected with the rMV2/Fluc (MOIs: 0.05, 1, 2.5). Luc activity was analyzed 5, 19, 24 and 48 hr post-infection. (B) Efficiency of MV replication in ST-RLR analyzed by FACS. ST-RLR cells were infected by MV. After 24 and 48 hr, cells were harvested, fixed and stained using an anti-N antibody to measure percentage of N positive cells. Experiments were performed two times and data represent means  $\pm$  SD of the technical triplicates of the most representative experiment.

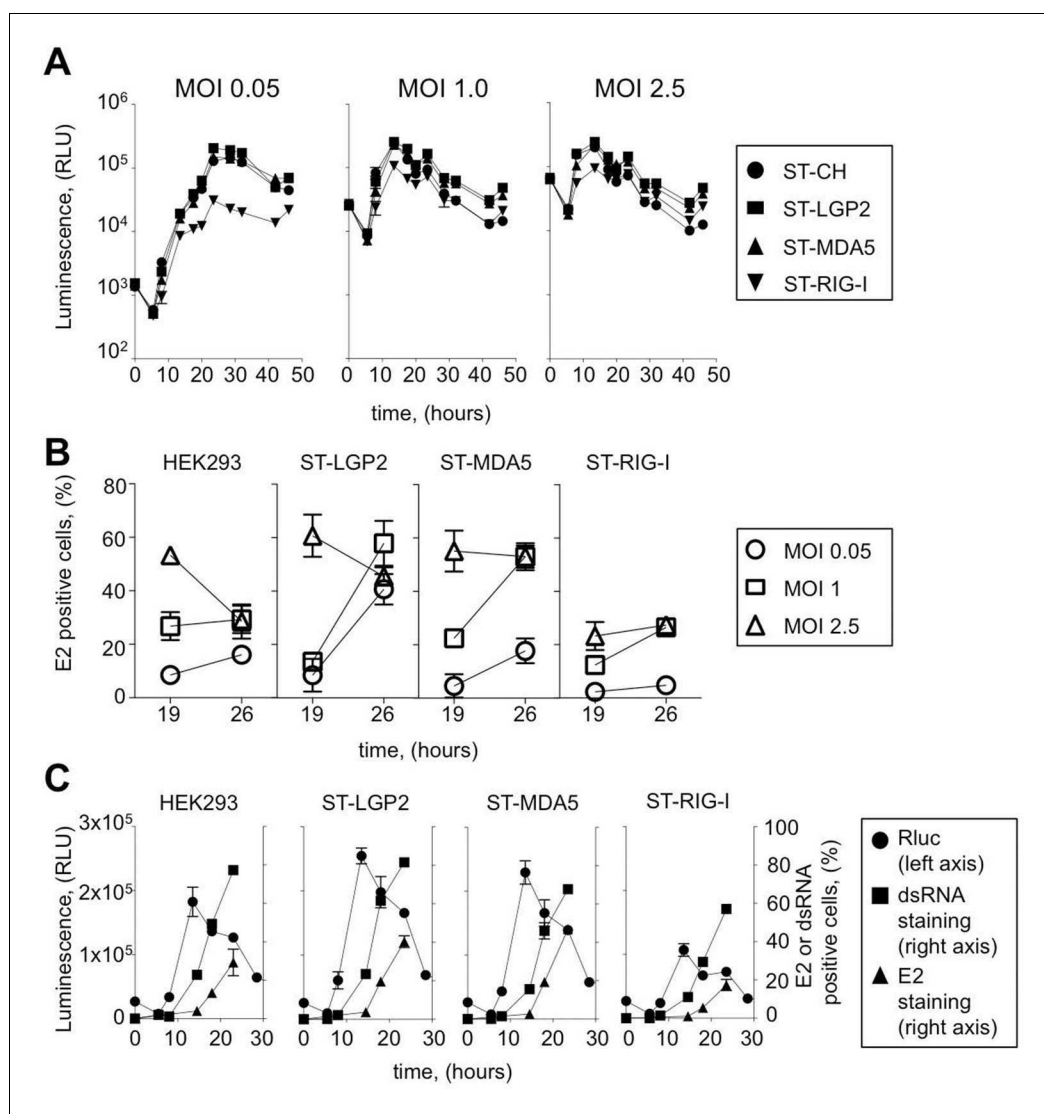
DOI: [10.7554/eLife.11275.004](https://doi.org/10.7554/eLife.11275.004)

## RNA virus replication in cells expressing tagged RLRs

To test whether the over-expression of RLRs influences the efficiency of RNA virus replication we infected ST-RLR stable cell lines with a representative of negative- or positive-sense RNA virus: measles virus (MV) and chikungunya virus (CHIKV), respectively.

MV belongs to the family *Paramyxoviridae* (order *Mononegavirales*) and is often considered as a prototypical member of negative-sense RNA viruses. MV genome is used as a template by the viral polymerase to replicate viral genome and to synthesize mRNA molecules encoding six structural proteins: N, P, M, F, H, L and two non-structural virulence factors: V and C. To determine the kinetics of MV replication in ST-RLR cells we used recombinant MV expressing the *Firefly luciferase* (*Fluc*) gene from the viral genome (rMV2-Fluc [Komarova et al., 2011]). We observed that at low multiplicity of infection (MOI) MV replication was slightly less efficient in ST-RIG-I cells than in the two other cell lines ST-MDA5 and ST-LGP2 (Figure 2A). MV replication was also monitored by immunostaining of MV nucleoprotein (MV-N) and flow cytometry analysis at 24 and 48 hr post-infection (Figure 2B). Again, we observed that viral replication was slightly reduced in cells expressing an additional copy of RIG-I protein, particularly at low MOIs.

CHIKV is a member of the family *Togaviridae* with a positive-sense single-stranded RNA genome. Non-structural proteins (NSP1-4) are directly translated from the viral genome (49S) at early stage of viral replication, whereas structural proteins C-E3-E2-6K-E1 (capsid C, envelope glycoproteins E3, E2



**Figure 3.** Efficiency of ST-RLR cells infection by positive-sense RNA viruses (CHIKV). (A) Replication efficiency of CHIKV-Rluc in ST-RLR cells. ST-RLR cells were infected with a CHIKV-Rluc (MOIs: 0.05, 1, 2.5). renLuc activity was analyzed 0, 5, 8, 10, 13, 19, 24, 32 and 40 hr post-infection. (B) Efficiency of CHIKV replication in ST-RLR cells analysed by FACS. ST-RLR cells were infected with wt CHIKV (MOIs: 0.05, 1, 2.5). Immunostaining of the E2 glycoprotein was performed and percentage of positive cells was determined. (C) Analysis of early and late steps of CHIKV replication. ST-RLR cells were infected with CHIKV-Rluc or wt CHIKV at an MOI 1. Rluc activity was measured for the CHIKV-Rluc infection (left axis) 6, 9, 15, 18, 23 and 28 hr post-infection. wt CHIKV-infected cells were harvested 6, 9, 15, 18 and 23 hr post-infection, stained with an antibody recognizing double stranded RNA or E2 (right axis) and percentage of positive stained cells was determined by FACS. Experiments were performed two times and data represent means  $\pm$  SD of the technical triplicates of the most representative experiment.

DOI: [10.7554/eLife.11275.005](https://doi.org/10.7554/eLife.11275.005)

The following figure supplement is available for figure 3:

**Figure supplement 1.** Experimental approaches used to determine early and late steps of CHIKV replication.

DOI: [10.7554/eLife.11275.006](https://doi.org/10.7554/eLife.11275.006)

and E1 and the ion channel protein 6K) are encoded by subgenomic mRNA (26S mRNA) during the late viral cycle. To assess CHIKV replication kinetics in tagged RLR cell lines we used a molecular clone of CHIKV (CHIKV-Rluc) at different MOI: 0.05, 1, 2.5. In this virus the reporter *Renilla* luciferase (*Rluc*) gene is expressed as an integrated part of the non-structural polyprotein of CHIKV. The

CHIKV-Rluc allows monitoring the early stage of viral replication (*Henrik Gad et al., 2012*). CHIKV-Rluc replicated in the 4 cell lines as detected by strong Rluc expression and classical growth kinetics for this virus (*Figure 3A*). However, similarly to MV we observed that CHIKV replication was reduced at low MOI in ST-RIG-I cells. This observation was confirmed by measuring the accumulation of E2 glycoprotein, a late viral product, in ST-RLR cells during infection with wt CHIKV. Again, viral replication was delayed in cells expressing an additional copy of RIG-I protein (*Figure 3B*).

These experiments demonstrate that both negative- and positive-sense RNA viruses replicate in cells expressing additional copies of tagged RLRs. Thus, ST-RLR cells provide suitable conditions to study RNA ligands of RLRs within infected cells.

### Choice of the best time point to purify RLR-associated viral RNA ligands

As showed on *Figure 2B* all three ST-RLRs were efficiently infected with MV (MOI 1) at 24 hr post-infection (with more than 60% of MV-N positive cells). We have previously observed extremely valuable virus-host interaction networks in the same conditions of infection (*Komarova et al., 2011*). Therefore, we choose these conditions to purify RLR proteins complexed with MV RNA ligands.

In the case of CHIKV infection, we distinguished early and late stages of virus replication. Indeed, it is believed that at early stage of the viral cycle dsRNA intermediary products are sensed by RLR receptors to activate type I IFN signalling. CHIKV non-structural proteins translation and viral genome replication are performed at early steps of replication. This stage can be monitored using CHIKV-Rluc. We observed Rluc accumulation starting from 8 hr post-infection in the ST-RLR and in ST-CH cells (*Figure 3A and C* left axis). In addition, dsRNA presence was assessed in cells infected with wt CHIKV by using intracellular staining with an anti-dsRNA antibody and flow cytometry analysis. We observed dsRNA accumulation starting from 10 hr post-infection (*Figure 3C* right axis). Further, efficient translation of the structural E2 glycoprotein that corresponded to the late stage of CHIKV replication was observed at 15 hr post-infection in all three ST-RLR cell lines (*Figure 3B and C* right axis). Schematic representation of the three technical approaches is represented (*Figure 3—figure supplement 1*). These experiments showed that purification of CHIKV RNA ligands complexed with RLRs should be performed between 10 and 15 hr post-infection with CHIKV at MOI of 1 (*Figure 3C*).

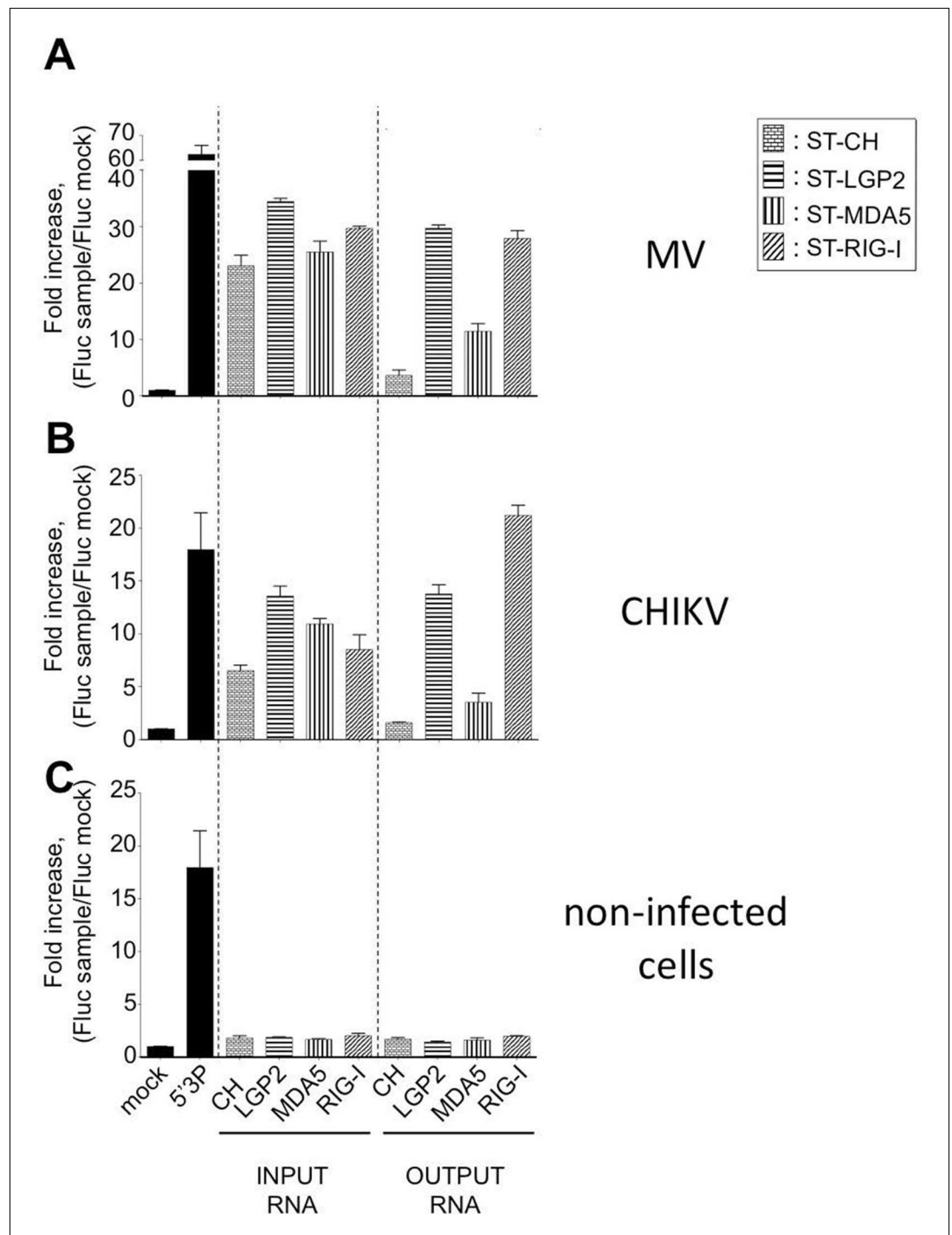
### RNAs purified from tagged RLRs upon infection with MV and CHIKV are immunoactive

To purify the RNAs associated with RLRs upon infection with negative- or positive-sense RNA viruses, ST-RLRs cells were infected with MV or with CHIKV at MOI1. Cells were harvested 24 hr (MV) and 13 hr (CHIKV) post-infection and RLRs together with associated partners were purified from total cell lysates by affinity chromatography (see Materials and methods). The RNA molecules interacting with RLRs or the negative control CH were then extracted and designated as RLR/RNA or the negative control CH/RNA.

We tested the capacity of these RNA molecules to induce an IFN-mediated antiviral response. RNA samples extracted from LGP2, MDA5, RIG-I or CH were transfected into STING-37 reporter cells that stably express the *Fluc* gene under the control of a promoter sequence containing five IFN-Stimulated Response Elements (ISRE) (*Lucas-Hourani et al., 2013*). We observed that RNA ligands purified from LGP2 and RIG-I receptors in the presence of MV or CHIKV infections had an increased immunostimulatory activity in comparison with MDA5-specific RNA ligands (*Figure 4A and B*). As expected, RNAs purified from negative control CH provided poor immunostimulatory activity in the same experimental setup as well as RNA purified from RLR complexes in the absence of a viral infection (*Figure 4*). These results demonstrate that RNA ligands bound to ST-RLRs are specifically enriched for immunoactive RNA molecules, and that our experimental strategy is sensitive enough for the isolation of RLR-specific RNA ligands for both negative- and positive-sense RNA viruses within infected cells.

### RLR-dependent innate immune sensing of MV and CHIKV infections

To further evaluate the requirement of LGP2, MDA5 and RIG-I for IFN response to MV and CHIKV, we depleted STING-37 cells of LGP2, or MDA5, or RIG-I via transduction with lentiviral vectors

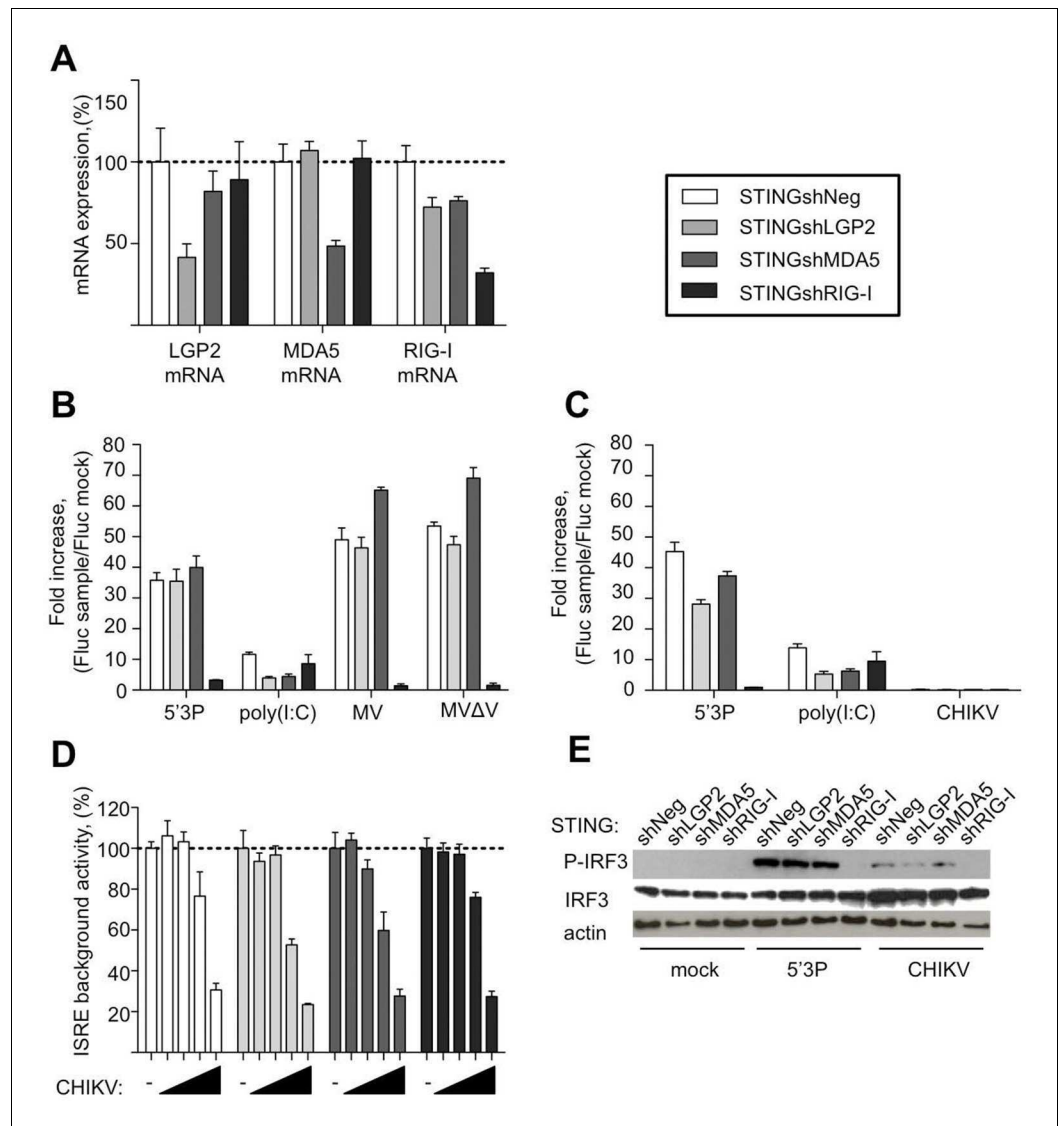


**Figure 4.** Immunostimulatory activity of RNA-ligands co-purified with ST-RLRs upon infection with MV and CHIKV. ST-RLR cells were infected with MV for 24 hr (A), CHIKV for 13 hr (B) or mock infected (C). Total cell lysate was used for total RNA purification (INPUT) and for affinity purification of RLR RNA complexes, followed by RNA extraction (OUTPUT). Immunostimulatory activity was assessed by transfection into STING-37 reporter cell lines (Lucas-Hourani et al., 2013). Fluc activity was measured and normalised to mock transfected cells, 5'3P was used as a positive control. Experiments were performed two times and data represent means  $\pm$  SD of the technical triplicates of the most representative experiment.

DOI: 10.7554/eLife.11275.007



expressing shRNA against each of these receptors or with a control shRNA. The level of LGP2, MDA5, or RIG-I mRNAs in puromycin-resistant transduced cell populations was assessed by quantitative RT-qPCR. Silencing decreased LGP2, MDA5 and RIG-I levels to 41%, 48% and 32%, respectively (**Figure 5A**). These cells were assigned STINGshLGP2, STINGshMDA5, STINGshRIG-I and STINGshNeg, respectively (see Materials and methods).



**Figure 5.** Innate sensing of MV and CHIKV infections by different RLRs. (A) LGP2, MDA5 and RIG-I mRNA levels in STINGshRLR cells. STING-37 reporter cell line was transduced by lentiviral vectors expressing an shRNA directed against either LGP2 (shLGP2), or MDA5 (shMDA5), or RIG-I (shRIG-I), or non-silencing (shNeg). qPCR analyses with specific probes against the mRNA of each of the RLRs were performed. Relative mRNA expression was done using GAPDH as reference gene and shNeg as reference sample. ISRE activation in STINGshRLR cells by MV or MVΔV (B) or CHIKV (C) infection. 5'3P and poly(I:C) were used as controls. Results are represented as fold increase of ISRE expression compared to mock infected cells. (D) Analysis of STINGshRLR promoter activity in the presence of different loads of CHIKV. MOIs 0; 0.001; 0.01; 0.1 and 1 were used. Fluc activity was measured 13 hr post-infection and normalized by setting MOI 0 as 100% of ISRE background activity for the corresponding cell line. (E) RLR-dependent IRF3 phosphorylation upon CHIKV infection. IRF3 phosphorylation was analysed in STINGshRLR cells after CHIKV infection by Western Blot using a specific antibody recognizing the phosphorylated form of IRF3. Experiments were performed three times and data represent means  $\pm$  SD of the technical triplicates of the most representative experiment.

DOI: [10.7554/eLife.11275.008](https://doi.org/10.7554/eLife.11275.008)

Upon MV infection only the cells that had RIG-I receptor silenced were strongly impaired in ISRE promoter activation, while MDA5 and LGP2 silencing did not affect signalling (**Figure 5B**). This was independent of the MV-V protein, which is known to subvert the RLR response through interaction with MDA5 and LGP2 (**Andrejeva et al., 2004; Childs et al., 2013; Motz et al., 2013**), as MVΔV virus deleted of the V protein behave similarly.

Upon CHIKV infection, we failed to detect any activation of ISRE promoter in the conditions previously established at 13 hr post-infection (**Figure 5C**). Further analysis showed that increasing CHIKV MOI reduced *Fluc* expression under the control of ISRE promoter in all silenced cell lines, even at early time post-infection (**Figure 5D**). Old-world alphaviruses are known to shutdown transcription in infected cells (**Garmashova et al., 2006; White et al., 2011; Akhrymuk et al., 2012; Bourai et al., 2012**). However, CHIKV infection induces IRF3 phosphorylation and nuclear translocation (**White et al., 2011**). Therefore, we used western blot analysis of RLR-dependent type I IFN signalling to evaluate IRF3 phosphorylation in CHIKV-infected STINGshRLR cells. Interestingly, we observed that only in cells deficient in RIG-I, IRF3 was no longer phosphorylated (**Figure 5E**).

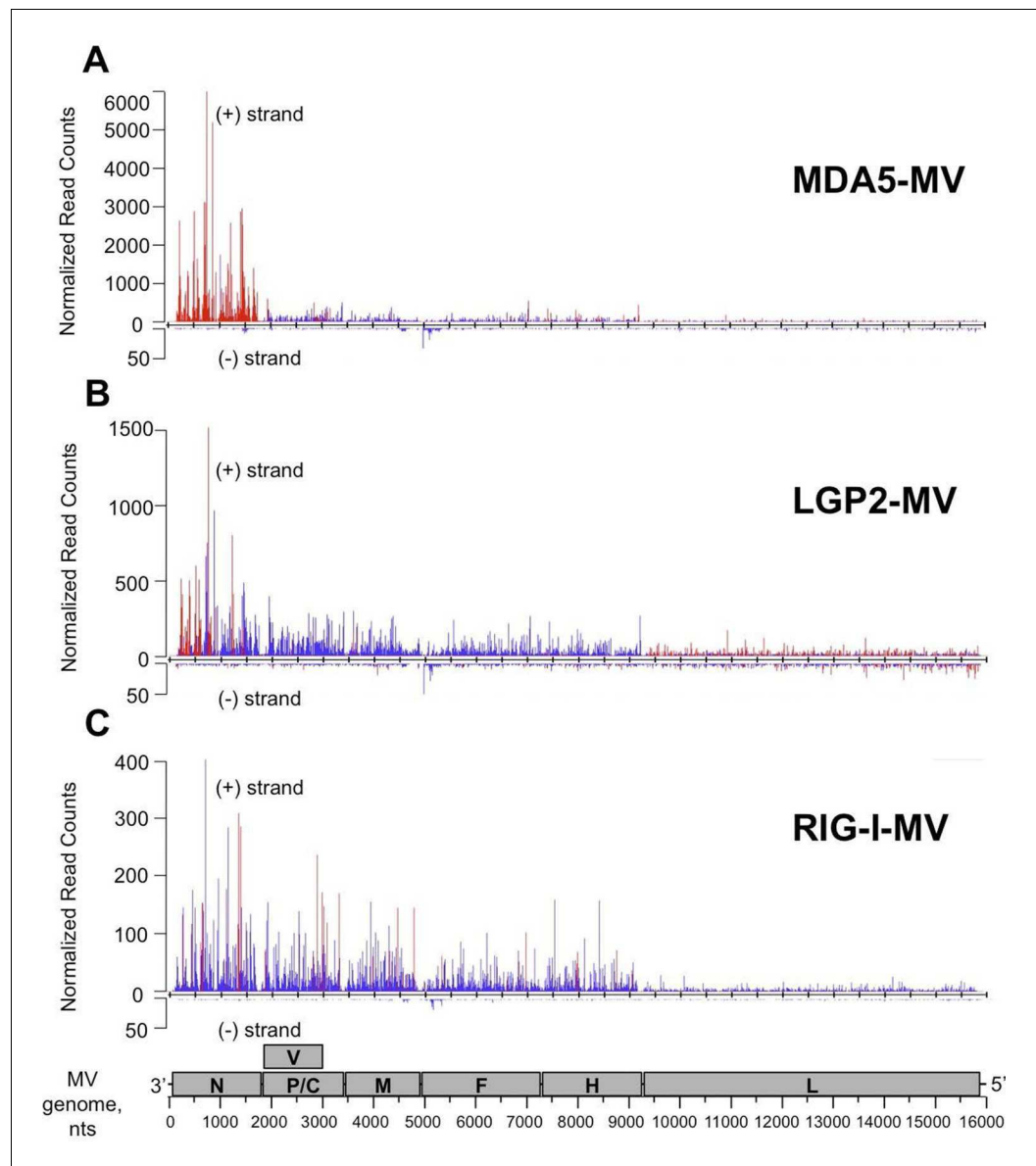
These data validated the important role of RIG-I in viral sensing for both MV and CHIKV infections. Using this experimental set up we failed to validate LGP2 and MDA5 implication in type I IFN activation. These results contradict the fact that immunoactive RNA ligands were co-purified with LGP2 from either MV- or CHIKV-infected cells and MDA5/RNAs possessed only slight immunostimulatory activity (**Figure 4A,B**). To clarify this question we proceeded to the NGS of RLR-associated RNAs.

### NGS analysis reveals that distinct regions of MV genome are specifically recognized by distinct RLRs

To identify the nature of RNA molecules bound to RLRs in an unbiased manner, strand-specific NGS analysis was performed using the Illumina technology. To distinguish between RLR-associated RNA molecules and non-specific binding to the beads, co-affinity purification experiments were performed in parallel on ST-CH cells. All experiments were performed in triplicates. Approximately, 16 million reads of 51 nucleotides in length were obtained from each sequencing sample and were mapped to the viral genome. This gave MV genome coverage ranging from 274X to 2433X. We also performed NGS analysis of total RNA samples. Total RNA results provided a classical example of the transcription gradient, which is the characteristic of the order *Mononegavirales*. Indeed, MV transcription is initiated from a single promoter at the 3' end of the genome and at each gene junction the virus RNA-dependent RNA-polymerase either falloff or continue the transcription of the downstream gene (**Cattaneo et al., 1987; Plumet et al., 2005**). Due to this gradient of transcription, MV promoter-proximal genes are expressed more efficiently than promoter-distal genes. The normalized read counts (see below) on the MV genome are shown in **Figure 6—figure supplement 1**, where only the first position of the reads is taken into account.

We performed statistical analysis of reads for each RLR that were enriched in the RLR/RNA samples compared to the CH/RNA samples, but lacked RLR enrichment in total RNA of the RLR sample test compared to total RNA of the CH control sample. For this we performed differential analyses between RLR/RNA and CH/RNA on one hand, and between total RLR RNA and total CH RNA on the other hand. The normalization and differential analyses were performed with R (**Team, 2013**) and the DESeq2 package. A p-value adjustment was performed according to the Benjamini and Hochberg (BH) procedure (**Benjamini and Hochberg, 1995**). Positions were considered significantly enriched when their adjusted p-value was lower than 0.05. Importantly, there were no differences except for the ST-RIG-I cells for the total RNA profiles of the ST-RLR cells upon infection with MV (**Supplementary file 1**). These differences were taken into consideration upon statistical analysis. The distributions of normalized read counts matching the MV genome sequences were represented along the viral genome with the X axis corresponding to all possible positions on the viral genome, and the Y axis showing the normalized number of reads that begin at that position (**Figure 6A–C**).

The distribution of the normalized sequencing reads in the RLR samples collected during MV infection differed a lot for each of the three cytosolic receptors. Indeed, NGS data analysis showed specific MDA5 association with RNA sequences of positive polarity, which most likely correspond to the MV-N mRNA or a read-through transcript of the MV leader region containing N coding sequence (**Figure 6A**). LGP2 associated RNA sequences represented only a short part of the N coding region and were also enriched in L gene-derived RNAs with both positive and negative polarities (**Figure 6B**). Surprisingly, we failed to detect any RIG-I specific reads aligning to the MV genome



**Figure 6.** NGS analysis of specific RLR viral partners purified upon infection with MV. MDA5/RNA (A), LGP2/RNA (B) and RIG-I/RNA (C) samples were subjected to Illumina strand-specific NGS analysis. Sequencing reads were mapped to the MV genome and only the first nucleotide was retained. Differential analyses were performed between RLR/RNA and CH/RNA on one hand and total RLR/RNA and total CH/RNA on the other hand. The distributions of normalized read counts matching the MV genome are represented along the viral genome with the X axis corresponding to all possible positions on the MV genome, and the Y axis showing the normalized number of reads that begin at that position on the positive (+) or the negative (-) strand of the genome. Significantly enriched reads are represented in red and non-significantly enriched reads are in blue. N, P/V/C, M, F, H, L are MV genome regions coding for the corresponding proteins.

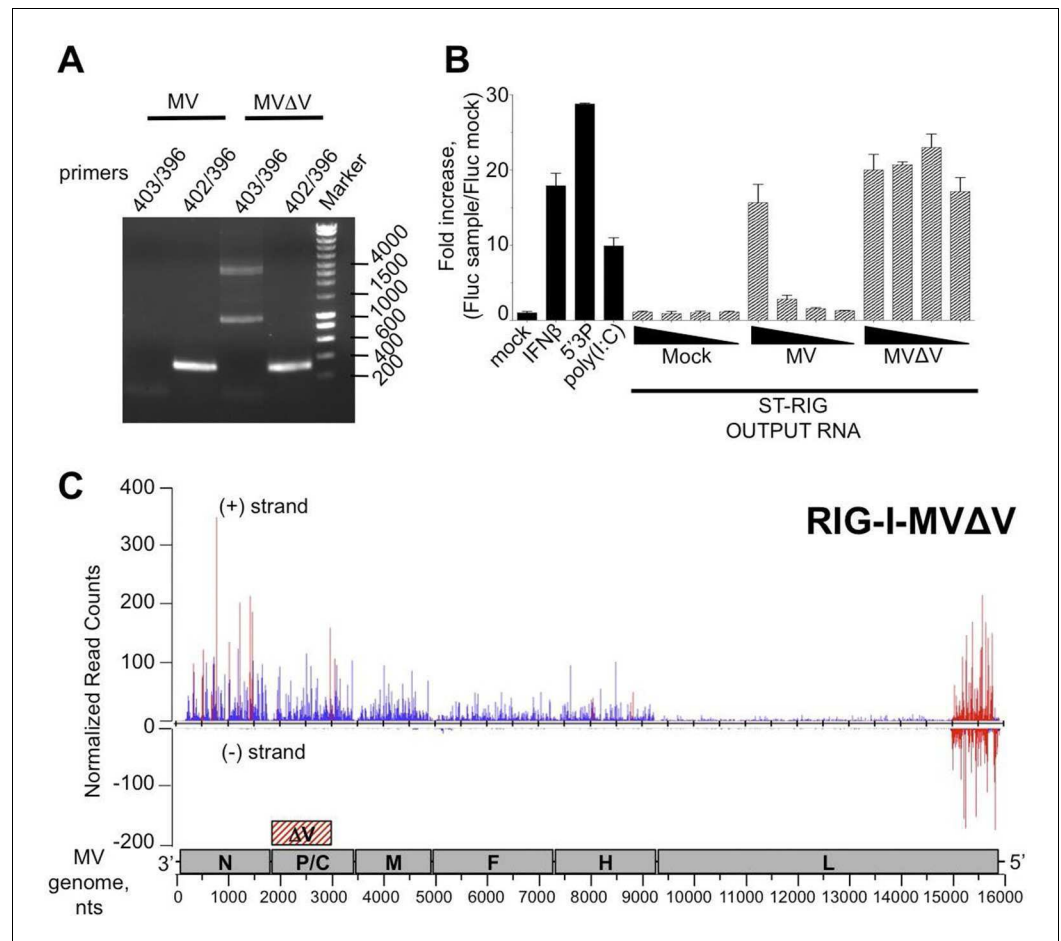
DOI: [10.7554/eLife.11275.009](https://doi.org/10.7554/eLife.11275.009)

The following figure supplement is available for figure 6:

**Figure supplement 1.** NGS profile of total RNA aligned on the MV genome from ST-CH cells infected with the MV.

DOI: [10.7554/eLife.11275.010](https://doi.org/10.7554/eLife.11275.010)

(not shown). This was unexpected since in the above-presented silencing experiment, RIG-I was the only important of the three RLRs sensor for innate immunity activation upon MV infection (**Figure 5B**). Thus, we performed a second RIG-I purification and NGS experiment. For this second RIG-I/RNA sequencing the viral genome coverage ranged from 144X to 1856X. Again, we obtain similar read profile with only few short positions along MV genome statistically enriched in the RIG-I/RNA sample (**Figure 6C**).



**Figure 7.** 5' copy-back DI-genome is specifically associated with RIG-I upon infection with MVΔV. (A) RT-PCR amplification of 5' copy-back DI-genome from cells infected with MVΔV using specific primers. Primers JM396 and JM403 were used for 5' copy-back DI-genome amplification and JM402 and JM396 – for MV full-length genome amplification (*Shingai et al., 2007*). (B) Comparison of immunostimulatory activities of RIG-I associated RNAs purified from MV and MVΔV infected cells. 10, 5, 2 and 1 ng of RNA were transfected into STING-37 cells, 5'3P, poly(I:C) and IFNβ (200 UI/mL) were used as controls and Fluc activity was measured after 24 hr post-transfection. Experiments were performed two times and data represents means ± SD of the technical triplicates of the most representative experiment. (C) RIG-I recognizes 5' copy-back DI-genome in MVΔV infected cells. ST-RIG-I cells were infected with MVΔV. RIG-I/RNA samples were subjected to Illumina strand-specific NGS. Reads were mapped to the MV genome and only the first nucleotide was retained in the X axis. Normalization and presentation of NGS results as **Figure 6**.

DOI: [10.7554/eLife.11275.011](https://doi.org/10.7554/eLife.11275.011)

The following figure supplements are available for figure 7:

**Figure supplement 1.** The 5' copy-back DI genome of MVΔV.

DOI: [10.7554/eLife.11275.012](https://doi.org/10.7554/eLife.11275.012)

**Figure supplement 2.** Comparison of immunostimulatory activities of total RNA purified from ST-RIG-I cells infected by either MV or MVΔV recombinant viruses.

DOI: [10.7554/eLife.11275.013](https://doi.org/10.7554/eLife.11275.013)

## MV 5' copy-back DI-RNA specifically associates with RIG-I receptor and is efficiently purified using ST-RIG-I cells

The failure to detect any specific MV RNA ligands for RIG-I could be explained by the lack of RIG-I-specific MV RNA ligands, or by a deficiency of tagged RIG-I protein for RNA ligands purification. MV 5' copy-back DI genomes are known interactors of RIG-I. Therefore, we looked for the presence of DI RNA molecules in ST-RIG-I cells infected with MV by using universal 5' copy-back DI genome specific primers. RT-PCR analysis failed to detect any 5' copy-back DI RNA in infected ST-RIG-I cells (**Figure 7A**). Interestingly, when the same cells were infected with MV $\Delta$ V virus deficient in V protein, two DNA fragments of approximately 1 and 4 kb were amplified from total RNA samples using 5' copy-back DI genome specific primers (**Figure 7A**). Furthermore, sequencing analysis revealed that the 1 kb RT-PCR amplicon contained all the 5' copy-back DI-RNA features. Indeed, this 1236 nucleotide-long DI genome included genomic 'trailer' (Tr) and the reverse complement of the Tr sequences at the 3' and 5' extremities and the exact complementary of the extremities of 201 nucleotides able to hybridize to form a stem-loop structure (**Figure 7—figure supplement 1**). Sequencing analysis of the 4-kb amplicon suggested that it could correspond to a mosaic type of MV DI genome (**Marriott and Dimmock, 2010**). Further, the immunostimulatory activity of RIG-I/RNA purified from MV $\Delta$ V infected cells demonstrated a significant increase in ISRE stimulation compared to RIG-I/RNA purified from MV infected cells (**Figure 7B**). Interestingly, the immunostimulatory activity of total RNA purified from MV and MV $\Delta$ V infected ST-RIG-I cells was similar (**Figure 7—figure supplement 2**).

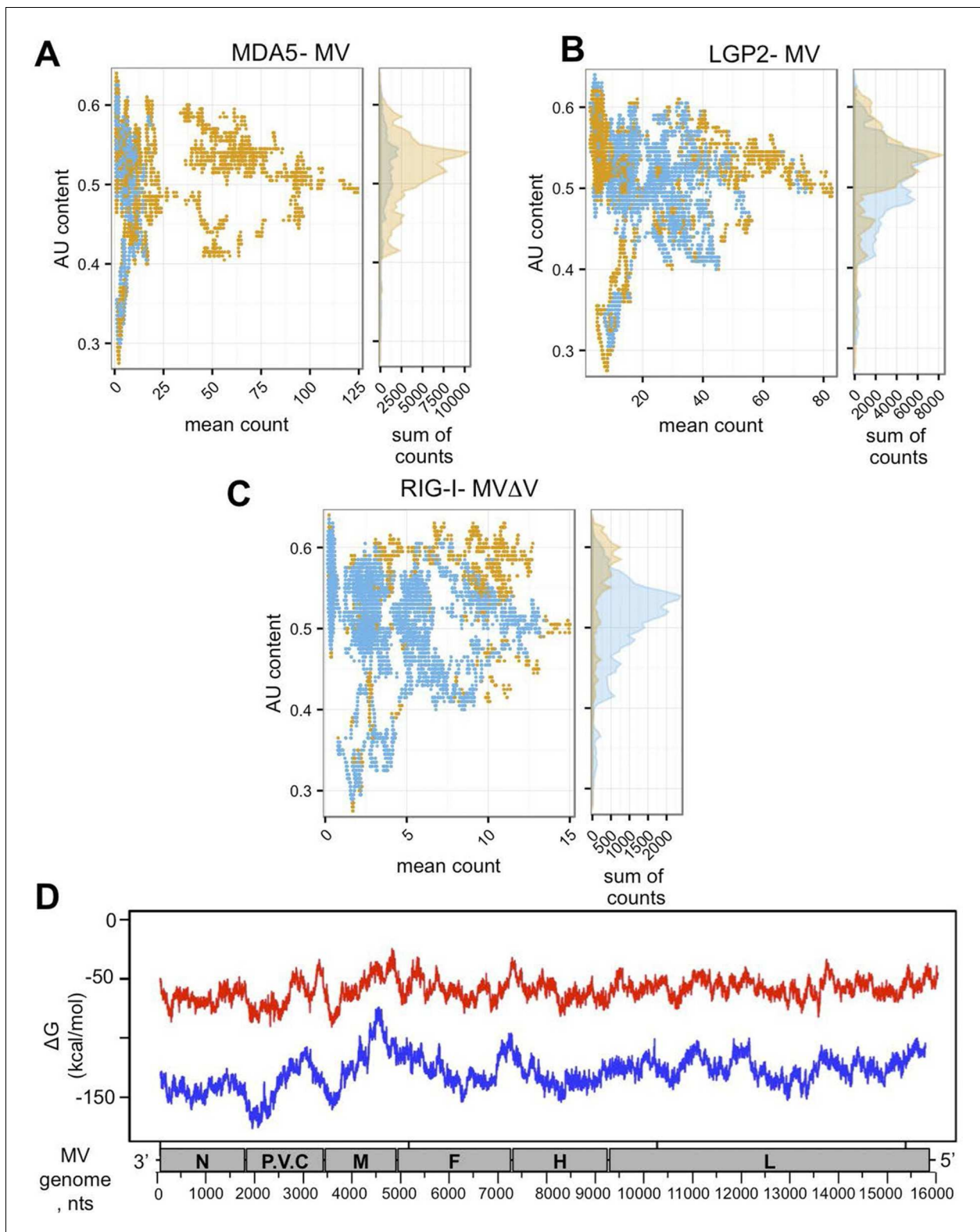
Since 5' copy-back DI genomes are known interactors of RIG-I, we used MV $\Delta$ V infection to verify the efficiency of specific RIG-I ligands purification from ST-RIG-I cells. As above, RIG-I/RNAs were analysed by NGS. Again as a control, we used CH/RNA samples purified in a parallel experiment. As previously, the experiments were performed in triplicate, sequencing reads were mapped to MV genome and statistical analysis was performed. As expected, when normalized read counts were represented along MV genome, a vast majority of reads aligned to the 5'-end of the genome with sequences of both positive and negative polarities (**Figure 7C**). This 5' MV genome region perfectly corresponds to the 1236 nts-long 5' copy-back DI genome characterized above (**Figure 7—figure supplement 1**). These data clearly confirm the role of RIG-I in sensing 5' copy-back DI RNAs and suggest a role of the MV-V protein in controlling the DI genome's formation. They also demonstrate that ST-RIG-I cell line is a potent tool to purify specific RNA ligands of RIG-I upon infection.

## Primary and secondary structures analysis of RLR-specific viral RNA ligands

To evaluate AU/GC composition of the RNA sequences found to be specifically interacting with the three RLRs upon infection with MV, we performed additional bioinformatic analysis of the NGS data. AU content was calculated in a sliding window of 200 nts with one nucleotide step size and was compared to the mean count within that 200 nt window. **Figure 8A,B,C** demonstrates the AU composition of RIG-I/MDA5/LGP2 specific RNA partners. Our results show that RIG-I was preferentially binding AU-rich RNA regions of the MV genome, but only when the DI genomes were generated upon infection with MV $\Delta$ V. Further, using Mfold algorithm we performed in silico analysis of the potential to form RNA secondary structures by the different MV genome regions. We observed that the 3'-end of the genome up to beginning of the M fragment possessed regions with lower Free Energy (**Figure 8D**).

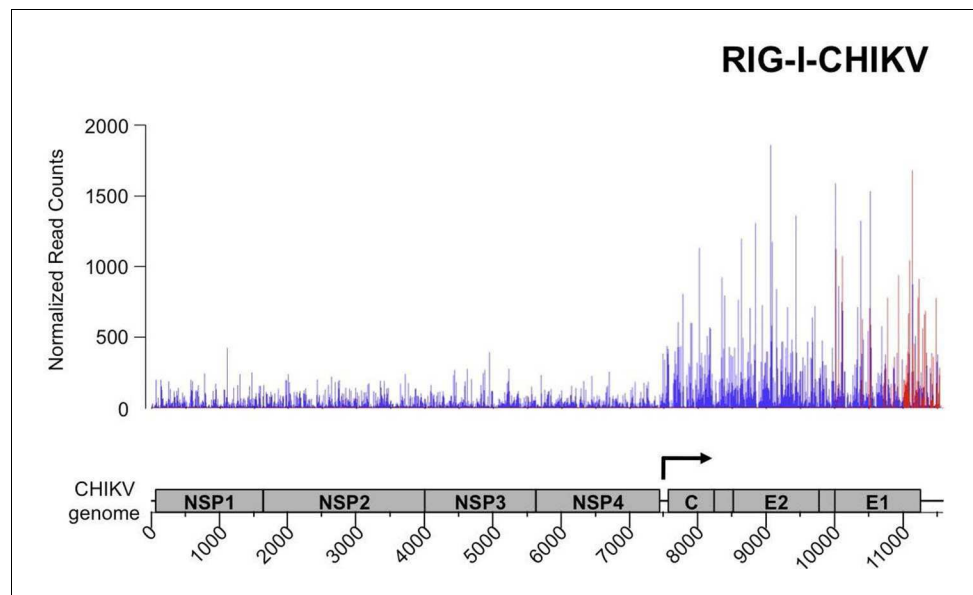
## NGS analysis reveals that RIG-I recognizes specifically the AU-rich 3' region of CHIKV genome

Similar protocol of NGS analysis of RLR-specific RNA partners was applied in CHIKV-infected ST-RLR cells. Approximately, 16 million reads of 51 nucleotides in length were obtained from each sequencing sample and were mapped to the CHIKV genome. This gave viral genome coverage ranging from 597X to 15363X. We performed the same statistical analysis as for MV samples. Interestingly, this time total RNAs profiles of ST-RLR cells infected with CHIKV were different with respect to the negative control ST-CH cell line (**Supplementary file 1**). Again, these differences were taken into consideration upon statistical analysis. The distributions of normalized read counts matching the CHIKV genome sequences were represented along the viral genome with the X axis corresponding to all



**Figure 8.** In silico analysis of NGS data. (A, B, C) AU content of RLR-specific RNA ligands. Number of sequenced reads (extended to 200nts) with a given AU content. Significantly enriched reads/positions are represented in orange and non-significantly enriched reads are coloured in blue. (A) MDA5, (B) LGP2, (C) RIG-I NGS data. (D) Secondary structure analysis of the MV genome. Either 250 (red) or 500 (blue) nucleotide long MV genome fragments were analysed.  $\Delta G$  (free energy) vs. position on the MV genome is shown.

DOI: 10.7554/eLife.11275.014



**Figure 9.** Analysis of purified RIG-I-specific RNA partners by NGS upon CHIKV infection. RIG-I/RNA samples were subjected to Illumina strand-specific NGS. Sequencing reads were mapped to the CHIKV genome and only the first nucleotide was retained in the X axis. Normalization and presentation of NGS results as **Figure 6**. The start of subgenomic RNA transcription is shown with the black arrow.

DOI: [10.7554/eLife.11275.015](https://doi.org/10.7554/eLife.11275.015)

The following figure supplement is available for figure 9:

**Figure supplement 1.** NGS profile of total RNA aligned on the CHIKV genome from ST-CH cells infected with the CHIKV.

DOI: [10.7554/eLife.11275.016](https://doi.org/10.7554/eLife.11275.016)

possible positions on the viral genome, and the Y axis showing the normalized number of reads that begin at that position (**Figure 9**).

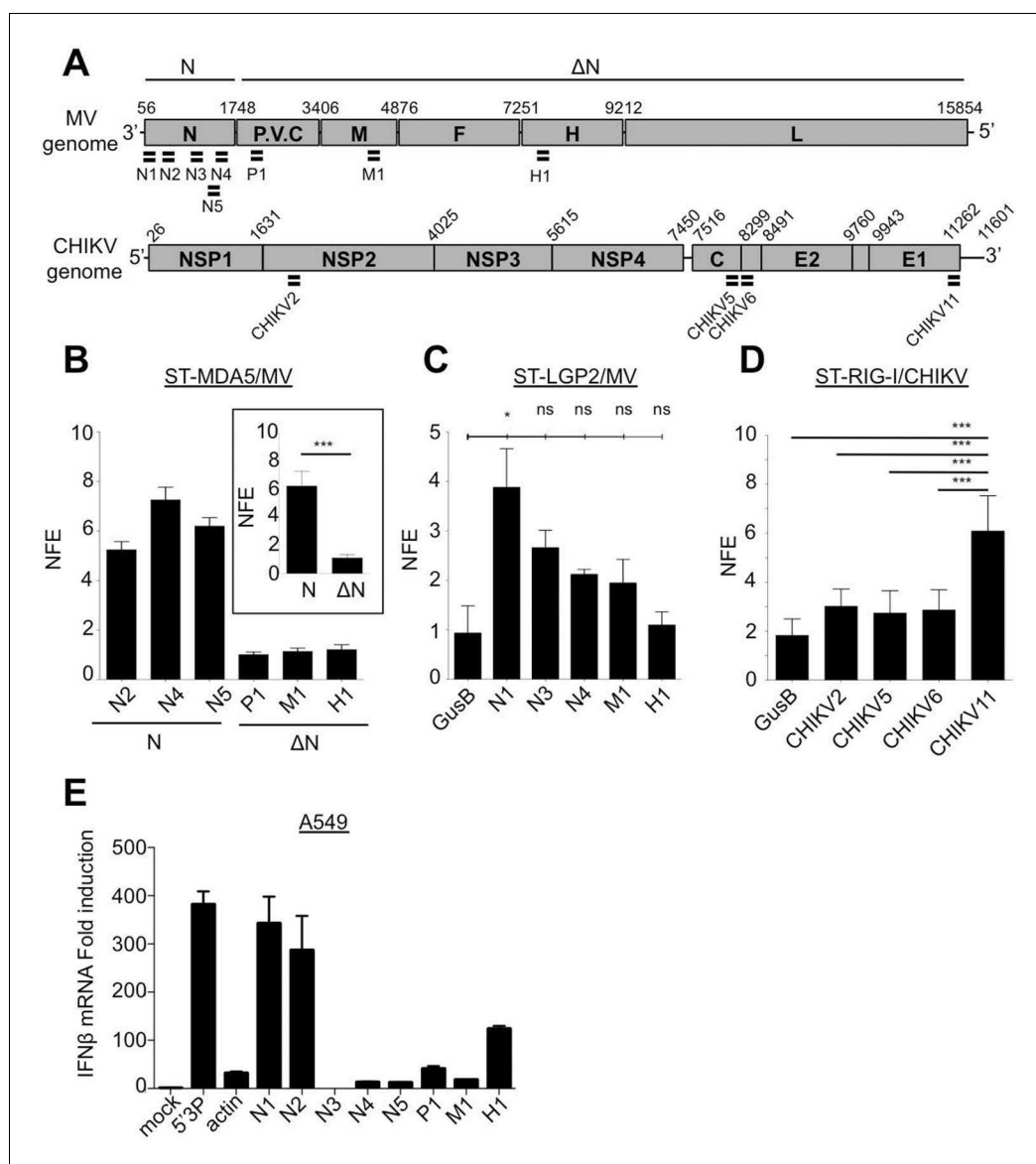
First, we studied NGS data obtained for the total RNA samples. Visual inspection of the aligned reads on the CHIKV genome shows an enrichment of the C-E2-E1-coding region corresponding to the CHIKV subgenomic RNA (**Figure 9—figure supplement 1**). Indeed, previous studies have shown that alphaviruses subgenomic RNAs are more abundant than genomes in cytoplasm of infected cells (**Strauss and Strauss, 1994; Pushko et al., 1997**).

Although the average number of reads obtained for the CHIKV genome in all RLR samples was higher than for MV RLR/RNAs, after the statistical analysis LGP2/RNA and MDA5/RNA samples failed to show any specific enrichments in reads corresponding to the CHIKV genome (data not shown). In contrast, for the RIG-I/RNA sample we observed a specific enrichment in (+) sense RNA reads corresponding to the 3' untranslated region (3'-UTR) of the CHIKV genome (**Figure 9**).

Thus, our protocol of RLR-associated RNA ligands purification allowed us to observe that each of these cytosolic sensors has a specific RNA profile upon infection with different RNA viruses.

## Validation of NGS data using conventional approaches

We confirmed the relative amount of RLR-associated viral RNA by using qPCR. For this, numerous primers aligning on MV and CHIKV genomes were designed (**Figure 10A** and **Supplementary file 2**). The obtained enrichment in mRNA coding for MV-N protein in MDA5/RNA sample was compared to the CH/RNA sample. This qPCR analysis used three different probes aligning at the beginning and the end of the MV-N mRNA (**Figure 10A**) and validated that MDA5-associated RNAs most likely represent transcripts coding for the MV-N protein (**Figure 10B**). As negative control three other MV mRNAs coding for M, P and H proteins were looked for and not found to be enriched in MDA5/RNA samples (**Figure 10B**). We then validated that LGP2 specifically binds the 5'-end of the coding region of the N gene, as only the RNA fragment located the farthest to the 5'-end of the N mRNA (N1) was significantly enriched using qPCR (**Figure 10C**). Further, we validated the specific



**Figure 10.** qPCR analysis of specific RLR RNA signatures from MV- and CHIKV-infected cells and their immunostimulatory activity. (A) Locations of qPCR primers on MV and CHIKV genomes. (B) MDA5 specific interaction with the N coding region upon MV infection. MDA5/RNA samples were subjected to RT-qPCR analysis with specific primers within N, P, M and H mRNAs. Relative Normalized Fold Enrichments (NFE) against the control CH samples are shown. Small window represents comparison of NFE of the amplicons obtained with set of primers located in the N region (N2, N4, N5) to the NFE of primers located elsewhere in the genome (P1, M1, H1). Comparisons were performed by a non-parametric Mann Whitney Test. (C) LGP2 specific interaction with the 5'-end of the N coding region upon MV infection. LGP2/RNA samples were subjected to RT-qPCR analysis with specific primers within N, P and M mRNAs and housekeeping gene GusB. Relative NFE against the control CH samples are shown. Fold enrichment for different primers were compared by One-Way-ANOVA and a Tukey Multiple Comparison test. (D) RIG-I specific interaction with the 3'-end of the CHIKV genome. RIG-I/RNA samples were subjected to RT-qPCR analysis with specific primers along CHIKV genome. Fold enrichment for different primers were compared by One-Way-ANOVA and a Tukey Multiple Comparison test (\* $p < 0.05$  \*\*\* $p < 0.001$ ) (E) Immunostimulatory activity of in vitro transcribed RNA fragments corresponding to the RLR-specific regions on MV genome. RNA fragments were synthesized in vitro and transfected in A549 cells. IFN $\beta$  mRNA induction was measured by RT-qPCR analysis.  
DOI: 10.7554/eLife.11275.017

The following figure supplement is available for figure 10:

**Figure supplement 1.** co-IP of MV-N mRNA on MDA5 from human monocytes.

DOI: 10.7554/eLife.11275.018



interaction of RIG-I with the 3'-end of CHIKV genome. For this, we used a pair of primers detecting only the 49S genomic RNA (CHIKV2), and three others detecting both the 49S genomic and 26S subgenomic RNAs (CHIKV5, 6, 11) of which only CHIKV11 was located at the 3'-end of the genome (**Figure 10A**). Indeed, only the primer located at the 3'-end of the genome was significantly enriched compared to the other sets of viral specific primers and to a cellular housekeeping gene (**Figure 10D**).

Furthermore, we analysed immunostimulatory activity of RLR-specific regions on MV genome by transfecting in vitro transcribed RNA fragments in A549 epithelial cells permissive to MV. We identified that only sequences at the 5'-end of the N mRNA had an enhanced capacity to activate the IFN response (**Figure 10E**).

Finally, we validated by classical co-immunoprecipitation (co-IP) approach the results obtained with our ST-RLR purification technique. For this we infected a typical virus-permissive immune cell model (acute monocytic leukemia THP-1 cell line) to perform MDA5-specific RNAs isolation by co-IP and RNA analysis by qPCR. This experiment validated that MDA5 has a predisposition to bind MV-N coding region (**Figure 10—figure supplement 1**).

These results are in good agreement with NGS results, confirming the relevance of our high-throughput protocol to study viral RNA signatures sensed by RIG-I, MDA5 and LGP2 cytosolic receptors upon infection with different RNA viruses.

## Discussion

RLRs are located at the frontline of the evolutionary race between viruses and the host immune system. These cytoplasmic proteins detect invasion of viral RNA in the cytoplasm of infected cells and trigger innate immunity. The inflammatory response is necessary for limiting viral replication and initiating a specific adaptive immune response. Most of the studies on RLR specific viral RNA ligands are performed in the absence of a productive virus infection (for review see [Yoneyama et al., 2015]). These studies are based on transfection within cells of RNAs coming from infected cells, expression of viral-coding sequences from plasmids, or transfection of in vitro transcribed RNA or synthetic RLR agonists such as poly(I:C). Recently, to characterize RNA ligands of RLRs in the presence of active viral infections (Sendai and Influenza viruses, then MV and EMCV), NGS has been applied on RNAs isolated from infected cells by co-IP. In these studies the methodological approach was based on either Photo Activable-Ribonucleoside-enhanced CrossLinking and co-IP (PAR-CLIP) or simple co-IP followed by NGS. Using these approaches for Sendai and Influenza viruses only RIG-I specific RNA partners were analysed (Baum et al., 2010), for EMCV only LGP2-specific RNA partners were sequenced (Deddouche et al., 2014), and for MV RIG-I and MDA5 specific RNA partners were studied simultaneously (Runge et al., 2014). The disadvantages of RNA-protein isolation by co-IP approaches are that (i) they rely on the availability of high-affinity antibodies against the protein of interest and (ii) they often lack an appropriate negative control. Negative control antibodies with different affinities and directed against proteins that are absent from the cells can easily underestimate the background noise generated by co-IP followed by NGS. Also, for the PAR-CLIP methodology, the incorporation of the nucleoside analogue 4-thiouridine (4SU) within RNA during the active cycle of viral replication could change the molecular properties of viral and cellular RNAs, thus creating an artificial environment.

To overcome these problems we applied One-STREP-tag fusion protein affinity chromatography to purify RLRs. For this, we generated three single-clone stable cell lines expressing either tagged RIG-I, or MDA5, or LGP2 (**Figure 1**). In addition, a stable cell line expressing CH protein fused to the same One-STREP-tag was used as a control for non-specific binding. These tools allow studying the three RLRs in the same setting and to characterize their specific viral RNA ligands in the course of infection. Indeed, we isolated specific RLR RNA ligands from these cells infected with MV and CHIKV, respectively a negative- and a positive-sense RNA virus. Three biological replicates were performed for each RLR and an appropriate negative control (CH/RNA) allowed subtracting non-specific binding and to perform rigorous statistical analyses.

Despite the fact that these cells over-expressed one RLR, they were susceptible to infection with different RNA viruses (**Figures 2 and 3**). By applying multiple functional tests we determined the best conditions for ST-RLR cells infection (**Figure 3C**). We validated that they were efficient for RLR-specific RNA ligands purification and allowed extraction of immunoactive RNA molecules (**Figure 4**).

Consistent with previous studies we observed that RIG-I/RNAs provided a stronger immunostimulatory activity in comparison to MDA5/RNA molecules (*Ikegame et al., 2010; Runge et al., 2014*). In the same experimental set-up we showed that LGP2-specific RNA had a similar immunostimulatory activity to RIG-I/RNAs (**Figure 4**). Thus, for the two infections more immunoactive RNA ligands were purified with LGP2 and RIG-I than with MDA5.

For CHIKV infection, specific RNA ligands of cytosolic RLRs have not been established yet. The inflammatory response in non-hematopoietic cells is known to be dependent on MAVS, the adaptor molecule necessary for both RIG-I and MDA5, however which of the two receptors is involved in sensing CHIKV is still unknown (*Schilte et al., 2010*). We found that RIG-I specifically interacts with the 3'-UTR of CHIKV genome. Despite the higher coverage of the CHIKV genome compared to MV genome in our NGS data, we failed to observe specific enrichment in CHIKV reads on LGP2 and MDA5 receptors. The observation that RIG-I specifically interacts with CHIKV 3'-UTR is very promising (**Figure 9**). Indeed, the 3'-UTR of positive-sense RNA viruses has already been shown to be particularly immunoactive (*Saito et al., 2008; Schnell et al., 2012; Kell et al., 2015*). CHIKV 3'-UTR contains multiple 21 nucleotide-long repeated sequence elements forming dsRNA structures, which are possible targets for RIG-I (*Zhang et al., 2013b*). Interestingly, the 3'-UTR has recently been described as a region particularly sensitive to the evolutionary pressure exerted by mosquito vectors (*Chen et al., 2013*). Thus, we observed that in the mammalian host RIG-I targets the same viral region. To our knowledge this is the first time that RIG-I affinity for the 3'-end of a positive-sense RNA virus is demonstrated in physiological conditions.

For MV infection we compared our NGS data with those previously published for RIG-I and MDA5 using the PAR-CLIP coupled to NGS approach (*Runge et al., 2014*). Interestingly our study and the *Runge et al.* data showed that i) RLRs preferentially interact with MV-N and MV-L derived RNA, ii) RIG-I and not MDA5 interacts with viral RNA of both negative- and positive-sense polarities originating from MV 5' copy-back DI genomes (**Figure 7C**, [*Runge et al., 2014*]). However, we observed several discrepancies. We found that MDA5 and not RIG-I specifically interacted with MV-N coding sequences. RIG-I specific positive- and negative-sense reads only represented 5' copy-back DI-genome and were equally distributed along the 5'-end of the MV genome (**Figure 7C**). Similar NGS profile of the 5' copy-back DI genome on RIG-I was previously observed in the context of Sendai virus infection (*Baum et al., 2010*). In this study only a single population of 546 nts-long 5' copy-back DI RNA genome has been specifically enriched on RIG-I. Thus, the concordance of our results for RIG-I with *Baum et al.* study nicely confirms the relevance of our strategy.

In the future, a deeper NGS study should be done to explain why the RIG-I/RNA sample collected during MV infection possesses immunostimulatory activity despite the absence of MV RNA ligands specifically bound to RIG-I (**Figure 4A and 6C**). We propose that self-RNA molecules processed by the action of the antiviral endoribonuclease RNaseL on cellular RNA could be specific RNA ligands that bind RIG-I and induce IFN- $\beta$  expression. Indeed, RNaseL induces type I IFN via production of short-length RNA molecules of viral and cellular origins by the mechanism that includes interaction with MDA5 and RIG-I (*Malathi et al., 2007; 2010*). In the current experimental setup we used a sample multiplexing that allowed an appropriate analysis of relatively long viral-derived RNA and not cellular RNA molecules. Alternatively, it is possible that MV RIG-I-specific RNA ligands are short length and thus not compatible with the classical Illumina NGS protocol applied in this study. In the future this protocol will be adapted to study small size RLR partners and to study RLR-specific cellular partners.

Recently *Deddouche et al.* have isolated a pertinent MDA5 agonist by co-IP of LGP2/RNA complexes purified from cells infected with EMCV, a positive-sense RNA virus. Using NGS, they mapped this RNA on the L region of the EMCV genome. Numerous functional assays were performed to validate that the L region is a key determinant of the MDA5 stimulatory activity (*Deddouche et al., 2014*). This work supported previous studies showing that in an infected cell, MDA5 and LGP2 positively cooperate with each other (*Venkataraman et al., 2007; Satoh et al., 2010; Bruns and Horvath, 2012; Childs et al., 2013*). In vitro studies of MDA5 suggested that MDA5 hypothetically recognizes long dsRNA molecules like poly(I:C) (*Kato et al., 2008*). MDA5 binds dsRNA from the stem of the molecule and starts forming filaments towards its extremities (*Peisley et al., 2011; Wu et al., 2013*). Recent studies of autoimmune disorders have proposed that MDA5 detects aberrant secondary structures formed by self mRNAs (*Liddicoat et al., 2015*). All these are evidences that most certainly MDA5 natural ligands are RNA stem structures embedded within different RNAs.

In concordance with this, our results show that MDA5 recognizes the integrity of the MV-N mRNA, certainly through the recognition of stem loop structures. Further, our *in silico* (Mfold) prediction of RNA secondary structures within the different parts of the MV genome suggested that MV-N mRNA had a potential to form stem loop structures (**Figure 8D**).

It has recently been shown that LGP2 can stabilize shorter filaments of MDA5 around dsRNA of 100 nts in length (**Bruns et al., 2014**). Our data further confirmed this MDA5/LGP2 synergy. We demonstrated that upon MV infection MDA5 and LGP2 were binding similar viral RNA ligands. Indeed, these LGP2 specific RNAs were encompassing the MV-N segment (**Figure 6A and B**). However, while the whole MV-N mRNA was bound by MDA5, the LGP2-specific reads were mostly localized in the 5'-end of the N region. Furthermore, when transfecting *in vitro* transcribed RNAs corresponding to the MDA5- and LGP2-specific regions of the MV genome in human epithelial cells, we identified a higher immunostimulatory activity of the 5'-end of the N mRNA compared to RNA fragments of similar size but coming elsewhere from the genome (**Figure 10E**). These data suggest that, upon MV infection, LGP2 and MDA5 specifically interact with the same RNA agonist and that LGP2 could be involved in stabilizing short MDA5 filaments formed on secondary structures localized at the 5'-end of the MV-N mRNA.

In summary, using One-STrEP-RLRs affinity chromatography purification and NGS we provide the first simultaneous visualisation of specific RNA ligands for RIG-I, MDA5 and LGP2 in living cells and in the presence of different RNA viruses. Our results show that each of these cytosolic sensors has its individual RNA profile upon infection with different RNA viruses (**Figures 6, 7 and 9**). Previous studies demonstrated RIG-I specific binding to the AU- and polyU/UC-rich regions of viral genomes (**Saito et al., 2008; Schnell et al., 2012; Runge et al., 2014; Kell et al., 2015**). In our results RLR-specific binding cannot simply be explained by primary RNA composition or AU/GC content of RNA ligands. Indeed, we found RIG-I preferential binding to the AU-rich sequences (**Figure 8C**), but this binding was observed only when a dsRNA-containing DI genome was produced by the recombinant MV $\Delta$ V. These results suggest that RIG-I recognizes specific RNA secondary structures. MDA5 and LGP2 specificity to AU-rich RNAs was less pronounced (**Figure 8A and B**). Additional studies should be performed to obtain a clearer view on the similarities and the differences of RNA structures recognized by each of the three RLRs. For this, we are currently applying our One-STrEP-RLR approach to three other RNA viruses as well as to an intracellular bacterium. As a consequence, this work offers new strategies for immune and antiviral therapies by targeting the RLR pathway for the therapeutic control of viral infections, enhancing the immune response for vaccines, and conceiving strategies for immune suppression to control inflammation or specific autoimmune diseases.

## Materials and methods

### Cells, plasmids and recombinant viruses

HEK-293 (human embryonic kidney, ATCC CRL-1573), Hela (human cervix adenocarcinoma epithelial, ATCC CCL-2) and A549 cells (human lung adenocarcinoma epithelial, ATCC CCL-185) were maintained in DMEM-Glutamax (GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) supplemented with 10% heat-inactivated FCS (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) and 100 U/ml/100  $\mu$ g/ml of Penicillin-Streptomycin (GIBCO). THP-1 (monocyte cells, ATCC TIB-202) were cultured at  $0.5\text{--}7 \times 10^5$  cells/ml in RPMI 1640 (GIBCO) containing 10% heat-inactivated FCS, 100 U/ml/100  $\mu$ g/ml of Penicillin-Streptomycin. For all cell lines mycoplasma contamination testing status was routinely verified (#30-1012K, ATCC). To establish clonal stable cell lines expressing One-ST-RLR, we used a modified pEXPR-IBA105 plasmid carrying GW cassette (pEXPR-IBA105GW) kindly provided by Dr. Yves Jacob (Unité de Génétique Moléculaire des Virus ARN, Institut Pasteur). First, the RLR sequences (LGP2, MDA5 or RIG-I) were amplified by standard PCR from a human spleen cDNA library (Invitrogen) using specific primers with AttB1 and AttB2 sequences included (**Supplementary file 2**). The corresponding DNA fragments were cloned by *in vitro* recombination into pDONR207 entry vector (BP reaction, Gateway, Invitrogen). RLR genes (MDA5: AF095844; LGP2: AAH14949 RIG-I: CCDS6526.1) were finally recombined from pDONR207 to One-STrEP-tag pEXPR-IBA105GW by *in vitro* recombination (LR reaction). These new plasmids were transfected into HEK-293 cells using JetPrime reagent (#114–15, Polyplus Transfection, Strasbourg, France). Two days later, culture medium was removed and replaced by fresh medium containing

G418 at 500 µg/ml (#G8168, SIGMA, St. Louis, Missouri). Transfected cells were amplified and subsequently cloned by serial limit dilution. At least 5 clones were screened for each RLR to detect the tagged protein expression by qPCR and Western Blot.

For STING37shRLR cell lines, we generated lentiviral vectors using the canonical triple transfection of HEK293T cells by a VSVg envelope, an encapsidation p8,74 plasmid kindly provided by Dr. Pierre Charneau ([Zufferey et al., 1997](#)) and a pGIPZ vector plasmids (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts) expressing either an shRNA with no target (RHS4346, shNeg), or targeting LGP2 (shLGP2, RHS4430-99166661-V2LHS\_116526), MDA5 (RHS4430-101128286-V3LHS\_300657, shMDA5) or RIG-I (RHS4430-99619609-V2LHS\_197176, shRIG-I), all bearing a puromycin selection marker. Vectors were titrated according to manufacturer's instructions in HeLa cells. ISRE reporter cell line (STING37 [[Lucas-Hourani et al., 2013](#)]) was transduced at an MOI of 0.3 and 48 hr later puromycin (5 µg/ml) was added to the media to select properly transduced cells.

CHIKV 06–49 strain was isolated from the serum of an adult patient with arthralgia/ myalgia in Saint Louis city, Réunion, France in December 2005 ([Schuffenecker et al., 2006](#)). CHIKV strain 06–49 was titrated on VERO cell by TCID50 (50% Tissue Culture Infective Dose). Recombinant CHIKV-Rluc which contains the Rluc reporter gene inserted between the non-structural nsP3 and nsP4 proteins has already been described ([Henrik Gad et al., 2012](#)). Attenuated MV Schwarz vaccine strain (MV) and recombinant MV Schwarz expressing Fluc (rMV2-Fluc) from an additional transcription unit derived from MV have been previously described ([Combredet et al., 2003](#); [Komarova et al., 2011](#)). To prevent V protein expression from MV, a two-step PCR strategy was used to generate MVΔV virus. Two PCR fragments were amplified using MV2313 (5'-ATCTGCTCCCATCTCTATGG) and MV2504 (5'-TCTGTGCCCTTCTTAATGGG) for the first fragment and MV2485 (5'-CCCATTAA-GAAGGGCACAGA) and MV3385 (5'-AGGTTGTACTAGTTGGGTCG) for the second fragment. These PCRs introduced a mutation interfering with RNA editing (UUAAAAAGGGCACAGA native sequence was mutated to UUAAGAAGGGCACAGA). The two PCR products were combined in a second PCR reaction using MV2313 and MV3385 primers. The produced mutated HindIII-SpeI MV fragment was moved into the pTM-MVSchwarz plasmid after digestion with the corresponding restriction enzymes. Recombinant virus was rescued as previously described ([Combredet et al., 2003](#)) and named MVΔV. Immunoblot analysis was performed to validate the lack of MV-V expression by MVΔV (data not shown). Virus stocks were produced on VERO cells, and titrated by TCID50.

## Antibodies, western blot and intracellular staining

Protein extracts were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis on 4–12% Criterion gels (BioRad, Hercules, California) with MOPS running buffer and transferred to cellulose membranes (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) with the Criterion Blotter system (BioRad). The following antibodies were used: an anti-STrEP-Tag (#34850, Qiagen, Hilden, Germany), anti-LGP2 (NBP1-85348, Novus, Littleton, Colorado), anti-MDA5 (#5321, Cell Signaling, Danvers, Massachusetts and AT113, EnzoLifescience, New York, NY), anti-RIG-I (D14G6, Cell Signaling) or monoclonal anti-β-actin antibody (A5441, Sigma), IRF3 (#11904, Cell Signaling) or phosphor-IRF3 (ab76493, Abcam, Cambridge, UK). HRP-coupled anti-mouse (NA9310V, GE Healthcare) or anti-rabbit (RPN4301, GE Healthcare) were used as secondary antibodies. Peroxidase activity was visualized with an ECL Plus Western Blotting Detection System (#RPN2132, GE Healthcare). MV intracellular staining was performed with mouse anti-N mAb (clone 25, [[Giraudon and Wild, 1981](#)]) and FITC coupled Goat Anti-mouse Ab (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey). For CHIKV, intracellular staining was performed with either FITC-conjugated anti-CHIK.E2 mAb 3E4 ([Bréhin et al., 2008](#)) or anti-dsRNA mAb (J2-1201, Scicons, Szirák, Hungary) followed by anti-mouse-APC antibody (A865, Invitrogen).

## MV and CHIKV replication assays

STING37shRLR cells ( $2 \times 10^5$  per well) were plated in a 24-well plate and infected with appropriate MOIs. For rMV2-Fluc or CHIKV-Rluc infection, at each time point cells were lysed by Passive Lysis buffer (E1941, Promega, Fitchburg, Wisconsin), and luciferase activity was measured with Bright-Glow Luciferase assay system (E2650, Promega) or Renilla Glow Luciferase Assay System (E2720, Promega), correspondingly. For immunostaining, cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and 2% foetal calf serum (FCS) and then fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde. Cells were permeabilized with PermWash buffer (#554723, BD Biosciences), incubated with the

primary antibody at 4°C for 30 min, washed in PermWash and incubated with the secondary antibody. Cells were washed twice with PBS 2%FCS before analysis by flow cytometry using a MACS-Quant cytometer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and analysis was done with the software FlowJo (vers 7.6).

### Affinity chromatography of RLR RNP complexes and subsequent RNA and protein purification

ST-RLR cells ( $5 \times 10^7$ ) were infected at an MOI of 1 for 24 hr (MV) or for 13 hr (CHIKV). Cells were washed twice with cold PBS and lysed in 6 ml of lysis buffer (20 mM MOPS-KOH pH7.4, 120 mM of KCl, 0.5% Igepal, 2 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol), supplemented with 200 unit/ml RNasin (#N2515, Promega) and Complete Protease Inhibitor Cocktail (#11873580001, Roche, Penzberg, Germany). Cell lysates were incubated on ice for 20 min with gentle mixing every 5 min, and then clarified by centrifugation at 16,000 g for 15 min at 4°C. A 250  $\mu$ l aliquot of each cell lysate was used to perform total RNA purification using TRI Reagent LS (#T3934, SIGMA). The remaining of cell lysate was incubated for 2 hr on a spinning wheel at 4°C with 200  $\mu$ l of StrepTactin Sepharose High Performance beads (#28-9355-99, GE Healthcare). Beads were collected by centrifugation (1600 g for 5 min at 4°C) and washed twice for 5 min on a spinning wheel with 5 ml of washing buffer (20 mM MOPS-KOH pH7.4, 120 mM of KCl, 2 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) supplemented with 200 unit/ml RNasin and Complete Protease Inhibitor Cocktail. Precipitates were eluted using biotin elution buffer (IBA). RNA purification was performed using TRI reagent LS (T3934, SIGMA). RNA was dissolved in 80  $\mu$ l of DNase-free and RNase-free ultrapure water. Extracted RNAs were analyzed using Nanovue (GE Healthcare) and Bioanalyser RNA nano kit (#5067–1511, Agilent, Santa Clara, California).

### Next generation sequencing (NGS)

RNA molecules isolated from ST-RLR/RNA complexes were treated for library preparation using the Truseq Stranded mRNA sample preparation kit (Illumina, San Diego, California,) according to manufacturer's instruction. To analyze all RNA species present, the initial poly(A) RNA isolation step was omitted. Briefly, the fragmented RNA samples were randomly primed for reverse transcription followed by second-strand synthesis to create double-stranded cDNA fragments. No end repair step was necessary. An adenine was added to the 3'-end and specific Illumina adapters were ligated. Ligation products were submitted to PCR amplification. Sequencing was performed on the Illumina HiSeq2000 platform to generate single-end 51 bp reads bearing strand specificity.

### Read mapping, expression quantification and statistical analysis

Sequenced reads have been cleaned from adapter sequences and low complexity sequences (see appendix). Reads were aligned to the MV Schwarz strain reference genome (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/FJ211590.1>), and to CHIKV49 strain reference genome (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AM258994>) using bowtie (version:0.12.7, options: -a -best -q -m50 -e50 -chunkmbs 400 [Langmead et al., 2009]). The first position of each read (taking into account the strandness) was used for statistical analysis using the KNIME software (Jagla et al., 2011). Counts per position were calculated using pileup from Samtools (Li et al., 2009).

Reads cleaning was performed using version 0.10 of clean\_ngs ([https://github.com/PF2-pasteur-fr/clean\\_ngs](https://github.com/PF2-pasteur-fr/clean_ngs)) in single-end mode and the following parameters: minLen=15, maxLen=5 3' threshold = 5' threshold = 61 (ASCII value). Adapter sequences: TGGAATTCTCGGGTGCCAAGG; TGGAATTC TCGGGTGCCAAGGAAGTCCAGTCACNNNNNNATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG; parameters for both sequences: Identity 0.85 (min identity between adapter and read), QC threshold= 61 (ASCII value, bases with values inferior are considered as a match to the adapter, remove as many adapter as possible) min overlap=7; truncate adapter = 0 (don't truncate adapter at 5'-end); leader sequence = 0 (use adapter sequence as a regular adapter at the 3'-end).

Statistical analyses were performed with R version 3.0.2 (Team, 2013) and bioconductor packages. Normalization and differential analyses were carried out between RLR/RNA and Ch/RNA on one hand, and between total RLR RNA and total CH RNA on the other hand. In both cases the normalization was performed with DESeq2 version 1.2.1 with the normalization parameter locfun="-shorth" and default parameters otherwise (Love et al., 2014). For the differential analysis we used DESeq2 with default settings. Raw p-values were adjusted according to the BH procedure

(Benjamini and Hochberg, 1995). Adjusted p-values were considered significant if they were lower than 0.05. Positions of interest were those enriched in reads in RLR/RNA compared to CH/RNA, and not enriched in the total RNA comparison.

### In silico analysis of NGS data

AU content was calculated in a sliding window of 200 nts (step size=1) and compared to the mean count within the 200 nt window and to the sum of sequenced reads (extended to 200 nt). Viral RNA sequences were subjected to secondary structure prediction using Mfold software (version 3.6, MAX=1) using standard parameters to all sliding windows (window size= (250 and 500); step size=1) from the reference genome.

### RT-PCR detection and cDNA cloning of 5' copy-back DI-RNAs

The copy-back DI-RNAs were amplified from RNA extracted from total RNA extracted from ST-RIG-I using two sets of MV primers (Shingai et al., 2007): for DI-RNAs, 396 (A: 5'-TATAAGCTTACCAGACAAAGCTGGGAATAGAACTTCG) and 403 (C: 5'-CGAAGATATTCTGGTGAAGTCTAGTA) and for standard genome, 396 (A) and 402 (B: 5'-TTTATCCAGAATCTCAAGTCCGG). Reverse transcription was performed with Super Script III (18080–0440–044, Invitrogen) and a PCR amplification was achieved with Q5 High-Fidelity 2X Master Mix (M0494S, NEB, Ipswich, Massachusetts). The PCR-amplified product A-C was cloned into pTOPO vector (Invitrogen) and sequenced.

### TaqMan RT-qPCR and SYBR Green qPCR analyses

RLR mRNA expression profile in ST-RLR cells was performed by RT-qPCR on total RNA isolated with the RNeasy Mini Kit (Qiagen). Reactions were performed with 100 ng of RNA using TaqMan RNA-to-Ct 1-Step Kit (# 4392938, Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts) and 1 µl of custom TaqMan Gene Expression Assays (Hs00920075\_m1 - for LGP2; Hs01070332\_m1 - for MDA5; Hs00204833\_m1 - for RIG-I; Hs99999905\_m1 for GAPDH; Hs01077958\_s1 - for IFN-β). We used Applied Biosystem StepOnePlus™ system. Results were normalized using expression levels of the GAPDH housekeeping genes and RLR expression level in HEK293 cells was settled as 100% of gene expression. All the measures were performed in triplicate and analysed by StepOnePlus™ software. For RLR/RNA enrichment profile, RNA was extracted with TRI Reagent LS before or after affinity chromatography purification on StrepTactin Sepharose. Starting from 200 ng of RNA, cDNA synthesis was achieved in 20 µL using the SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (#1648108, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) following manufacturer's recommendations. Reactions were performed on 2 ng of cDNA using Power SYBR® Green PCR Master Mix (#4367659, Life Technologies). Reactions were performed in a final volume of 20 µl in the presence of 0,6 µM of appropriate primers (Supplementary file 2). MV and CHIKV specific primers were designed using Primer Express Software (Applied Biosystems). RNA Fold Enrichment was calculated according to the following formulas:

Fold Enrichment (FE):

$$FE(Ct) = 2^{-[(Ct(query) - Ct(GAPDH))_{beads}] - [(Ct(query) - Ct(GAPDH))_{total}]}$$

Normalized Fold Enrichment (NFE):

$$NFE(primer) = \frac{RLR.FE(primer)}{mCherry.FE(primer)}$$

### Analysis of ST-RLR/RNA immunostimulatory activity

Short 5'3P-bearing RNA molecules were obtained from pCIneo plasmid linearized by XbaI before transcription. T7 transcription reactions were carried out with a T7 RiboMAX Express Large Scale RNA Production System (# P1320, Promega). RNA was purified using TriLS reagent and analyzed with Bioanalyser RNA nano kit (Agilent). Poly(I:C) was from Amersham Biosciences (# 27-4729-01, Amersham, UK). To determine ST-RLR responsiveness to synthetic ligands, expression of IFN-β was determined by transient transfection of reporter plasmid pIFNβ-Fluc containing the *Fluc* gene under the control of the IFN-β promoter (IFN-b-pGL3 [Lin et al., 2000]). For RNA transfection analysis, ST-RLR cells were plated in 24-well plates (2 x 10<sup>5</sup> per well). After 24 hr, cells were transfected with

JetPrime reagent with pIFN $\beta$ -Fluc (250 ng/well), plasmid harbouring a thymidine kinase (Tk) promoter just upstream of the *Rluc* gene (pTK-Rluc, 25 ng/well) and 10 ng of either poly(I:C) or 5'3P. After 24 hr, cells were lysed, and the Fluc and Rluc activities were measured in cell lysates using Dual-luciferase Reporter Assay System (Promega) according to manufacturer's instructions. Reporter activity was calculated as a triplicate of the ratio of Fluc activity to the reference Rluc activity.

To determine the immunostimulatory activity of RLR RNA partners, STING-37 cells were plated one day before transfection in 24-well ( $2 \times 10^5$  cells per well). RLR-specific or total RNA (10 ng) was transfected using jetPRIME together with 250 ng of pcINEO empty vector as a carrier. 24 hr post-transfection, cells were lysed with passive buffer and the Fluc activity was measured using the Bright-Glo Luciferase Assay System.

Viral sequences were synthesized using specific primers (**Supplementary file 2**) with the forward primers presenting the T7 promoter sequence (attgtaacgactcactatagg) at the 5'-extremity. Amplicons were purified in 1% agarose gel and used for in vitro transcription. Desired RNA molecules were further separated from the 3' extension by-products (*Triana-Alonso et al., 1995*) on 5% TBE-Urea Polyacrylamide Gel (#345-0086, Biorad). Purified RNAs were analyzed with Bioanalyser RNA pico kit (Agilent). 10 ng of purified RNA was transfected in A549 cells and IFN- $\beta$  mRNA was quantified by RT-qPCR analysis.

### Immunoprecipitation of MDA5-associated RNA from virus-infected cells

Similar to Runge et al. immunoprecipitation protocol was used but with little modifications: without crosslinking and the 20 mM MOPS-KOH pH7.4, 120 mM of KCl, 0.5% Igepal, 2 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol supplemented with 200 unit/ml RNasin and Complete Protease Inhibitor Cocktail buffer was used for cell lysis and washing steps.

### Acknowledgements

We thank Dr. Yves Jacob and Dr. Pierre Charneau for providing material and Charlotte Romanet for technical support. The authors thank all the members of the Viral Genomics and Vaccination research unit for their help and useful discussions.

### Additional information

#### Funding

Funder	Grant reference number	Author
Fondation pour la Recherche Médicale	FDT20140931129	Raul Y Sanchez David
Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites Virales	CSS1-AO 2012-2	Frédéric Tangy Anastassia V Komarova
Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites Virales	CSS1-AO 2012-1	Anastassia V Komarova

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

#### Author contributions

RYSD, OS, AVK, Conception and design, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data, Drafting or revising the article; CC, Conception and design, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data, Contributed unpublished essential data or reagents; M-AD, BJ, PD, FT, Conception and design, Analysis and interpretation of data, Drafting or revising the article; J-YC, Conception and design, Analysis and interpretation of data; MM, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data; MGG, Acquisition of data, Contributed unpublished essential data or reagents

## Author ORCIDs

Anastassia V Komarova,  <http://orcid.org/0000-0002-9998-8447>

---

## Additional files

### Supplementary files

• Supplementary file 1. Number of positions within the MV or CHIKV genomes different in total RLR RNA samples with respect to the negative control CH sample.

DOI: [10.7554/eLife.11275.019](https://doi.org/10.7554/eLife.11275.019)

• Supplementary file 2. List of primers used for the study.

DOI: [10.7554/eLife.11275.020](https://doi.org/10.7554/eLife.11275.020)

---

## References

- Ablasser A**, Bauernfeind F, Hartmann G, Latz E, Fitzgerald KA, Hornung V. 2009. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nature Immunology* **10**:1065–1072. doi: [10.1038/ni.1779](https://doi.org/10.1038/ni.1779)
- Akhrymuk I**, Kulemzin SV, Frolova EI. 2012. Evasion of the innate immune response: the Old World alphavirus nsP2 protein induces rapid degradation of Rpb1, a catalytic subunit of RNA polymerase II. *Journal of Virology* **86**:7180–7191. doi: [10.1128/JVI.00541-12](https://doi.org/10.1128/JVI.00541-12)
- Andrejeva J**, Childs KS, Young DF, Carlos TS, Stock N, Goodbourn S, Randall RE. 2004. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:17264–17269. doi: [10.1073/pnas.0407639101](https://doi.org/10.1073/pnas.0407639101)
- Baum A**, Sachidanandam R, García-Sastre A. 2010. Preference of RIG-I for short viral RNA molecules in infected cells revealed by next-generation sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:16303–16308. doi: [10.1073/pnas.1005077107](https://doi.org/10.1073/pnas.1005077107)
- Benjamini Y**, Hochberg Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society* **57**:289–300.
- Bourai M**, Lucas-Hourani M, Gad HH, Drosten C, Jacob Y, Tafforeau L, Cassonnet P, Jones LM, Judith D, Couderc T, Lecuit M, André P, Kümmerer BM, Lotteau V, Desprès P, Tangy F, Vidalain PO. 2012. Mapping of Chikungunya virus interactions with host proteins identified nsP2 as a highly connected viral component. *Journal of Virology* **86**:3121–3134. doi: [10.1128/JVI.06390-11](https://doi.org/10.1128/JVI.06390-11)
- Bréhin AC**, Rubrecht L, Navarro-Sanchez ME, Maréchal V, Frenkiel MP, Lapalud P, Laune D, Sall AA, Desprès P. 2008. Production and characterization of mouse monoclonal antibodies reactive to Chikungunya envelope E2 glycoprotein. *Virology* **371**:185–195. doi: [10.1016/j.virol.2007.09.028](https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.09.028)
- Bruns AM**, Horvath CM. 2012. Activation of RIG-I-like receptor signal transduction. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **47**:194–206. doi: [10.3109/10409238.2011.630974](https://doi.org/10.3109/10409238.2011.630974)
- Bruns AM**, Pollpeter D, Hadizadeh N, Myong S, Marko JF, Horvath CM. 2013. ATP hydrolysis enhances RNA recognition and antiviral signal transduction by the innate immune sensor, laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2). *The Journal of Biological Chemistry* **288**:938–946. doi: [10.1074/jbc.M112.424416](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.424416)
- Bruns AM**, Leser GP, Lamb RA, Horvath CM. 2014. The innate immune sensor LGP2 activates antiviral signaling by regulating MDA5-RNA interaction and filament assembly. *Molecular Cell* **55**:771–781. doi: [10.1016/j.molcel.2014.07.003](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.07.003)
- Cattaneo R**, Rebmann G, Schmid A, Baczko K, ter Meulen V, Billeter MA. 1987. Altered transcription of a defective measles virus genome derived from a diseased human brain. *EMBO Journal* **6**:681–688.
- Chen R**, Wang E, Tsetsarkin KA, Weaver SC. 2013. Chikungunya virus 3' untranslated region: adaptation to mosquitoes and a population bottleneck as major evolutionary forces. *PLoS Pathogens* **9**:e1003591. doi: [10.1371/journal.ppat.1003591](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003591)
- Cheng G**, Wang LC, Fridlender ZG, Cheng GS, Chen B, Mangalmurti NS, Saloura V, Yu Z, Kapoor V, Mozdzanowska K, Moon E, Sun J, Kreindler JL, Cohen NA, Caton AJ, Erikson J, Albelda SM. 2011. Pharmacologic activation of the innate immune system to prevent respiratory viral infections. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **45**:480–488. doi: [10.1165/rcmb.2010-0288OC](https://doi.org/10.1165/rcmb.2010-0288OC)
- Childs KS**, Randall RE, Goodbourn S. 2013. LGP2 plays a critical role in sensitizing mda-5 to activation by double-stranded RNA. *PLoS One* **8**:e64202. doi: [10.1371/journal.pone.0064202](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064202)
- Chiu YH**, Macmillan JB, Chen ZJ. 2009. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* **138**:576–591. doi: [10.1016/j.cell.2009.06.015](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.015)
- Choi MK**, Wang Z, Ban T, Yanai H, Lu Y, Koshiba R, Nakaima Y, Hangai S, Savitsky D, Nakasato M, Negishi H, Takeuchi O, Honda K, Akira S, Tamura T, Taniguchi T. 2009. A selective contribution of the RIG-I-like receptor pathway to type I interferon responses activated by cytosolic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**:17870–17875. doi: [10.1073/pnas.0909545106](https://doi.org/10.1073/pnas.0909545106)



- Combredet C**, Labrousse V, Mollet L, Lorin C, Delebecque F, Hurtrel B, McClure H, Feinberg MB, Brahic M, Tangy F. 2003. A molecularly cloned Schwarz strain of measles virus vaccine induces strong immune responses in macaques and transgenic mice. *Journal of Virology* **77**:11546–11554 . doi: [10.1128/JVI.77.21.11546-11554.2003](https://doi.org/10.1128/JVI.77.21.11546-11554.2003)
- de Veer MJ**, Holko M, Frevel M, Walker E, Der S, Paranjape JM, Silverman RH, Williams BR. 2001. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *Journal of Leukocyte Biology* **69**:912–920.
- Deddouche S**, Goubau D, Rehwinkel J, Chakravarty P, Begum S, Maillard PV, Borg A, Matthews N, Feng Q, van Kuppeveld FJ, Reis e Sousa C. 2014. Identification of an LGP2-associated MDA5 agonist in picornavirus-infected cells. *eLife* **3**:e01535. doi: [10.7554/eLife.01535](https://doi.org/10.7554/eLife.01535)
- Dixit E**, Kagan JC. 2013. Intracellular pathogen detection by RIG-I-like receptors. *Advances in Immunology* **117**:99–125. doi: [10.1016/B978-0-12-410524-9.00004-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410524-9.00004-9)
- Errett JS**, Gale M. 2015. Emerging complexity and new roles for the RIG-I-like receptors in innate antiviral immunity. *Virologica Sinica* **30**:163–173. doi: [10.1007/s12250-015-3604-5](https://doi.org/10.1007/s12250-015-3604-5)
- Es-Saad S**, Tremblay N, Baril M, Lamarre D. 2012. Regulators of innate immunity as novel targets for panviral therapeutics. *Current Opinion in Virology* **2**:622–628. doi: [10.1016/j.coviro.2012.08.009](https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.08.009)
- Garmashova N**, Gorchakov R, Frolova E, Frolov I. 2006. Sindbis virus nonstructural protein nsP2 is cytotoxic and inhibits cellular transcription. *Journal of Virology* **80**:5686–5696. doi: [10.1128/JVI.02739-05](https://doi.org/10.1128/JVI.02739-05)
- Giraudon P**, Wild TF. 1981. Monoclonal antibodies against measles virus. *Journal of General Virology* **54**:325–332. doi: [10.1099/0022-1317-54-2-325](https://doi.org/10.1099/0022-1317-54-2-325)
- Goubau D**, Deddouche S, Reis e Sousa C. 2013. Cytosolic sensing of viruses. *Immunity* **38**:855–869. doi: [10.1016/j.immuni.2013.05.007](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.007)
- Guo F**, Mead J, Aliya N, Wang L, Cuconati A, Wei L, Li K, Block TM, Guo JT, Chang J. 2012. RO 90-7501 enhances TLR3 and RLR agonist induced antiviral response. *PloS One* **7**:e42583. doi: [10.1371/journal.pone.0042583](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042583)
- Henrik Gad H**, Paulous S, Belarbi E, Diancourt L, Drosten C, Kümmerer BM, Plate AE, Caro V, Desprès P. 2012. The E2-E166K substitution restores Chikungunya virus growth in OAS3 expressing cells by acting on viral entry. *Virology* **434**:27–37. doi: [10.1016/j.virol.2012.07.019](https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.07.019)
- Ikegame S**, Takeda M, Ohno S, Nakatsu Y, Nakanishi Y, Yanagi Y. 2010. Both RIG-I and MDA5 RNA helicases contribute to the induction of alpha/beta interferon in measles virus-infected human cells. *Journal of Virology* **84**:372–379. doi: [10.1128/JVI.01690-09](https://doi.org/10.1128/JVI.01690-09)
- Jagla B**, Wiswedel B, Coppée JY. 2011. Extending KNIME for next-generation sequencing data analysis. *Bioinformatics* **27**. doi: [10.1093/bioinformatics/btr478](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr478)
- Kato H**, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, Hiiragi A, Dermody TS, Fujita T, Akira S. 2008. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *The Journal of Experimental Medicine* **205**:1601–1610. doi: [10.1084/jem.20080091](https://doi.org/10.1084/jem.20080091)
- Kell A**, Stoddard M, Li H, Marcotrigiano J, Shaw GM, Gale M. 2015. Pathogen-Associated Molecular Pattern Recognition of Hepatitis C Virus Transmitted/Founder Variants by RIG-I Is Dependent on U-Core Length. *Journal of Virology* **89**:11056–11068. doi: [10.1128/JVI.01964-15](https://doi.org/10.1128/JVI.01964-15)
- Komarova AV**, Combredet C, Meyniel-Schicklin L, Chapelle M, Caignard G, Camadro JM, Lotteau V, Vidalain PO, Tangy F. 2011. Proteomic analysis of virus-host interactions in an infectious context using recombinant viruses. *Molecular & Cellular Proteomics* **10**:M110.007443. doi: [10.1074/mcp.M110.007443](https://doi.org/10.1074/mcp.M110.007443)
- Komarova AV**, Combredet C, Sismeiro O, Dillies MA, Jagla B, Sanchez David RY, Vabret N, Coppée JY, Vidalain PO, Tangy F. 2013. Identification of RNA partners of viral proteins in infected cells. *RNA Biology* **10**. doi: [10.4161/rna.24453](https://doi.org/10.4161/rna.24453)
- Langmead B**, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology* **10**:R25. doi: [10.1186/gb-2009-10-3-r25](https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25)
- Li H**, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R. 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**:2078–2079. doi: [10.1093/bioinformatics/btp352](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352)
- Liddicoat BJ**, Piskol R, Chalk AM, Ramaswami G, Higuchi M, Hartner JC, Li JB, Seeburg PH, Walkley CR. 2015. RNA editing by ADAR1 prevents MDA5 sensing of endogenous dsRNA as nonself. *Science* **349**:1115–1120. doi: [10.1126/science.aac7049](https://doi.org/10.1126/science.aac7049)
- Liehl P**, Zuzarte-Luís V, Chan J, Zillinger T, Baptista F, Carapau D, Konert M, Hanson KK, Carret C, Lassnig C, Müller M, Kalinke U, Saeed M, Chora AF, Golenbock DT, Strobl B, Prudêncio M, Coelho LP, Kappe SH, Superti-Furga G, et al. 2014. Host-cell sensors for Plasmodium activate innate immunity against liver-stage infection. *Nature Medicine* **20**. doi: [10.1038/nm.3424](https://doi.org/10.1038/nm.3424)
- Lin R**, Génin P, Mamane Y, Hiscott J. 2000. Selective DNA binding and association with the CREB binding protein coactivator contribute to differential activation of alpha/beta interferon genes by interferon regulatory factors 3 and 7. *Molecular and Cellular Biology* **20**:6342–6353 . doi: [10.1128/MCB.20.17.6342-6353.2000](https://doi.org/10.1128/MCB.20.17.6342-6353.2000)
- Loo YM**, Gale M. 2011. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* **34**:680–692. doi: [10.1016/j.immuni.2011.05.003](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.003)
- Love MI**, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* **15**:550. doi: [10.1186/s13059-014-0550-8](https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8)
- Lucas-Hourani M**, Dauzonne D, Jorda P, Cousin G, Lupan A, Helynck O, Caignard G, Janvier G, André-Leroux G, Khier S, Escriou N, Desprès P, Jacob Y, Munier-Lehmann H, Tangy F, Vidalain PO. 2013. Inhibition of pyrimidine

- biosynthesis pathway suppresses viral growth through innate immunity. *PLoS Pathogens* **9**:e1003678. doi: [10.1371/journal.ppat.1003678](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003678)
- Malathi K**, Dong B, Gale M, Silverman RH. 2007. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* **448**:816–819. doi: [10.1038/nature06042](https://doi.org/10.1038/nature06042)
- Malathi K**, Saito T, Crochet N, Barton DJ, Gale M, Silverman RH. 2010. RNase L releases a small RNA from HCV RNA that refolds into a potent PAMP. *RNA* **16**:2108–2119. doi: [10.1261/rna.2244210](https://doi.org/10.1261/rna.2244210)
- Marriott AC**, Dimmock NJ. 2010. Defective interfering viruses and their potential as antiviral agents. *Reviews in Medical Virology* **20**:51–62. doi: [10.1002/rmv.641](https://doi.org/10.1002/rmv.641)
- Monroe KM**, McWhirter SM, Vance RE. 2009. Identification of host cytosolic sensors and bacterial factors regulating the type I interferon response to Legionella pneumophila. *PLoS Pathogens* **5**:e1000665. doi: [10.1371/journal.ppat.1000665](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000665)
- Moresco EM**, Beutler B. 2010. LGP2: positive about viral sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:1261–1262. doi: [10.1073/pnas.0914011107](https://doi.org/10.1073/pnas.0914011107)
- Motz C**, Schuhmann KM, Kirchhofer A, Moldt M, Witte G, Conzelmann KK, Hopfner KP. 2013. Paramyxovirus V proteins disrupt the fold of the RNA sensor MDA5 to inhibit antiviral signaling. *Science* **339**:690–693. doi: [10.1126/science.1230949](https://doi.org/10.1126/science.1230949)
- Patel JR**, García-Sastre A. 2014. Activation and regulation of pathogen sensor RIG-I. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **25**:513–523. doi: [10.1016/j.cytogfr.2014.08.005](https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.08.005)
- Peisley A**, Lin C, Wu B, Orme-Johnson M, Liu M, Walz T, Hur S. 2011. Cooperative assembly and dynamic disassembly of MDA5 filaments for viral dsRNA recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**:21010–21015. doi: [10.1073/pnas.1113651108](https://doi.org/10.1073/pnas.1113651108)
- Pichlmair A**, Schulz O, Tan CP, Rehwinkel J, Kato H, Takeuchi O, Akira S, Way M, Schiavo G, Reis e Sousa C. 2009. Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *Journal of Virology* **83**:10761–10769. doi: [10.1128/JVI.00770-09](https://doi.org/10.1128/JVI.00770-09)
- Plumet S**, Duprex WP, Gerlier D. 2005. Dynamics of viral RNA synthesis during measles virus infection. *Journal of Virology* **79**:6900–6908. doi: [10.1128/JVI.79.11.6900-6908.2005](https://doi.org/10.1128/JVI.79.11.6900-6908.2005)
- Pushko P**, Parker M, Ludwig GV, Davis NL, Johnston RE, Smith JF. 1997. Replicon-helper systems from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus: expression of heterologous genes in vitro and immunization against heterologous pathogens in vivo. *Virology* **239**:389–401. doi: [10.1006/viro.1997.8878](https://doi.org/10.1006/viro.1997.8878)
- Rehwinkel J**, Tan CP, Goubau D, Schulz O, Pichlmair A, Bier K, Robb N, Vreede F, Barclay W, Fodor E, Reis e Sousa C. 2010. RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection. *Cell* **140**:397–408. doi: [10.1016/j.cell.2010.01.020](https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.020)
- Runge S**, Sparrer KM, Lässig C, Hembach K, Baum A, García-Sastre A, Söding J, Conzelmann KK, Hopfner KP. 2014. In vivo ligands of MDA5 and RIG-I in measles virus-infected cells. *PLoS Pathogens* **10**:e1004081. doi: [10.1371/journal.ppat.1004081](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004081)
- Saito T**, Owen DM, Jiang F, Marcotrigiano J, Gale M. 2008. Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature* **454**:523–527. doi: [10.1038/nature07106](https://doi.org/10.1038/nature07106)
- Sato S**, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, Watanabe T, Iijima S, Sakurai Y, Watashi K, Tsutsumi S, Sato Y, Akita H, Wakita T, Rice CM, Harashima H, Kohara M, Tanaka Y, Takaoka A. 2015. The RNA sensor RIG-I dually functions as an innate sensor and direct antiviral factor for hepatitis B virus. *Immunity* **42**:123–132. doi: [10.1016/j.immuni.2014.12.016](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.016)
- Satoh T**, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, Tsujimura T, Fujita T, Akira S, Takeuchi O. 2010. LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:1512–1517. doi: [10.1073/pnas.0912986107](https://doi.org/10.1073/pnas.0912986107)
- Schilte C**, Couderc T, Chretien F, Sourisseau M, Gangneux N, Guivel-Benhassine F, Kraxner A, Tschopp J, Higgs S, Michault A, Arenzana-Seisdedos F, Colonna M, Peduto L, Schwartz O, Lecuit M, Albert ML. 2010. Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells. *Journal of Experimental Medicine* **207**:429–442. doi: [10.1084/jem.20090851](https://doi.org/10.1084/jem.20090851)
- Schnell G**, Loo YM, Marcotrigiano J, Gale M. 2012. Uridine composition of the poly-U/UC tract of HCV RNA defines non-self recognition by RIG-I. *PLoS Pathogens* **8**:e1002839. doi: [10.1371/journal.ppat.1002839](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002839)
- Schuffenecker I**, Itean I, Michault A, Murri S, Frangeul L, Vaney MC, Lavenir R, Pardigon N, Reynes JM, Pettinelli F, Biscornet L, Diancourt L, Michel S, Duquerroy S, Guigon G, Frenkiel MP, Bréhin AC, Cubito N, Desprès P, Kunst F, et al. 2006. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Medicine* **3**:e263. doi: [10.1371/journal.pmed.0030263](https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030263)
- Shingai M**, Ebihara T, Begum NA, Kato A, Honma T, Matsumoto K, Saito H, Ogura H, Matsumoto M, Seya T. 2007. Differential type I IFN-inducing abilities of wild-type versus vaccine strains of measles virus. *Journal of Immunology* **179**:6123–6133. doi: [10.4049/jimmunol.179.9.6123](https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.9.6123)
- Shirey KA**, Nhu QM, Yim KC, Roberts ZJ, Teijaro JR, Farber DL, Blanco JC, Vogel SN. 2011. The anti-tumor agent, 5,6-dimethylxanthone-4-acetic acid (DMXAA), induces IFN-beta-mediated antiviral activity in vitro and in vivo. *Journal of Leukocyte Biology* **89**:351–357. doi: [10.1189/jlb.0410216](https://doi.org/10.1189/jlb.0410216)
- Strahle L**, Garcin D, Kolakofsky D. 2006. Sendai virus defective-interfering genomes and the activation of interferon-beta. *Virology* **351**:101–111. doi: [10.1016/j.virol.2006.03.022](https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.03.022)
- Strauss JH**, Strauss EG. 1994. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiological Reviews* **58**:491–562.
- Team RC**. 2013. *R Foundation for Statistical Computing*. Vienna Austria.

- Triana-Alonso FJ**, Dabrowski M, Wadzack J, Nierhaus KH. 1995. Self-coded 3'-extension of run-off transcripts produces aberrant products during in vitro transcription with T7 RNA polymerase. *The Journal of Biological Chemistry* **270**:6298–6307 . doi: [10.1074/jbc.270.11.6298](https://doi.org/10.1074/jbc.270.11.6298)
- Vasseur E**, Patin E, Laval G, Pajon S, Fornarino S, Crouau-Roy B, Quintana-Murci L. 2011. The selective footprints of viral pressures at the human RIG-I-like receptor family. *Human Molecular Genetics* **20**:4462–4474. doi: [10.1093/hmg/ddr377](https://doi.org/10.1093/hmg/ddr377)
- Venkataraman T**, Valdes M, Elsay R, Kakuta S, Caceres G, Saijo S, Iwakura Y, Barber GN. 2007. Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. *Journal of Immunology* **178**:6444–6455 . doi: [10.4049/jimmunol.178.10.6444](https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.10.6444)
- White LK**, Sali T, Alvarado D, Gatti E, Pierre P, Streblow D, Defilippis VR. 2011. Chikungunya virus induces IPS-1-dependent innate immune activation and protein kinase R-independent translational shutoff. *Journal of Virology* **85**:606–620. doi: [10.1128/JVI.00767-10](https://doi.org/10.1128/JVI.00767-10)
- Wu B**, Peisley A, Richards C, Yao H, Zeng X, Lin C, Chu F, Walz T, Hur S. 2013. Structural basis for dsRNA recognition, filament formation, and antiviral signal activation by MDA5. *Cell* **152**:276–289. doi: [10.1016/j.cell.2012.11.048](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.048)
- Yoneyama M**, Onomoto K, Jogi M, Akaboshi T, Fujita T. 2015. Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. *Current Opinion in Immunology* **32**:48–53. doi: [10.1016/j.coi.2014.12.012](https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.12.012)
- Zhang HX**, Liu ZX, Sun YP, Zhu J, Lu SY, Liu XS, Huang QH, Xie YY, Zhu HB, Dang SY, Chen HF, Zheng GY, Li YX, Kuang Y, Fei J, Chen SJ, Chen Z, Wang ZG. 2013a. RIG-I regulates NF- $\kappa$ B activity through binding to Nf- $\kappa$ b1 3'-UTR mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**:6459–6464. doi: [10.1073/pnas.1304432110](https://doi.org/10.1073/pnas.1304432110)
- Zhang Y**, Si BY, Kang XP, Hu Y, Li J, Wu XY, Li YC, Yang YH, Zhu QY. 2013b. The confirmation of three repeated sequence elements in the 3' untranslated region of Chikungunya virus. *Virus Genes* **46**:165–166. doi: [10.1007/s11262-012-0835-5](https://doi.org/10.1007/s11262-012-0835-5)
- Zufferey R**, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D. 1997. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nature Biotechnology* **15**:871–875. doi: [10.1038/nbt0997-871](https://doi.org/10.1038/nbt0997-871)

## Résumé

Le vaccin vivant rougeole a été atténué dans les années 1960 par passages successifs en culture de cellules embryonnaires de poulet. C'est un vaccin très sûr et efficace qui confère une protection à vie. L'essor de la génétique inverse a permis son développement comme vecteur vaccinal, et ouvre de nouvelles perspectives vaccinales pour la prévention des maladies émergentes ou négligées, comme le paludisme, problème de santé publique mondial mais également pour les forces armées françaises. Les bases moléculaires de l'atténuation restent encore partiellement incomprises, mais impliquent des modifications de stimulation de la voie interféron de type I (IFN-I) et du tropisme cellulaire. La stimulation de la voie IFN-I par les souches vaccinales apparaît comme étroitement liée à la présence de génomes défectifs interférents (DI-RNA). Nous avons ainsi recherché et caractérisé de façon systématique les DI-RNAs produits par la plateforme vaccinale rougeole, puis validé leurs fonctions immunostimulatrices par leur liaison spécifique aux récepteurs cytosoliques de l'immunité innée RIG-I et LGP2. La modification du tropisme cellulaire a été décrite comme dépendante du récepteur humain ubiquitaire CD46. Cependant, nous avons montré *in vivo* sur modèle murin que ce récepteur n'est pas essentiel et que seule la barrière IFN-I restreint la réplication virale. Enfin, nous avons développé une stratégie vaccinale antipaludique vectorisée par la rougeole reposant sur l'effet adjuvant des DI-RNAs produits par les vaccins recombinants rougeole.

**Mots-clés :** virus de la rougeole, vaccin vivant atténué, génomes défectifs interférents, barrière d'espèce, tropisme cellulaire, immunité innée, vaccin antipaludique, adjuvant

## Abstract

Measles virus has been attenuated in the 60s after multiple passages in chicken embryo cell culture. It is one of the most efficient and safe vaccines, conferring life-long protection. Thanks to reverse genetics revolution, it is now used as an efficient viral vaccine platform that open new opportunities to develop vaccines against emerging or neglected diseases, as malaria, which remains an issue for global health but also for the French armed forces. The molecular bases of measles attenuation are still not fully elucidated, but mainly lie on type-I interferon (IFN-I) stimulation and cellular tropism. IFN-I stimulation by vaccine strains was linked to the presence of defective interfering genomes (DI-RNAs). Thus, we characterized the DI-RNAs produced by various recombinant measles viruses and studied their immunostimulatory properties after their specific recognition by immune sensors of innate immunity RIG-I and LGP2. Modification of cellular tropism has long been described as dependent on human ubiquitous CD46 receptor. Nevertheless, we showed *in vivo* on murine model that hCD46 is not required for measles vaccine replication and that only IFN-I restricted host susceptibility. Finally, we developed an antimalarial vaccine strategy using measles vector by using adjuvant effect of DI-RNAs naturally produced by recombinant measles vaccines.

**Key words:** Measles virus, live attenuated vaccine, defective interfering genomes, host restriction, cellular tropism, innate immunity, antimalarial vaccine, adjuvant