



**HAL**  
open science

# Analyse et exploitation de signatures transcriptomiques de patients infectés par des virus respiratoires en vue du repositionnement de médicaments pour de nouvelles indications thérapeutiques antivirales

Claire Nicolas de Lamballerie

## ► To cite this version:

Claire Nicolas de Lamballerie. Analyse et exploitation de signatures transcriptomiques de patients infectés par des virus respiratoires en vue du repositionnement de médicaments pour de nouvelles indications thérapeutiques antivirales. Bio-informatique [q-bio.QM]. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1118 . tel-03307577

**HAL Id: tel-03307577**

**<https://theses.hal.science/tel-03307577>**

Submitted on 29 Jul 2021

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

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



N° d'ordre NNT : 2020LYSE1118

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

**Ecole Doctorale N° 341**  
**Ecosystèmes Evolution Modélisation Microbiologie**

**Spécialité de doctorat** : Virologie et Bioinformatique

Soutenue publiquement le 13 juillet 2020 par :  
**Claire Nicolas de Lamballerie**

---

**Analyse et exploitation de signatures transcriptomiques de patients infectés par des virus respiratoires en vue du repositionnement de médicaments pour de nouvelles indications thérapeutiques antivirales**

---

Devant le jury composé de :

|    |                                 |                                 |  |                        |
|----|---------------------------------|---------------------------------|--|------------------------|
| Dr | <b>Pillet Sylvie</b>            | MCU-PH                          | Université Jean Monnet                         | Rapporteur             |
| Dr | <b>Le Goffic Ronan</b>          | Directeur de recherche          | INRAE  | Rapporteur             |
| Pr | <b>Doublet Patricia</b>         | Professeuse des Universités     | Université Claude Bernard Lyon 1               | Examineur              |
| Pr | <b>Trottein François</b>        | Directeur de recherche          | CNRS   | Examineur              |
| Dr | <b>Manuel Rosa-Calatrava</b>    | Directeur de recherche          | INSERM   | Directeur de thèse     |
| Dr | <b>Catherine Legras-Lachuer</b> | MCU                             | Université Claude Bernard Lyon 1<br>Viroscan3D | Co-directrice de thèse |
| Dr | <b>Textoris Julien</b>          | PH-Direction affaires médicales | Biomérieux                                     | Invité                 |



## **Université Claude Bernard – LYON 1**

|   |                         |
|---|-------------------------|
| Président de l'Université                                       | M. Frédéric FLEURY      |
| Président du Conseil Académique                                 | M. Hamda BEN HADID      |
| Vice-Président du Conseil d'Administration                      | M. Didier REVEL         |
| Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire | M. Philippe CHEVALLIER  |
| Vice-Président de la Commission de Recherche                    | M. Jean-François MORNEX |
| Directeur Général des Services                                  | M. Damien VERHAEGHE     |

## **COMPOSANTES SANTE**

|   |  |
|---|--|
| Faculté de Médecine Lyon-Est – Claude Bernard                       | Doyen : M. Gilles RODE                 |
| Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud Charles. Mérieux         | Doyenne : Mme Carole BURILLON          |
| UFR d'Odontologie   | Doyenne : Mme Dominique SEUX           |
| Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques                | Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA |
| Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation              | Directeur : M. Xavier PERROT           |
| Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine | Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT     |

## **COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE**

|   |  |
|---|--|
| UFR Biosciences   | Directrice : Mme Kathrin GIESELER                |
| Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)            | Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO                |
| Département Informatique                                      | Directeur : M. Behzad SHARIAT                    |
| Département Mécanique   | Directeur M. Marc BUFFAT                         |
| UFR - Faculté des Sciences                                    | Administrateur provisoire : M. Bruno ANDRIOLETTI |
| UFR (STAPS)   | Directeur : M. Yannick VANPOULLE                 |
| Observatoire de Lyon  | Directrice : Mme Isabelle DANIEL                 |
| Ecole Polytechnique Universitaire Lyon 1                      | Directeur : Emmanuel PERRIN                      |
| Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon) | Directeur : Gérard PIGNAULT                      |
| Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1               | Directeur : M. Christophe VITON                  |
| Institut de Science Financière et d'Assurances                | Directeur : M. Nicolas LEBOISNE                  |
| ESPE  | Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON  |



## Résumé

Les infections respiratoires aiguës (IRAs) sont causées par de nombreux pathogènes et parmi eux, les virus respiratoires tiennent une place très privilégiée. Les études épidémiologiques mettent en lumière de nombreux cas d'infections causées par des rhinovirus, des adénovirus, des pneumovirus (Virus Respiratoire Syncytial et Méta-pneumovirus humain) ou encore des coronavirus, mais également des virus influenza et parainfluenza. Les jeunes enfants et les personnes immunodéprimées ou âgées sont considérés comme des populations à risque, mais aucune tranche d'âge n'est épargnée par ces infections virales respiratoires. Celles-ci constituent de ce fait une cause majeure de consultations, d'hospitalisations et de décès dans les pays en développement, mais aussi industrialisés. Elles sont la première cause de mortalité chez les jeunes enfants (plus de 2 millions de morts par an) et leur coût direct annuel pour nos sociétés est estimé à 2.5 milliards d'euros. Malgré cela, l'arsenal thérapeutique et / ou prophylactique est très peu fourni ou inexistant, excepté en ce qui concerne les virus influenza, dont les solutions restent malgré tout, limitées. L'émergence de souches influenza résistantes aux quelques antiviraux sur le marché est en effet une source de préoccupation importante, au même titre que la protection conférée par les vaccins annuels qui est parfois sous-optimale, du fait de la grande variabilité des souches virales saisonnières.

Dans ce contexte de besoins médicaux non pourvus et d'enjeux sanitaires et économiques majeurs, mon travail de thèse s'est inscrit dans un programme de recherche (RESPIROMIX) visant à proposer une stratégie innovante de développement d'antiviraux, basée sur le repositionnement de médicaments déjà sur le marché pour de nouvelles indications thérapeutiques anti-infectieuses. Mon travail s'est focalisé sur la caractérisation et l'exploitation de signatures transcriptomiques d'infections *in vivo* (banque d'échantillons biologiques de patients infectés) et *in vitro* (modèle d'épithéliums respiratoires humains cultivés en interface air/liquide), obtenues par hybridation sur puces Affymetrix et par séquençage à haut débit (NGS), respectivement. Nos choix éclairés d'outils et la mise en place d'un pipeline adapté et optimisé ont permis l'analyse différentielle et fonctionnelle de ces signatures virogénomiques, ainsi que leur comparaison avec un ensemble de signatures chemogénomiques, issues de la base de données Connectivity Map (CMap). Cette base de données est une collection de données d'expression issues de cellules humaines en culture, traitées ou non avec de petites molécules bioactives (plus de 7 000 profils d'expression génique correspondant à 1 309 composés).

Mes résultats ont notamment contribué (i) à l'identification et au repositionnement comme inhibiteur des virus influenza du diltiazem, un médicament usuellement utilisé comme

antihypertenseur, et (ii) à la caractérisation en modèles *in vitro* et murin de son mode d'action (MoA), qui se traduit par l'activation endogène des gènes codant pour les interférons de type III et des voies de biosynthèse métabolique. Ces résultats ont ainsi permis la mise en place d'un essai clinique multicentrique de phase II (FLUNEXT TRIAL PHRC n°15-0442), visant à évaluer le Diltiazem dans la prise en charge de patients admis en réanimation pour des gripes sévères.

Dans la même dynamique, la méthodologie et le pipeline développés au cours de mon travail doctoral ont également conduit, sur la base de signatures de patients infectés, à la sélection de plusieurs autres médicaments pour leur repositionnement thérapeutique contre les infections à pneumovirus (HRSV et HMPV). Certains de ces candidats, sont actuellement en cours de validation dans nos modèles *in vitro* et murin d'infections.

Mots clefs: Virus Influenza, Métapneumovirus humain (HMPV), Virus Respiratoire Syncytial Humain (HRSV), modèle d'épithélium respiratoire humain, transcriptome, *Next-Generation Sequencing* (NGS), antiviraux, repositionnement de médicaments.

## Abstract

Acute respiratory infections (ARIs) are caused by many pathogens and among them, respiratory viruses hold a very privileged place. Epidemiological studies have highlighted numerous cases of infections caused by rhinoviruses, adenoviruses, pneumoviruses (Respiratory Syncytial Virus and Human Metapneumovirus) or even coronaviruses, but also influenza and parainfluenza viruses. Young children and immunocompromised or elderly people are considered at risk populations, but no age group is spared from these viral respiratory infections. These remain a major cause of consultations, hospitalizations and deaths in both developing and industrialized countries. They are the leading cause of death in young children (more than 2 million deaths per year) and their annual direct cost to our societies is estimated at 2.5 billion euros. Despite this, the therapeutic and / or prophylactic arsenal is very scarce except for influenza viruses, but remains nevertheless limited. The emergence of influenza strains resistant to the few antivirals on the market is indeed a source of major concern, as is the protection conferred by annual vaccines which is sometimes suboptimal, due to the variability of seasonal viral strains.

In this context of unmet medical needs and major health and economic issues, my thesis work was part of a research program (RESPIROMIX) which proposes an innovative strategy for the development of antivirals, based on the repositioning of drugs already on the market for new anti-infectious therapeutic indications. My work focused on the characterization and exploitation of transcriptomic signatures of *in vivo* (bank of biological samples from infected patients) and *in vitro* (model of human respiratory epithelium cultivated at the air / liquid interface) infections, obtained by hybridization on Affymetrix chips and by high throughput sequencing (NGS), respectively. Our informed choice of tools and the implementation of an adapted and optimized pipeline enabled the differential and functional analyses of these virogenomic signatures, as well as their comparison with a set of chemogenomic signatures, from the Connectivity Map database (CMap). This database is a collection of expression data from human cells in culture treated or not with small bioactive molecules (more than 7 000 gene expression profiles corresponding to 1 309 compounds).

My results have notably contributed to (i) the identification and repositioning of Diltiazem, a drug usually used as an antihypertensive, as an inhibitor of influenza viruses, and (ii) the characterization in experimental *in vitro* and murine models of diltiazem mode of action (MoA), which leads to the endogenous activation of type III interferon genes and metabolic biosynthesis pathways. These results enabled the setup of a multicentric phase II clinical trial (FLUNEXT TRIAL

PHRC n°15-0442) aiming to evaluate the use of Diltiazem in the management of patients admitted to intensive care for severe influenza.

In the same dynamic, the methodology and pipeline developed during my doctoral work have also led, based on signatures of infected patients, to the selection of several drugs for their therapeutic repositioning against pneumovirus infections (HRSV and HMPV). Some of these candidates are currently being validated in our *in vitro* and murine models of infections.

Key words: Influenza Virus, Human Metapneumovirus (HMPV), Respiratory Syncytial Virus (HRSV), human respiratory epithelium model, Transcriptome, Next-Generation Sequencing (NGS), antivirals, drug repositioning.

## Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail. Je remercie particulièrement le Docteur Sylvie Pillet et le Docteur Ronan Le Goffic d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail doctoral. Je remercie également le Professeur Patricia Doublet et le Docteur François Trottein pour leur travail d'examineur. Je remercie le Docteur Julien Textoris pour ses conseils précieux durant cette thèse, mais aussi pour le temps qu'il a consacré à répondre à mes très nombreuses questions.

Je souhaite particulièrement remercier mes encadrants pour leur confiance et le temps qu'ils m'ont consacré. Je remercie le Docteur Catherine Legras-Lachuer, directrice de thèse, pour son accueil à ViroScan3D et ses conseils qui ont contribué à alimenter ma réflexion au cours de ces années. Je remercie également le Docteur Manuel Rosa-Calatrava, directeur de thèse, pour son soutien toujours renouvelé et son aide sans faille tout au long de ma thèse, qui ont été un élément clef dans l'aboutissement de ce projet. J'adresse toute ma gratitude au Docteur Olivier Terrier et au Docteur Mario Andrés Pizzorno pour leur patience, leur disponibilité et leurs conseils avertis ainsi que le Docteur Magali Roche qui a suivi le début de mes travaux de recherche. Travailler à leurs côtés aura été une véritable expérience scientifique et humaine. Leur soutien, leurs remarques et leurs conseils scientifiques ont constitué une aide précieuse dans la conduite de mon travail de recherche.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement le Professeur Bruno Lina, pour sa bienveillance et son accueil au sein du laboratoire VirPath et sans qui cette thèse n'aurait pas eu lieu. Mes remerciements vont aussi à l'Université Claude Bernard Lyon 1, l'école doctorale E2M2 ainsi qu'à l'Association nationale de la recherche et de la technologie (ANRT) qui a financé en partie mon travail de thèse.

Merci à mes amis et collègues (ou anciens) de ViroScan3D, de ProfileXpert et de VirPath/VirNext/VirHealth/Signia Therapeutics/Vaxxel. En particulier, Abdel, Maïlys, Thibault et Tarfa à Rockefeller, mais aussi Joël, Catherine et Séverine, qui ont pu suivre toute cette aventure et qui m'ont aidée, chacun et chacune à leur manière. Vos remarques et vos éclairages toujours utiles m'ont permis d'avancer pas à pas. Je pense aussi à Clément, Marie, les Julien(s), Camille, Paul, Anaïs ou Laury, qui continuent leurs routes au-delà de Grange-Blanche et Laennec. Merci à Thomas, Aurélien, Blandine, Caroline, Victoria, Laurent, Léa, Julien, et surtout Julia (quelle patience !) pour ces parties de mots fléchés endiablées mais surtout pour leur(s) relecture(s) et leur aide, leur

participation toujours bienveillante, leur bonne humeur et leur soutien moral durant ces années de doctorat.

Enfin, je tiens à remercier ma famille pour sa confiance et son support inestimable, l'aboutissement de cette thèse ayant été difficile mais sa réalisation aura été toujours passionnante et gratifiante. Sa complétion n'aura été possible que grâce au concours de toutes ces personnes, chacun de nos échanges m'aura aidé à faire avancer ce projet de thèse ambitieux.

## Avant-propos

À la suite d'études de biologie effectuées à l'Université d'Aix-Marseille (AMU) en spécialité physiologie (licence) puis Microbiologie (master MBVB, années 1 et 2), j'ai choisi d'approfondir mes connaissances en génomique et bioinformatique en intégrant la 2<sup>ème</sup> année du master BBSG. Les différents stages que j'ai pu effectuer m'ont permis d'aiguiser mon intérêt pour la virologie et la biologie des systèmes, que ce soit au niveau des préparations d'échantillons, de leur séquençage, mais également en ce qui concerne l'acquisition de données « omics », leur analyse et leur exploitation appliquée.

L'obtention en mars 2016 d'un financement CIFRE de l'ANRT, dans le cadre d'une collaboration entre le laboratoire VirPath et la société ViroScan3D visant à optimiser une stratégie innovante de repositionnement de médicaments initiée par le Dr Manuel Rosa-Calatrava et son groupe, a ainsi constitué une opportunité et un prolongement pratique idéal de mes études. En effet, les complémentarités de l'étude fondamentale des virus respiratoires et des technologies d'une plateforme de séquençage expérimentée m'ont permis d'allier connaissances théoriques et pratiques en recherche fondamentale et appliquée pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques antivirales. Ce travail s'est effectué dans un contexte de collaborations nationales et internationales, entre le Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL), le Centre d'Investigation Clinique du CHU de Lille (CHRU), les Hospices Civils de Lyon (HCL), l'institut Pasteur de Paris, l'université Laval et le CHU de Québec, la plateforme technologique lyonnaise Profilexpert, la société ViroScan3D et le laboratoire VirPath.

Dans ce contexte, mes travaux se sont focalisés sur le choix et l'utilisation d'outils bioinformatiques pour la mise en place d'un pipeline adapté permettant l'exploitation de signatures transcriptomiques de patients infectés par différents virus respiratoires dans le but d'identifier et de repositionner des médicaments pour de nouvelles indications thérapeutiques antivirales.

Un premier travail a été réalisé dans le but de repositionner des médicaments comme inhibiteur des virus influenza de type A (programme FLUNEXT). Ce travail a fait l'objet d'une demande internationale de dépôt de brevet (**Annexe 1**) et d'une publication dans le journal *Frontiers in Immunology* (**Article 1**). Dans ce cadre, les résultats générés ont notamment permis (i) l'identification et le repositionnement comme inhibiteur des virus influenza du diltiazem, un médicament usuellement utilisé comme antihypertenseur, et (ii) la caractérisation de son mode d'action (MoA) qui se traduit par l'activation endogène des gènes codant pour les voies de

biosynthèse du cholestérol et des interférons de type III en modèles *in vitro* et murin. Ces travaux ont ainsi contribué à la mise en place d'un essai clinique de phase II visant à évaluer le diltiazem dans la prise en charge de patients souffrant de gripes sévères et admis en réanimation (FLUNEXT TRIAL PHRC n°15-0442).

Du fait des difficultés d'exploitation des échantillons de patients, notamment de leur nature dégradée et de la faible quantité d'acides nucléiques qu'ils contiennent, nous avons cherché à évaluer la possibilité de travailler avec un modèle *in vitro* physiologique pertinent. Nous avons identifié et choisi le modèle d'épithélium respiratoire humain cultivé en interface air/liquide Mucilair™ (Epithelix) et avons caractérisé par séquençage à haut débit (RNAseq) dans ce modèle plusieurs signatures transcriptomiques d'infections par différents virus respiratoires (influenza, HRSV et HMPV). Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'un second article publié dans le journal *Scientific Reports* (**Article 2**). Cette étude nous a permis non seulement d'étoffer nos connaissances sur les relations hôte-virus (bouversements viro-induits de la réponse immunitaire et des battements ciliaires), mais également de valider ce modèle physiologique pour la définition par RNAseq de signatures d'infections virales d'intérêt et leur exploitation dans notre stratégie d'identification et de sélection de médicaments pour leur repositionnement pour de nouvelles indications thérapeutiques antivirales.

Nous avons enfin voulu évaluer la faisabilité d'application de notre démarche de repositionnement avec d'autres virus respiratoires. Nous avons donc mis à profit notre modèle d'épithélium respiratoire ainsi qu'un ensemble d'échantillons cliniques de patients infectés par le virus respiratoire syncytial humain (HRSV). Nous avons établi et interprété la signature transcriptomique de ces échantillons puis validé l'expression d'un panel de gènes grâce à notre modèle de travail. Les résultats obtenus sont présentés sous la forme d'un manuscrit qui a été accepté pour publication (**Manuscrit 1**). Ce travail a permis de (i) confirmer une modification profonde de l'expression des gènes associés à la réponse immunitaire qui constitue un reflet direct de la pathogenèse du HRSV, et (ii) de mettre en évidence de possibles biomarqueurs d'intérêt qu'il reste à confirmer, certains étant spécifiques des voies respiratoires. En appliquant notre stratégie de repositionnement, plusieurs médicaments déjà sur le marché ont été sélectionnés à partir ces résultats pour évaluer *in vitro* leur potentiel antiviral. Ils sont actuellement en cours d'évaluation au sein du laboratoire, dans le cadre du programme RESPIROMIX.

# Table des matières

|   |           |
|---|-----------|
| <b>RESUME</b> .....   | <b>5</b>  |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | <b>7</b>  |
| <b>REMERCIEMENTS</b> .....  | <b>9</b>  |
| <b>AVANT-PROPOS</b> .....   | <b>11</b> |
| <b>TABLE DES MATIERES</b> .....   | <b>13</b> |
| <b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b> .....  | <b>17</b> |
| <b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....   | <b>19</b> |
| <b>ABREVIATIONS</b> .....   | <b>21</b> |
| <b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....  | <b>25</b> |
| <b>CHAPITRE 1 : LES INFECTIONS RESPIRATOIRES AIGÜES (IRAs)</b> .....                    | <b>25</b> |
| <b>I. Généralités sur les infections respiratoires aigües (IRAs)</b> .....              | <b>25</b> |
| I . 1 . Définition des IRAs.....  | 25        |
| I . 2 . Enjeux sanitaires et économiques des IRAs .....                                 | 25        |
| <b>II . Présentation des différents virus respiratoires étudiés</b> .....               | <b>28</b> |
| II . 1 . Les virus influenza.....   | 28        |
| II . 1 . A . Classification .....   | 28        |
| II . 1 . B . Transmission des virus IAV .....   | 29        |
| II . 1 . C . Epidémiologie.....   | 30        |
| II . 1 . D . Symptômes grippaux.....  | 31        |
| II . 1 . E . Structure du virion et organisation .....                                  | 32        |
| II . 1 . F . Structure du génome, fonction des protéines et variabilité génomique ..... | 33        |
| II . 1 . G . Cycle de réplication des virus influenza .....                             | 35        |
| II . 2 . Les pneumovirus.....   | 37        |
| II . 2 . A . Classification .....   | 37        |
| II . 2 . B . Transmission des pneumovirus .....   | 39        |
| II . 2 . C . Epidémiologie.....   | 39        |
| II . 2 . D . Symptômes .....  | 40        |
| II . 2 . E . Structure du virion et organisation .....                                  | 41        |
| II . 2 . F . Structure du génome et fonction des protéines .....                        | 41        |
| II . 2 . G . Cycle de réplication des pneumovirus .....                                 | 43        |
| <b>III . Diagnostic viral</b> .....   | <b>45</b> |
| III . 1 . Diagnostic indirect .....   | 46        |
| III . 2 . Diagnostic direct .....   | 47        |
| <b>IV . Traitements</b> .....   | <b>50</b> |
| IV . 1 . Prophylaxie et vaccins .....   | 50        |
| IV . 2 . Traitements actuellement disponibles ou en cours de développement .....        | 55        |
| IV . 2 . A . Thérapies de soutien.....  | 55        |
| IV . 2 . B . Traitements antiviraux .....   | 55        |
| IV . 2 . B . a) Cas des virus influenza .....   | 55        |
| IV . 2 . B . a) i. Molécules sur le marché .....  | 55        |
| IV . 2 . B . a) i. 1) Les inhibiteurs de NA.....  | 56        |
| IV . 2 . B . a) i. 2) Les inhibiteurs de polymérase .....                               | 57        |
| IV . 2 . B . a) ii. Candidat médicaments en développement .....                         | 58        |
| IV . 2 . B . b) Cas des pneumovirus .....   | 60        |
| IV . 2 . B . b) i. HRSV.....  | 61        |
| IV . 2 . B . b) i. 1) Molécules sur le marché .....                                     | 61        |
| IV . 2 . B . b) i. 2) Candidat médicaments en développement .....                       | 62        |
| IV . 2 . B . b) ii. HMPV .....  | 63        |
| IV . 2 . B . b) ii. 1) Molécules sur le marché .....                                    | 63        |
| IV . 2 . B . b) ii. 1) Candidat médicaments en développement .....                      | 63        |
| <b>CHAPITRE 2 : LE REPOSITIONNEMENT DE MEDICAMENTS : PRINCIPE ET APPLICATIONS</b> ..... | <b>65</b> |
| <b>I. Développement classique d'un médicament</b> .....                                 | <b>65</b> |
| I . 1 . Définition d'un médicament.....   | 65        |
| I . 2 . Le marché du médicament en quelques chiffres clefs.....                         | 65        |

|  |   |           |
|--|---|-----------|
| I . 3 .  | La découverte d'un nouveau médicament : des prémices à son autorisation de mise sur le marché .....   | 67        |
| <b>II .</b>  | <b>Le repositionnement de médicaments .....</b>   | <b>70</b> |
| II . 1 .   | Définition du repositionnement de médicaments .....   | 70        |
| II . 2 .   | Le marché du repositionnement de médicaments .....  | 71        |
| II . 3 .   | Quelques exemples de repositionnement de médicaments réussis .....  | 71        |
| II . 4 .   | Exemples de repositionnement dans la grippe .....   | 73        |
| II . 5 .   | Principes et stratégies du repositionnement de médicaments : démarches expérimentales et<br>computationnelles .....                                     | 76        |
| II . 5 . A .   | Approches expérimentales .....  | 76        |
| II . 5 . A . a)  | Repositionnement de médicaments selon leur(s) cible(s) identifiée(s) <i>via</i> des effets « <i>On-target</i> » ou « <i>Off-target</i> » .....          | 76        |
| II . 5 . A . b)  | Approche complémentaire de criblage phénotypique pour le repositionnement de<br>médicaments .....   | 78        |
| II . 5 . B .   | Approches computationnelles : Criblage <i>in silico</i> et bases de données .....   | 80        |
| II . 5 . B . a)  | Définition du criblage virtuel .....  | 80        |
| II . 5 . B . b)  | Stratégies de repositionnement <i>in silico</i> .....   | 81        |
| II . 5 . B . b) i.   | La comparaison de signatures « OMICS » .....  | 81        |
| II . 5 . B . b) ii.  | Le docking moléculaire virtuel .....  | 83        |
| II . 5 . B . b) iii.   | Etudes d'association pangénomiques (Genome-wide association studies ou GWAS) .....  | 84        |
| II . 5 . B . b) iv.  | L'étude des voies biologiques et de leurs réseaux .....   | 85        |
| II . 5 . B . b) v.   | Etudes rétrospectives de données cliniques .....  | 85        |
| II . 5 . B . c)  | Bases de données .....  | 86        |
| II . 5 . B . c) i.   | Séquence, annotation, structure et interaction des protéines .....  | 86        |
| II . 5 . B . c) ii.  | Chimiothèques et données d'interactions .....   | 89        |
| II . 5 . B . c) iii.   | Séquences ADN et ARN .....  | 90        |
| II . 5 . B . c) iv.  | Fonctions moléculaires et processus biologiques .....   | 92        |
| II . 5 . B . c) v.   | Bases de données de séquençage ou biopuces .....  | 94        |
| II . 5 . B . c) vi.  | Données cliniques .....   | 94        |
| CHAPITRE 3 :   | APPLICATION DE L'APPROCHE TRANSCRIPTOMIQUE EN RECHERCHE CLINIQUE ET PHARMACEUTIQUE .....  | 97        |
| I .  | Contexte historique et définitions .....  | 97        |
| I . 1 .  | Quelques dates de référence .....   | 97        |
| I . 2 .  | Génomique fonctionnelle et transcriptome .....  | 99        |
| I . 3 .  | La transcriptomique .....   | 100       |
| II .   | Techniques d'analyse du transcriptome .....   | 101       |
| II . 1 .   | Isolation des ARN totaux .....  | 101       |
| II . 2 .   | Analyses à bas et moyen débit .....   | 102       |
| II . 3 .   | Analyses à haut débit .....   | 103       |
| II . 3 . A .   | Les puces à ADN .....   | 104       |
| II . 3 . B .   | Le séquençage à haut débit de 2 <sup>ème</sup> génération .....   | 106       |
| III .  | L'approche transcriptomique dans le diagnostic médical .....  | 110       |
| IV .   | L'approche transcriptomique dans le pronostic médical .....   | 111       |
| V .  | L'approche transcriptomique dans le développement de nouvelles thérapies .....  | 113       |
| <b>POSTULATS ET HYPOTHESES .....</b>   | <b>117</b>  |           |
| <b>RESULTATS - AVANCEES TECHNOLOGIQUES ET OPTIMISATION DE NOTRE APPROCHE VALORISANT LA<br/>TRANSCRIPTOMIQUE POUR LE REPOSITIONNEMENT DE MEDICAMENTS ANTIVIRAUX .....</b> | <b>123</b>  |           |
| I .  | Signatures transcriptomiques de patients pour le repositionnement de molécules anti-grippe<br>(Programme FLUNEXT) .....                                 | 123       |
| I . 1 .  | Résumé .....  | 124       |
| I . 2 .  | Article .....   | 129       |
| I . 3 .  | Discussion et perspectives de ce travail .....  | 147       |
| II .   | Signatures transcriptomiques d'infections virales par séquençage en modèle d'épithélium<br>respiratoire humain reconstitué (Programme RESPIROMIX) ..... | 149       |
| II . 1 .   | Résumé .....  | 149       |
| II . 2 .   | Article .....   | 153       |
| II . 3 .   | Discussion et perspectives de ce travail .....  | 165       |
| III .  | Signature transcriptomique <i>in vivo</i> d'infection à HRSV (Programme RESPIROMIX) .....   | 169       |
| III . 1 .  | Résumé .....  | 169       |
| III . 2 .  | Manuscrit .....   | 173       |
| III . 3 .  | Discussion et perspectives de ce travail .....  | 203       |
| <b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES GENERALES .....</b>  | <b>209</b>  |           |
| <b>ANNEXES .....</b>   | <b>213</b>  |           |

|  |            |
|--|------------|
| <i>Documents annexes</i> .....   | 213        |
| <i>Autres articles scientifiques</i> .....   | 217        |
| I . 1 . Strain-dependent impact of G and SH deletions provide new insights for live attenuated HMPV vaccine development .....                                      | 217        |
| I . 2 . Transcriptional profiling of immune and inflammatory responses in the context of SARS-CoV-2 fungal superinfection in a human airway epithelial model ..... | 235        |
| <b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....   | <b>259</b> |



## Table des illustrations

|   |     |
|---|-----|
| FIGURE 1 : VIRUS CIRCULANTS PENDANT LA SAISON 2017-2018 EN EUROPE ET RESULTATS PRELIMINAIRES PUBLIES POUR LA SAISON 2018-2019.....  | 31  |
| FIGURE 2: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ORGANISATION DE LA PARTICULE VIRALE DES VIRUS INFLUENZA A ET INFLUENZA B (PANEL A) ET VISUALISATION EN CRYO-MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DE DEUX SOUS-TYPES D'INFLUENZA A (PANEL B : H3N2 A/CALIFORNIA/7/04 ; PANEL C : H1N1 A/NEWCALEDONIA/20/99)..... | 32  |
| FIGURE 3 : ORGANISATION DU GENOME DES VIRUS INFLUENZA A ET B.....   | 33  |
| FIGURE 4: EVENEMENTS DE GLISSEMENTS ET CASSURES ANTIGENIQUES DES VIRUS INFLUENZA.....   | 35  |
| FIGURE 5: SCHEMA DU CYCLE REPLICATIF DES VIRUS INFLUENZA.....   | 37  |
| FIGURE 6: REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'ORGANISATION DE LA PARTICULE VIRALE DU METAPNEUMOVIRUS HUMAIN ET VISUALISATION EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.....  | 41  |
| FIGURE 7: ORGANISATION DU GENOME DES PNEUMOVIRUS HMPV ET HRSV.....  | 42  |
| FIGURE 8: CYCLE VIRAL DES PNEUMOVIRUS.....  | 45  |
| FIGURE 9 : METHODES DE DIAGNOSTIC INDIRECT OU DIRECT.....   | 46  |
| FIGURE 10: FABRICATION DU VACCIN INACTIVE INFLUENZA A.....  | 51  |
| FIGURE 11: DE LA DECOUVERTE D'UN COMPOSE INTERESSANT A SA MISE SUR LE MARCHE, LA ROUTE DU DEVELOPPMENT DE NOVO EST LONGUE.....  | 68  |
| FIGURE 12: UNE DUREE DE DEVELOPPMENT RACCOURCIE POUR LES MEDICAMENTS REPOSITIONNES, SYNONYME D'UNE REDUCTION DES COUTS ET DES RISQUES.....  | 71  |
| FIGURE 13 : LE REPOSITIONNEMENT DE MOLECULES SELON LEUR(S) CIBLE(S).....  | 77  |
| FIGURE 14: METHODE DE CIBLAGE DE MOLECULES SUR LE MODELE DE POISSON-ZEBRE.....  | 79  |
| FIGURE 15: CIBLAGE VIRTUEL.....   | 81  |
| FIGURE 16 : DESIGN IN SILICO DE NOUVEAUX MEDICAMENTS.....   | 84  |
| FIGURE 17: EVOLUTION DES COUTS DE SEQUENÇAGE DE 2001 A 2019.....  | 88  |
| FIGURE 18: STRUCTURE CRISTALLISEE DE LA NEURAMINIDASE DU H1N1 PANDEMIQUE COMPLEXEE AU ZANAMIVIR PUBLIEE PAR VAVRICKA ET AL. EN 2011.....  | 88  |
| FIGURE 19: VISUALISATION EN RESEAU DES ASSOCIATIONS CONNUES OU PREDITES ENTRE DEUX MEDICAMENTS ANTIHYPERTENSEURS : LE VERAPAMIL ET LE DILTIAZEM (HOMO SAPIENS).....   | 90  |
| FIGURE 20 : DOGME CENTRAL DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE.....   | 97  |
| FIGURE 21 : SEQUENÇAGE SANGER.....  | 98  |
| FIGURE 22 : DE L'ADN AUX PROTEINES.....   | 99  |
| FIGURE 23 : ANALYSES QUANTITATIVES ET TRANSCRIPTOME.....  | 100 |
| FIGURE 24 : LA TECHNOLOGIE NCOUNTER DE NANOSTRING.....  | 103 |
| FIGURE 25 : OBTENTION D'EST.....  | 104 |
| FIGURE 26 : PRINCIPE DES PUCES A ADN.....   | 104 |
| FIGURE 27 : EXEMPLES DE TECHNOLOGIES DE SEQUENÇAGE : 454 (ROCHE) VS ILLUMINA.....   | 107 |
| FIGURE 28 : STRATEGIES D'ENRICHISSEMENT COURAMMENT UTILISEES.....   | 108 |
| FIGURE 29 : ANALYSE DIFFERENTIELLE SUR DES DONNEES ISSUES DE NGS.....   | 109 |
| FIGURE 30 : ACTEURS DE LA REPOSE DE L'HOTE A L'INFECTION.....   | 112 |
| FIGURE 31 : GENES PRONOSTICS DE L'ABSENCE DE PROGRESSION VERS DES FORMES SEVERES D'UNE INFECTION AU HRSV.....   | 113 |
| FIGURE 32 : STRATEGIE POUR LA DECOUVERTE DE NOUVEAUX TRAITEMENTS ET / OU CIBLES THERAPEUTIQUES DU PSORIASIS.....  | 114 |
| FIGURE 33 : LE PROFIL GLOBAL D'EXPRESSION DES GENES COMME UNE SIGNATURE DE L'ETAT GLOBAL D'ACTIVITE CELLULAIRE.....   | 118 |
| FIGURE 34 : OPTIMISATION DE LA STRATEGIE DE REPOSITIONNEMENT.....   | 120 |
| FIGURE 35 : ARBRE DE DECISION AYANT MENE A LA SELECTION DE 35 MOLECULES QUI ONT ETE EVALUEES POUR LEUR POTENTIEL EFFET ANTIVIRAL.....   | 125 |
| FIGURE 36: VISUALISATION DE L'ENSEMBLE DES GENES ET DE LEURS PROTEINES MODULEES LORS D'UN TRAITEMENT AU DILTIAZEM.....  | 128 |
| FIGURE 37 : MODELE MUCILAIR™ (SOURCE : EPITHELIX).....  | 150 |
| FIGURE 37 : COMPARAISON DE DEUX METHODES DE SUMMARIZATION.....  | 204 |



## Liste des tableaux

|  |     |
|--|-----|
| TABLEAU 1: CARACTERISTIQUES DES PRINCIPAUX VIRUS A ARN RESPONSABLES D'IRAS.....  | 27  |
| TABLEAU 2: LISTE DES PROTEINES VIRALES CODEES ET EXPRIMEES PAR LE VIRUS MODELE INFLUENZA A/PUERTO RICO/8/1934 (H1N1)<br>HUMAIN, AINSI QUE LEUR(S) FONCTION(S).....                     | 34  |
| TABLEAU 3 : CARACTERISTIQUES DES PNEUMOVIRIDAE.....  | 38  |
| TABLEAU 4: RESUME DES PROTEINES VIRALES DES PNEUMOVIRUS.....   | 42  |
| TABLEAU 5 : ENSEMBLE DES TESTS DE DIAGNOSTIC PAR AMPLIFICATION APPROUVEES PAR LA FDA (2018) POUR LES INFECTIONS<br>RESPIRATOIRES.....  | 49  |
| TABLEAU 6: LISTE DES VACCINS ANTI-GRIPPE EN FRANCE ET AUX ETATS-UNIS (EN GRIS) EN 2018.....  | 52  |
| TABLEAU 7 : CANDIDATS-VACCIN HRSV.....   | 54  |
| TABLEAU 8: ANTIVIRAUX ACTUELLEMENT SUR LE MARCHE POUR LE TRAITEMENT D'INFECTIONS AUX VIRUS INFLUENZA HUMAINS.....  | 58  |
| TABLEAU 9: ANTIVIRAUX ET ANTICORPS EN COURS DE DEVELOPPEMENT POUR LE TRAITEMENT D'INFECTIONS PAR LES VIRUS INFLUENZA<br>.....  | 60  |
| TABLEAU 10: ANTIVIRAUX ACTUELLEMENT APPROUVEES POUR LE TRAITEMENT D'UNE INFECTION PAR LE HRSV.....   | 62  |
| TABLEAU 11: ANTIVIRAUX ET ANTICORPS EN COURS DE DEVELOPPEMENT POUR LE TRAITEMENT D'INFECTIONS PAR LE HRSV.....   | 62  |
| TABLEAU 12: STRATEGIES DE RECHERCHE POUR COMBATTRE LES INFECTIONS A HMPV.....  | 64  |
| TABLEAU 13: REPARTITION DES EXPORTATIONS FRANÇAISES DE MEDICAMENTS PAR ZONE GEOGRAPHIQUE EN 2017.....  | 66  |
| TABLEAU 14: COUT DU DEVELOPPEMENT D'UN MEDICAMENT.....   | 69  |
| TABLEAU 15: QUELQUES EXEMPLES RECENTS DE REPOSITIONNEMENT DE MEDICAMENTS.....  | 72  |
| TABLEAU 16 : CANDIDATS-MEDICAMENTS EN PHASES CLINIQUES D'ÉVALUATION POUR LE REPOSITIONNEMENT DE MEDICAMENTS POUR<br>LE TRAITEMENT DE PATIENTS INFECTES PAR DES VIRUS DE LA GRIPPE..... | 73  |
| TABLEAU 17 : COLLABORATION ENTRE LES PRINCIPALES BASES DE DONNEES DE NUCLEOTIDES MONDIALES.....  | 91  |
| TABLEAU 18 : GLOSSAIRE DES TERMES CLEFS ASSOCIES AUX TECHNOLOGIES DE NGS.....  | 106 |



## Abréviations

|          |  |
|----------|--|
| ADMET    | Absorption, Distribution, Métabolisme, Élimination et Toxicité                   |
| ADN      | Acide désoxyribonucléique  |
| AMM      | Autorisation de mise sur le marché   |
| ANSM     | Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé              |
| ARN      | Acide ribonucléique  |
| ARNc     | ARN complémentaire   |
| ARNi     | ARN interférant  |
| ARNm     | ARN messenger  |
| CDC      | <i>Center for Disease Control and Prevention</i>                                 |
| CMap     | <i>Connectivity map</i>  |
| ECP      | Effet cytopathique   |
| EMA      | Agence européenne des médicaments  |
| EMBL-EBI | <i>European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute</i> |
| ELISA    | <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>   |
| F        | Glycoprotéine de fusion  |
| FDA      | <i>Food and drug administration</i>  |
| G        | Glycoprotéine d'attachement  |
| GEO      | <i>Gene Expression Omnibus</i>   |
| GO       | <i>Gene ontology</i>   |
| GWAS     | <i>Genome-wide association studies</i>   |
| HA       | Hémagglutinine   |
| HAE      | <i>Human airway epithelium</i>   |
| HCoV     | Coronavirus humain   |
| HMPV     | Métapneumovirus humain   |
| hPIV     | Virus parainfluenza humains  |
| HRSV     | Virus Respiratoire Syncytial humain  |
| ICTV     | <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>                            |
| Ig       | Immunoglobuline  |
| IRA      | Infection respiratoire aigüe   |
| IV       | Virus Influenza  |
| kb       | kilo base  |
| KEGG     | <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>                                   |
| L        | Polymérase large   |

|          |  |
|----------|--|
| M        | Protéine de matrice                                  |
| Mab      | Anticorps monoclonal                                 |
| MAXRS    | <i>Maximum rank sum</i>                              |
| MDCK     | <i>Madin-Darby Canine Kidney</i>                     |
| MERS-CoV | <i>Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus</i>  |
| MOI      | <i>Multiplicity of infection</i>                     |
| NA       | Neuraminidase  |
| NCBI     | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| NGS      | <i>Next Generation Sequencing</i>                    |
| NHGRI    | <i>National Human Genome Research Institute</i>      |
| NIH      | <i>National Institutes of Health</i>                 |
| NP ou N  | Nucléoprotéine                                       |
| NS       | Protéine non structurale                             |
| OMS      | Organisation Mondiale de la Santé                    |
| P        | Phosphoprotéine                                      |
| PA       | <i>Polymerase acidic protein</i>                     |
| PB1-2    | <i>Polymerase basic 1-2</i>                          |
| PDB      | <i>Protein Data Bank</i>                             |
| PCR      | <i>Polymerase chain reaction</i>                     |
| RE       | Réticulum endoplasmique                              |
| RIN      | <i>RNA integrity number</i>                          |
| RNAseq   | <i>RNA sequencing</i>                                |
| RNPv     | Complexes ribonucléoprotéiques viraux                |
| SARS-CoV | <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus</i> |
| SH       | <i>Viroporine small hydrophobic</i>                  |
| SRA      | <i>Sequence Read Archive</i>                         |
| TB       | Tuberculose  |
| TEER     | Potentiel transmembranaire                           |
| VLP      | <i>Virus-like particle</i>                           |
| WIC      | <i>Worldwide Influenza Centre</i>                    |

## Introduction Générale



# Introduction générale

## Chapitre 1 : Les infections respiratoires aiguës (IRAs)

### I. Généralités sur les infections respiratoires aiguës (IRAs)

#### *I. 1. Définition des IRAs*

Les maladies respiratoires touchent les voies aériennes supérieures (voies nasales, larynx, gorge, oreilles) et / ou inférieures (trachée, bronches, bronchioles et poumons) et se distinguent en deux types de pathologies principales : (i) les pathologies chroniques telles que l'asthme et la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et (ii) les infections aiguës comme la pneumonie et la bronchite par exemple. Les rhinopharyngites, angines, otites moyennes, sinusites, laryngites aiguës affectent le tractus respiratoire haut, alors que les bronchiolites et les pneumonies aiguës affectent les voies basses. Les symptômes cliniques associés à ces IRAs dépendent de la nature des agents étiologiques pathogènes, ainsi que des facteurs environnementaux ou intrinsèques à l'hôte, tels que l'âge et / ou le statut immunitaire par exemple<sup>1</sup>.

#### *I. 2. Enjeux sanitaires et économiques des IRAs*

Les IRAs représentent une cause majeure de consultations, d'hospitalisations et de décès dans les pays industrialisés et / ou en développement, en particulier en ce qui concerne les enfants<sup>2,3</sup>. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les IRAs sont responsables de presque 2 millions de décès infantiles par an ; les pneumonies étant la première cause infectieuse de mortalité chez l'enfant<sup>4</sup>.

Chaque année, pour tenter de traiter les IRAs, le coût direct pour nos sociétés est estimé à 2.5 milliards d'euros. Ces coûts englobent les frais d'hospitalisation (examens, prise en charge, soins primaires) et de traitements (des symptômes et / ou des infections lorsque les traitements existent). En ce qui concerne les frais indirects (perte de production/perde de jours de travail ou retraites anticipées, handicaps ou encore décès prématurés), le coût des IRAs est estimé à plus de 43 milliards d'euros<sup>5</sup>.

Les agents étiologiques des IRAs les plus prévalents sont les virus respiratoires, tels que les virus influenza de type A et B (famille des *Orthomyxoviridae*), les virus parainfluenza humains (hPIV-1 à 4,

de la famille des *Paramyxoviridae*), les rhinovirus (*Picornaviridae*), les adénovirus (*Adenoviridae*), ainsi que plusieurs membres de la famille des *Pneumoviridae* : le Virus Respiratoire Syncytial humain (HRSV) et le Métapneumovirus humain (HMPV)<sup>6</sup> Certains membres de la famille des *Coronaviridae* ont aussi beaucoup fait parler d'eux ces dernières années, notamment pour leur potentiel pandémique et leur degré élevé de morbidité/mortalité, en particulier en ce qui concerne le MERS-CoV (*Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*) et le SARS-CoV (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*)<sup>7,8</sup>. Plus récemment encore, depuis fin décembre 2019, nous faisons face à une nouvelle souche émergente pandémique de coronavirus (SARS-CoV-2) causant des symptômes de fièvre, des difficultés respiratoires et / ou une pneumonie ainsi qu'une dérégulation des réponses immunitaires (tempête de cytokines) pouvant causer la mort (principalement chez les patients présentant des comorbidités telles que le diabète, l'hypertension ou le surpoids)<sup>9-11</sup>. L'OMS et le *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) ont indiqué que cette pandémie était en lien avec la fréquentation par les premiers patients d'un marché de produits animaux et de la mer dans la région de Wuhan (Chine), confirmant l'origine zoonotique du SARS-CoV-2. La transmission interhumaine du virus est établie (survenue de pneumonies dues à ce virus chez des personnels soignants) depuis le 20 janvier 2020. Etant donné l'ampleur de la propagation du virus, l'état d'urgence sanitaire a été annoncé par l'OMS le 30 janvier 2020. De larges mesures de prévention (mesures barrières, confinement) et de nombreuses investigations cliniques sont en cours afin de valider une ou des solutions thérapeutiques visant à endiguer la progression de cette pandémie pour laquelle on estime le taux de létalité entre 0.3% et 8.3% selon les pays.

Les manifestations cliniques et la sévérité de ces infections virales respiratoires varient selon de nombreux paramètres et notamment les propriétés intrinsèques des souches infectieuses, l'âge des personnes infectées, les comorbidités, la nature et le degré d'immunosuppression des patients. Elles peuvent alors se traduire par un simple rhume jusqu'à être la cause d'une pneumonie fatale (Tableau 1).

Le tableau clinique des IRAs se complique davantage dans le cas de co-infections bactériennes, qui sont détectées avec tous les virus cités ci-dessus<sup>12-15</sup>. En particulier, si l'on prend l'exemple de la grippe, un tiers des patients en soins intensifs présentent une surinfection bactérienne par *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ou *Haemophilus influenzae*<sup>16</sup>. Les virus de la grippe induisent en effet une diminution de la clairance mucociliaire et une perte des fonctions de barrière des épithéliums en plus du dysfonctionnement du système immunitaire pulmonaire. Ceci facilite l'adhésion et l'invasion bactérienne, notamment après plusieurs jours d'infection virale<sup>17-19</sup>. Ces co-infections sont des facteurs majeurs pouvant entraîner une pathologie aggravée, conduisant à un risque accru d'hospitalisation ou d'admission en unité de soins intensifs et engageant parfois davantage le pronostic vital des patients<sup>20-23</sup>.

| Famille          | Virus                        | Taille (nm) | Génome ARN               | Enveloppe | Sous-types   | Exemple(s) de souche virale  | Population cible                   | Saisonnalité   | Symptômes  |
|------------------|------------------------------|-------------|--------------------------|-----------|--|--|------------------------------------|--|--|
| Orthomyxoviridae | Virus influenza              | 80-120      | Segmenté simple brin (-) | oui       | 4 types antigéniques (A, B, C et D)                                  | A/Lyon/969/2009 (H1N1)<br>B/Massachusetts/2/2012                   | Tous âges                          | Hiver  | Fièvres, toux, douleurs musculaires  |
| Paramyxoviridae  | Virus parainfluenza          | 150-300     | Linéaire simple brin (-) | oui       | 4 sérotypes (1, 2, 3 et 4)<br>(sous-types 4a et 4b)                  | HPIV3  | (*)                                | (*)  | De l'écoulement nasal et toux bénigne jusqu'à des épisodes de toux sévères et bronchiolites  |
| Pneumoviridae    | Virus respiratoire syncytial | 150-400     | Linéaire simple brin (-) | oui       | Groupes antigéniques A et B<br>13 génotypes A et 22 génotypes B      | RSV-A2<br>RSV-A Long   | Enfants < 5 ans<br>Personnes âgées | Fin de l'automne et hiver ou toute l'année dans les régions tropicales | Toux, fièvre, difficultés respiratoires, bronchiolites et / ou pneumonies  |
|                  | Métapneumovirus              | 120-600     | Linéaire simple brin (-) | oui       | Groupes A et B (sous-groupes A1/A2 et B1/B2)                         | HMPV-B CAN97-82<br>HMPV-A CAN99-81                                 | Enfants < 5 ans<br>Personnes âgées | Fin d'hiver et printemps ou toute l'année dans les régions tropicales  | Toux, écoulement nasal, fièvre, difficultés respiratoires, bronchiolites et pneumonies   |
| Picornaviridae   | Rhinovirus                   | 20-30       | Linéaire simple brin (+) | Non       | Majoritairement A, B et C<br>>100 types antigéniques décrits         | Human rhinovirus 100<br>Human rhinovirus 98<br>Human rhinovirus 68 | Tous âges                          | Toute l'année, pics d'incidence en automne et hiver                    | Rhume, insuffisances cardiaques  |
| Coronaviridae    | Coronavirus                  | 120-160     | Linéaire simple brin (+) | oui       | 7 génotypes (229E, OC43, NL63, HKU1, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2) | Human coronavirus 229E<br>Human coronavirus NL63                   | Tous âges                          | Hiver et printemps   | Rhume pour les infections par des souches peu pathogènes mais aussi fièvres et toux entraînant la mort dans 30% des cas pour le MERS-CoV par exemple |

Tableau 1: Caractéristiques des principaux virus à ARN responsables d'IRAs (Adapté de Hodinka 2016). L'Organisation Mondiale de la Santé assure une surveillance pointue de ces virus notamment après les épidémies de Syndrome Respiratoire Aigu Sévère en 2003 (dus au SARS-CoV), de grippe aviaire A(H5N1) en 2004, de grippe A (H1N1)pdm09 en 2009, de MERS-CoV en 2012 et de grippe A(H7N9) en 2013. (\*) La population cible des virus parainfluenza dépend du sous-type : hPIV1 et hPIV2 touchent principalement les enfants de 6 mois à 12 ans alors que hPIV3 touche plutôt les nouveau-nés (<1an) et hPIV4 est retrouvé chez tous les enfants >10 ans. De même, leur saisonnalité change selon le sous-type : plutôt à l'automne pour hPIV1 et hPIV2 et au printemps ou début de l'été pour hPIV3. L'occurrence de hPIV4 n'est pas encore bien établie.

Or, à l'exception des virus influenza, il n'existe aujourd'hui sur le marché aucun traitement prophylactique ou thérapeutique efficace et spécifique pour lutter contre les virus respiratoires pathogènes prévalents. En outre, dans le cas des virus influenza, l'émergence récurrente de souches résistantes aux antiviraux est une source de préoccupation majeure et la protection conférée par les vaccins annuels est parfois sous-optimale, du fait de la variabilité génétique intrinsèque des virus circulants saisonniers.

Pour toutes ces raisons, les infections virales respiratoires aiguës constituent un enjeu sociétal, économique et sanitaire majeur. Le développement de nouveaux traitements prophylactiques et thérapeutiques efficaces est une priorité de santé publique.

## II . Présentation des différents virus respiratoires étudiés

Parmi les différents agents étiologiques des IRAs, les virus à ARN listés dans le Tableau 1 tiennent une place prépondérante<sup>24</sup>. L'équipe de recherche VirPath s'intéresse plus particulièrement aux virus Influenza (IV), aux Métagneumovirus humains (HMPV), au Virus Respiratoire Syncytial (HRSV), ainsi qu'aux Coronavirus humains (HCoV) et en particulier le MERS-CoV et le SARS-CoV-2. Mes travaux de thèse ont principalement porté sur les virus influenza, HMPV ou HRSV, aussi seuls ces virus sont présentés dans cette introduction.

### II . 1 . Les virus influenza

#### II . 1 . A . Classification

La grippe est une infection respiratoire aiguë causée par les virus influenza. Ces virus, dont le réservoir animal est constitué par les oiseaux aquatiques sauvages (tels que canards, cygnes, oies, échassiers), sont aussi également retrouvés chez de nombreuses espèces, notamment des oiseaux domestiques (poules, dindes et cailles) ou des mammifères (certains mammifères marins, mais aussi le cheval, le vison, le chien, le porc ou l'Homme). Ils appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae* et sont divisés en 4 types antigéniques : A, B, C et D<sup>25-27</sup>.

Les virus de type Influenza A (IAV) sont responsables de la majorité des épidémies humaines saisonnières, avec un risque de pandémie accru du fait de leur grande variabilité génétique (propriétés de cassure et glissement antigéniques, abordées dans la partie consacrée à la structure du génome). Les virus de type influenza A sont subdivisés en sous-types selon les propriétés antigéniques de leurs glycoprotéines de surface : l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA). A ce jour, 18 sous-types de HA et 11 sous-types de NA ont été décrits<sup>28-32</sup>. Lorsque l'on souhaite désigner des souches influenza, on doit inclure (i) une description des types antigéniques du virus (ii) l'hôte d'origine (sauf pour les souches d'origine humaine) (iii) l'origine géographique (iv) le numéro de la souche et enfin (v) l'année d'isolement. La nomenclature des IAV se décompose en une désignation de type et de souche, suivie d'une description de la spécificité des antigènes de surface (HA et NA). La numérotation des sous-types de HA et de NA suivent un système séquentiel simple<sup>33</sup>.

Comme illustration, nous pouvons citer le virus A/Sydney/05/97 (H3N2) pour lequel A constitue le type viral, Sydney correspond à la ville ou à l'origine géographique du premier isolement du virus, 05 est le numéro d'ordre de la souche attribué par le laboratoire qui en a fait l'isolement, et 97 correspond à l'année d'identification et d'isolement du virus.

Les virus de type influenza B (IBV) sont aussi la cause d'épidémies saisonnières dans une moindre mesure et n'existent que sous la forme de deux lignages humains antigéniques distincts (Victoria et Yamagata, d'après leurs premiers représentants qui sont respectivement B/Victoria/2/87 et B/Yamagata/16/88)<sup>34</sup>. A la différence des IAV, les virus de type B ne présentent pas de risque pandémique car ils n'ont pas de réservoir animal domestique établi et présentent une diversité plus faible que les IAV, du fait de leur dérive antigénique plus lente et de l'absence de réassortiment génétique avec les IAV<sup>35,36</sup>. Les IBV restent donc moins étudiés que les IAV.

Les virus de type C (ICV) sont encore moins communs chez l'homme et ne causent généralement qu'une infection à symptômes modérés chez les enfants ou les adultes.

Les virus de type D (IDV) sont retrouvés dans de multiples réservoirs animaux et sont notamment connus pour infecter le bétail et les porcs. Il n'existe à ce jour aucune description d'infection humaine par ces virus<sup>37,38</sup>. Comparativement aux IAV et IBV, identifiés respectivement en 1931 et 1940 (et ICV en 1947), les IDV n'ont été découverts que très récemment (2011)<sup>39-41</sup>. Des observations en microscopie électronique ont dévoilé des caractéristiques de particules virales de type influenza, mais aucune concordance en termes de séquence n'a été établie en RT-PCR avec des IAV ou IBV. Ces virus sont génétiquement plus proches des ICV (50% d'identité). Des anticorps dirigés contre les IDV n'ont pas réagi de manière croisée avec les autres virus influenza de type A, B et C, ce qui explique la création d'un nouveau sous-groupe.

## II . 1 . B . Transmission des virus IAV

Le potentiel épidémique, voire pandémique, des IAV chez l'Homme réside principalement dans leur efficacité de transmission entre les individus. Trois mécanismes majeurs de transmission ont été identifiés : les aérosols, les gouttelettes (toux ou éternuement) ou plus rarement le contact direct<sup>42</sup>. La propagation du virus est d'autant plus rapide si les lieux sont très fréquentés (écoles ou maisons de retraite par exemple). Des facteurs environnementaux, comme la température, l'humidité relative ou les UV influencent aussi la transmission des IAV, tout comme la fréquentation scolaire, les déplacements en avion et la proximité accrue des individus dans les intérieurs par temps froid ou pluvieux<sup>43-48</sup>. Les symptômes apparaissent de 1 à 4 jours après l'infection. Les personnes infectées sont contagieuses à partir du jour précédant l'apparition des symptômes et le restent généralement jusqu'à 7 jours après. Les enfants et les sujets immunodéprimés excrètent le virus

pendant une durée plus longue et peuvent donc contaminer leur entourage au-delà de cette période de 7 jours. Des études ont identifié le rôle majeur des enfants dans la transmission des virus au sein des familles<sup>49</sup>.

## II . 1 . C . Epidémiologie

Plusieurs souches d'IAV et IBV co-circulent généralement durant les périodes d'épidémie saisonnière. Chez l'Homme, les sous-types IAV majoritaires décrits lors des dernières décennies sont H1 et H3 et sont associés avec différentes combinaisons de sous-types N1 et N2, respectivement. En ce qui concerne les IBV, les deux lignages B/Yamagata et B/Victoria sont détectés chez les patients testés<sup>50</sup>. Les souches retrouvées varient d'une saison à l'autre et d'un continent et / ou d'un hémisphère à l'autre<sup>51</sup>. La saisonnalité des infections a pu être décrite dès 1963 dans un modèle murin infecté par un virus adapté, dans lequel il a été observé un taux de transmission de 58.2% en hiver contre 34.1% pendant les mois d'été<sup>52</sup>.

En Europe durant la saison 2017-2018 par exemple, une co-circulation des virus A(H1N1)pdm09 et B/Yamagata a été largement observée. L'épidémie a entraîné plus de 2 millions de consultations pour syndrome grippal, concernant principalement des enfants. Le nombre d'hospitalisations était de 9 738, dont 20% concernaient des patients de moins de 5 ans et 53% de plus de 65 ans. Santé publique France a estimé l'excès de mortalité attribuable à la grippe dans notre pays à 13 000 décès tous âges confondus. Le CDC a classé cette saison épidémique comme sévère pour tous les groupes d'âge. Comme en France, la majorité des échantillons testés aux USA contenaient du virus de type B (Figure 1). Les IBV ont représenté 64% des échantillons testés, ce qui est supérieur aux années précédentes.

Les analyses préliminaires de la dernière saison épidémique 2018-2019 (Figure 1) montrent une inversion totale de la tendance, avec une très grande majorité de virus de type A (99%) et une baisse du nombre global de cas de grippe sur la totalité de la saison. Cette tendance est retrouvée en France, où il a été observé entre les semaines 01 à 09 un excès de mortalité de 11.8% toutes causes et tous âges confondus (environ 13 100 décès). Ceci a principalement concerné les personnes âgées de 85 ans et plus, et dans une moindre mesure la tranche d'âge de 65 à 84 ans. Les régions les plus touchées sur cette période ont été la Bourgogne-Franche-Comté, la Corse, les Hauts-de-France, l'Île-de-France, la Normandie, l'Occitanie et la Provence-Alpes-Côte d'Azur. A partir de la semaine 10, la mortalité est revenue dans les marges de fluctuation habituelle (Source : bulletin du 10/04/2019 de Santé Publique France).

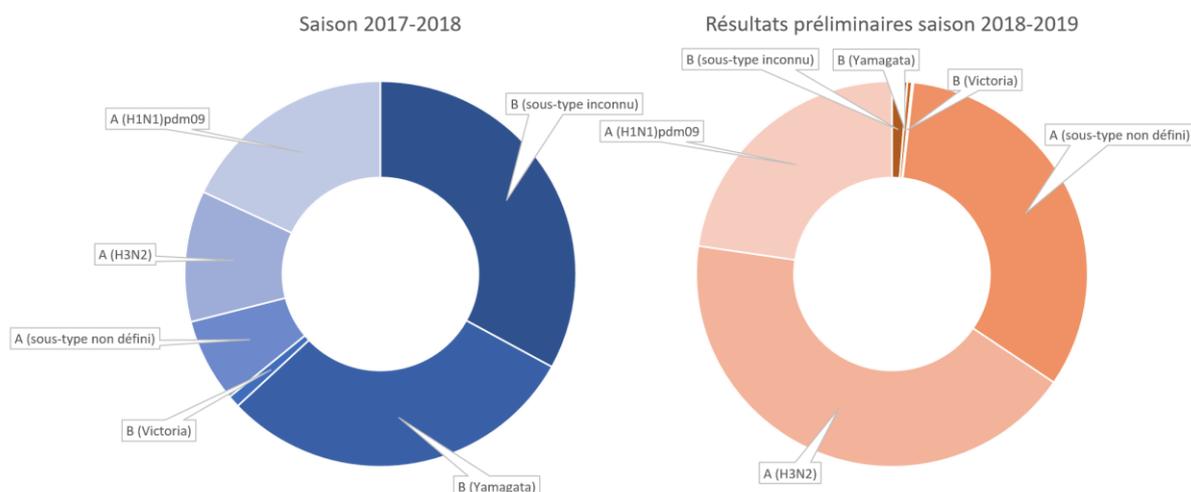


Figure 1 : Virus circulants pendant la saison 2017-2018 en Europe et résultats préliminaires publiés pour la saison 2018-2019. Les chiffres de la saison 2017-2018 sont issus du typage de 20 322 échantillons à travers l'Europe (Source : European Centre for Disease Prevention and Control). Ces échantillons proviennent de 29 pays de l'Espace Economique Européen, partagés avec le Crick Worldwide Influenza Centre (WIC, WHO). Les résultats de la saison 2018-2019 correspondent à ceux obtenus à la date du 21 avril et seront complétés à la fin de la saison.

## II . 1 . D . Symptômes grippaux

Les symptômes de la grippe sont variés selon l'hôte infecté et la souche virale. Par exemple, un nourrisson, une personne âgée ou immunodéprimée aura plus de risques de développer une grippe sévère, alors que la même infection pourrait être asymptomatique chez un adulte en bonne santé<sup>53,54</sup>. Après une période d'incubation d'un à deux jours, les symptômes les plus communs sont les suivants: fièvre, tremblements, maux de tête, myalgies, malaises, toux, écoulements nasaux, maux de gorge<sup>53,54</sup>. Ces symptômes peuvent persister jusqu'à 8 jours. Des complications peuvent apparaître, notamment chez les enfants ou les personnes âgées, et la grippe peut ainsi devenir mortelle (notamment dans les cas de co-infection virale-bactérienne). Des indicateurs de progression d'une grippe banale vers une pathologie grave sont l'apparition de symptômes suggérant une altération des bons échanges d'oxygène ou insuffisance cardio-pulmonaire (essoufflement, difficulté à respirer, bleuissement, crachats sanglants ou colorés, douleurs thoraciques et hypotension artérielle, respiration rapide ou laborieuse, hypoxie), mais aussi un état mental altéré, une inconscience, somnolence ou des difficultés à se réveiller, des convulsions, une faiblesse grave, une paralysie, une fièvre très élevée et persistante ainsi qu'une déshydratation sévère. Les complications graves les plus connues sont la progression de l'infection vers les voies respiratoires basses conduisant à une pneumonie, voire une inflammation du cœur (myocardite), du cerveau (encéphalite) ou des tissus musculaires (myosite, rhabdomyolyse) et une défaillance multi-organes (par exemple, insuffisance respiratoire et rénale).

## II . 1 . E . Structure du virion et organisation

Les IAV et IBV ont une structure et une morphologie très similaires de forme sphérique et / ou filamenteuse, dépendamment des sous-types et de la nature des cellules à partir desquelles les virus se sont multipliés. Les deux formes présentent une infectivité similaire en cultures de cellules mais le rôle biologique *in vivo* de la forme filamenteuse n'est pas encore élucidé. La plupart des souches humaines d'IAV les produisant, l'hypothèse principale consiste en son implication dans le contournement des défenses mucosales de l'hôte, conduisant à son avantage sélectif lors d'infections naturelles. Les IAV ont une taille comprise entre 80 et 120nm de diamètre et 300nm de longueur pour les formes les plus filamenteuses (Figure 2). L'enveloppe à bicouche lipidique du virion est hérissée des glycoprotéines de surface HA et NA et de canaux ioniques membranaires formés par la protéine M2. La protéine de matrice M1 soutient l'enveloppe virale au niveau de sa face interne. Ces protéines protègent le génome segmenté viral qui est constitué de complexes ribonucléoprotéiques (RNPv), véritables entités autonomes de réplication et de transcription<sup>55,56</sup>. Les RNPv sont des segments d'ARN viraux complexés à la nucléoprotéine (NP) et à l'ARN polymérase virale, elle-même composée de 3 sous-unités : PB1, PB2 et PA (pour *polymerase basic 1* ou 2 et *polymerase acidic protein*, respectivement)<sup>26,57,58</sup>.

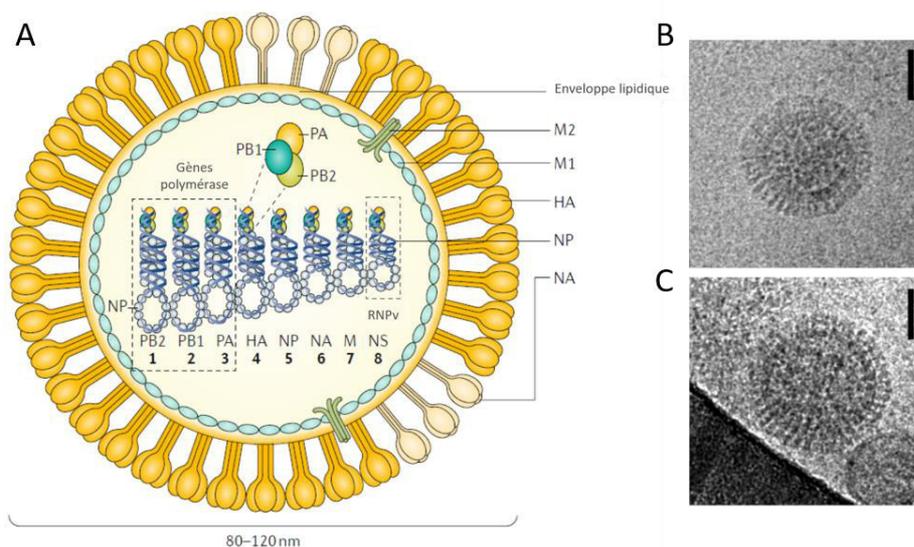


Figure 2: Représentation schématique de l'organisation de la particule virale des virus influenza A et influenza B (panel A) et visualisation en cryo-microscopie électronique de deux sous-types d'influenza A (panel B : H3N2 A/California/7/04 ; panel C : H1N1 A/NewCaledonia/20/99). La neuraminidase (NA), l'hémagglutinine (HA) et le canal ionique M2 sont intégrés à la surface de la particule virale. La glycoprotéine HA permet l'attachement du virus aux acides sialiques à la surface de la cellule hôte. La neuraminidase permet le relargage des virions en fin de cycle. La protéine de matrice M1 soutient l'enveloppe lipidique. Le génome est composé de 8 complexes ribonucléoprotéiques viraux (RNPv). Chaque RNPv consiste en un unique ARN négatif simple brin (ARNv) avec à son extrémité le complexe de polymérase (composé de PB1, PB2 et PA), le tout encapsidé dans une nucléoprotéine virale (NP). Ce complexe PB1-PB2-PA permet la réplication du virus au sein des cellules de l'hôte infecté (D'après Krammer et al. 2018). Les micrographies des virions A/New Caledonia/20/99 (H1N1) et A/California/7/04 (H3N2) en cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) proviennent de la publication de Moulès et al. de 2011 (barres d'échelle: 50 nm). HA, hémagglutinine; M1, protéine de matrice; M2, canal ionique membranaire; NA, neuraminidase; NP, nucléoprotéine; NS, protéine non structurale; PB1, PB2 et PA : Complexe de la polymérase virale.

## II . 1 . F . Structure du génome, fonction des protéines et variabilité génomique

Les IAV arborent un génome à ARN monocaténaire de polarité négative composé de 8 segments de 890 à 2341 bases (segment 8 et segments 1 et 2, respectivement, cf. Tableau 2), codant jusqu'à 17 protéines en fonction des sous-types, grâce à des épissages alternatifs et / ou des décalages du cadre de lecture<sup>37,58</sup>. La taille du génome varie entre 10 et 14.6Kb. Pour un virus H1N1, les 8 segments génomiques codent pour 11 gènes viraux tels que décrit dans le Tableau 2 et selon l'organisation décrite en Figure 3<sup>57</sup>. Bien que les segments de gènes soient de longueur différente, leur organisation est identique : ils possèdent une phase de lecture ouverte codant pour une ou plusieurs protéines et celle-ci est bordée de régions transcrites non traduites de tailles variables (de 9 à 58 nucléotides). A leurs extrémités (3' et 5') sont positionnées deux séquences courtes strictement conservées de 12 et 13 nucléotides respectivement. Ces séquences sont les éléments promoteurs de la transcription et de la réplication virale, et leur complémentarité partielle permet leur appariement, qui est responsable de la structure dite de « poêle à frire » des ARNv (représentée en Figure 2, panel A). Ainsi appariées, ces séquences sont associées au complexe ARN polymérase ARN-dépendant composé des sous-unités PA, PB1 et PB2. Le reste de l'ARNv est associé à une multitude de monomères de nucléoprotéine (NP)<sup>26,59,60</sup>.

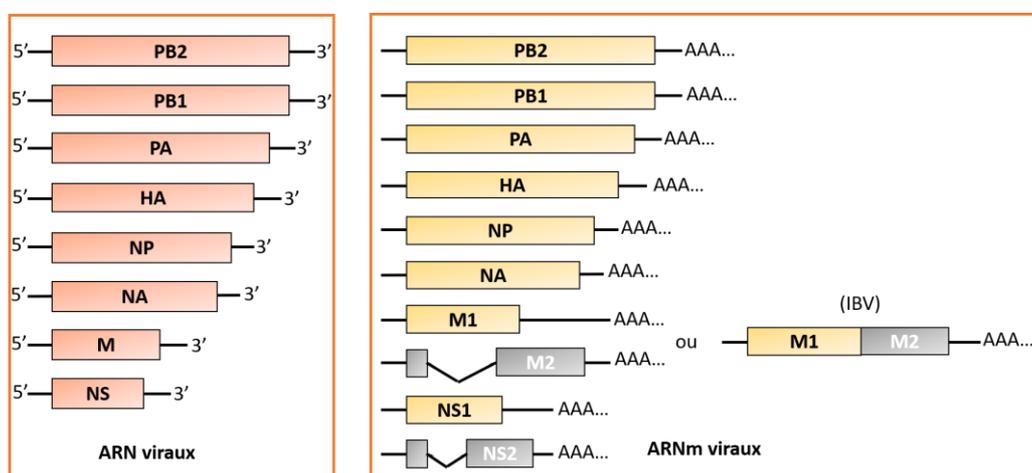


Figure 3 : Organisation du génome des virus influenza A et B. A gauche, le schéma des huit segments d'ARN viral (ARNv). Chaque région codante est représentée par un cadre (ARNv) et les régions non traduites 5' et 3' UTR (contenant les promoteurs viraux), sont représentées par une ligne. A droite sont représentés les ARNm viraux qui sont transcrits à partir des matrices d'ARNv. Les transcrits M et NS subissent un épissage alternatif chez les IAV (seul le transcrit NS est épissé alternativement chez les IBV). Tous les ARNm arborent une coiffe m7pppG en 5' et une queue poly-A en 3'.

| Segment | Gène    | Nom de la/les protéine(s)  | Taille* |  | Fonction(s)   |
|---------|---------|----------------------------|---------|--|---|
| 1       | PB2     | <i>polymerase basic 2</i>  | 759     |  | Sous-unité de la polymérase trouvant son rôle dans la reconnaissance, la fixation et le clivage de la coiffe de l'ARNm (endonucléase) |
| 2       | PB1     | <i>polymerase basic 1</i>  | 757     | Complexe de l'ARN polymérase ARN-dépendante virale | Sous-unité de la polymérase (activité endonucléasique et d'ARN polymérase)  |
|         | PB1-F2  |                            | 87      |  | Activité pro-apoptotique  |
| 3       | PA      | Endonucléase               | 716     |  | Sous-unité de la polymérase participant au vol de la coiffe des ARNm  |
| 4       | HA      | Hémagglutinine             | 550     | Glycoprotéine de surface                           | Fixation aux acides sialiques et fusion des membranes endosomales et virales  |
| 5       | NP      | Nucléoprotéine             | 498     | RNPv   | Protéine associée à l'ARN viral qui participe à l'export des RNPv   |
| 6       | NA      | Neuraminidase              | 454     | Glycoprotéine de surface                           | Participe à la dissémination des virions néoformés par le clivage des liaisons HA-acide sialique                                      |
| 7       | M1      | Protéine de matrice        | 252     |  | Protéine de matrice qui structure l'enveloppe virale et participe à l'export des RNPv   |
|         | M2      | Canal ionique              | 97      | Glycoprotéine de surface                           | Canal ionique transmembranaire impliqué dans l'étape de fusion des membranes endosomales et virales                                   |
| 8       | NS1     | Protéine non-structurale 1 | 230     |  | Protéine antagoniste de l'interféron qui inhibe la réponse antivirale   |
|         | NEP/NS2 | Facteur d'export nucléaire | 121     |  | Participe à l'export nucléaire des ARN  |

Tableau 2: Liste des protéines virales codées et exprimées par le virus modèle influenza A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) humain, ainsi que leur(s) fonction(s) (Adapté de Bouvier et al. 2008).

\* Taille de la protéine en acide aminé

La nature segmentée du génome des virus influenza implique la possibilité d'échanges génétiques (on parle de cassure ou de saut antigénique ou « *antigenic shift* ») notamment par l'acquisition chez les IAV d'un ou plusieurs segments provenant d'un autre sous-type (Figure 4). Ces événements de réassortiments sont à l'origine de plusieurs pandémies, comme celle de la grippe espagnole H1N1 en 1918/1919<sup>61,62</sup> ou celles de 1957/1958 (H2N2, en Asie de l'Est, signalé pour la première fois à Singapour en février 1957), de 1968<sup>63</sup> (H3N2, Hong Kong) et de 2009<sup>64</sup> (H1N1 pdm09) où les virus ont acquis des propriétés nouvelles (clivage basique de la HA pour la grippe espagnole par exemple) et / ou une nouvelle antigénicité pour laquelle la population mondiale était naïve<sup>65-69</sup>.

Une autre source de variabilité génétique des virus influenza A et B réside en l'accumulation récurrente de mutations, notamment sur les segments HA et NA causant des modifications antigéniques mineures, on parle alors de glissement antigénique ou « *antigenic drift* ». Ces glissements antigéniques ne génèrent pas de virus pandémiques, mais sont la cause des épidémies saisonnières en permettant une évasion facilitée des virus vis-à-vis d'immunités de l'hôte pré-existantes<sup>70</sup>. Ces glissements antigéniques expliquent ainsi la nécessité d'une vaccination saisonnière annuelle et ajustée régulièrement en termes de composition de souches<sup>71,72</sup>.

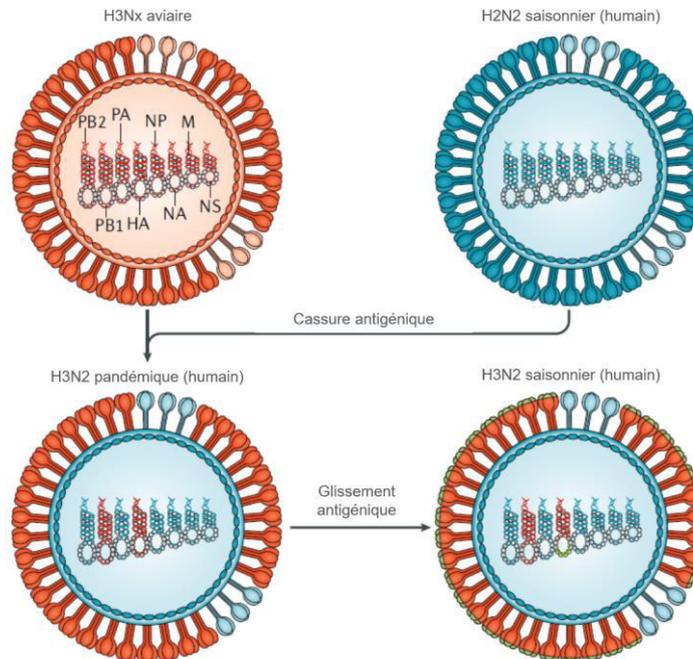


Figure 4: Evènements de glissements et cassures antigéniques des virus influenza. Lors d'évènements de co-infection par plusieurs souches de virus influenza dans un même organisme, des recombinaisons génétiques peuvent survenir. Par exemple lors de la pandémie de 1968, un virus influenza A aviaire H3Nx ( $x = 1-9$ ) et le virus saisonnier humain influenza A H2N2 ont échangé certains segments viraux (on parle de réassortiment). Le virus recombinant affichait une ARN polymérase PB1 et une hémagglutinine aviaire alors que le reste des segments sont issus du virus H3N2 humain. En l'absence d'immunité préalable de la population, la transmission de ce virus fut rapide et très efficace, provoquant une pandémie (Source : Krammer et al. 2018).

HA, hémagglutinine; M, protéine de matrice/membrane; NA, neuraminidase; NP, nucléoprotéine; NS, protéine non structurale; PB1, PB2 et PA : complexe de la polymérase virale.

## II . 1 . G . Cycle de réplication des virus influenza

Au début du cycle, l'hémagglutinine (HA) permet l'attachement des virus influenza sur les cellules de l'hôte par la reconnaissance d'acides sialiques cellulaires puis leur entrée dans la cellule, principalement *via* la voie endosomale et la fusion consécutive de l'enveloppe virale avec la membrane interne des endosomes<sup>73-76</sup>. A cette étape, les canaux ioniques M2 permettent en effet une acidification du virion, ce qui entraîne le relargage des complexes viraux ribonucléoprotéiques (RNPv) dans le cytoplasme de la cellule hôte<sup>77</sup>. Cette étape d'entrée et notamment la fixation cellulaire des virus est l'une des cibles principales des antiviraux actuellement sur le marché, tels que l'oseltamivir ou le zanamivir, détaillés dans la partie - IV . Traitements – de ce manuscrit.

Une fois les complexes RNPv libérés, ceux-ci sont dirigés activement vers le noyau cellulaire grâce à l'intervention des protéines M1 et NS2/NEP qui possèdent des signaux de localisation nucléaire (NLS) pouvant se lier à la machine d'importation nucléaire cellulaire et ainsi pénétrer dans le noyau<sup>78</sup>. C'est en effet dans le noyau de la cellule hôte infectée qu'ont lieu les étapes de transcription et de réplication du génome viral<sup>79</sup>. La transcription commence par le vol des coiffes en 5' des ARNm cellulaires (*cap-snatching*) par le complexe de la polymérase virale. Pour ce faire, la

sous-unité PB2 se lie à la coiffe d'un ARNm de l'hôte, puis la sous-unité PA réalise un clivage 10 à 15 nucléotides en aval de la coiffe et la repositionne sur la sous-unité PB1, permettant ainsi à la polymérase virale d'utiliser la coiffe comme amorce pour initier et réaliser la synthèse de l'ARNm viral. Chaque transcrit sera polyadénylé par le complexe de polymérase virale avec une séquence poly-U à l'extrémité 3' de l'ARNm viral<sup>80</sup>. Les protéines NS1 et NP contribuent également au détournement de l'ARN polymérase II cellulaire au profit du cycle viral, en empêchant les événements d'épissage des ARNm cellulaires de l'hôte<sup>81</sup>. Les ARNm viraux coiffés en 5' et polyadénylés en 3' sont alors exportés directement et / ou après un épissage alternatif dans le cytoplasme pour y être traduits.

La protéine multifonctionnelle NS1 est une des premières protéines virales synthétisées et réimportées dans le noyau pour son rôle dans la régulation des ARNm viraux et de l'hôte et son implication dans l'export nucléocytoplasmique des ARNm viraux *via* ses interactions fonctionnelles multiples avec les protéines cellulaires TAP / NXF1, p15, Rael, E1B – AP5 et la nucléoporine NUP98<sup>82-84</sup>. Au cours de leur évolution, les IAV ont développé des mécanismes de régulation leur permettant de détourner le spliceosome de l'hôte à l'intention de leur cycle de réplication. Ils modifient en effet l'expression cellulaire des gènes de l'hôte au profit de produits viraux épissés<sup>84</sup>. Les sous-unités de polymérase virale nouvellement synthétisées (PA, PB1 et PB2) et la nucléoprotéine (NP) sont réimportées activement dans le noyau cellulaire pour déclencher la néo-synthèse d'ARNv à partir de copies d'ARN complémentaires (ARNc) et s'y associer pour former de nouvelles RNPv fonctionnelles. Les RNPv néoformées peuvent ainsi transcrire des ARNm et des ARNc viraux supplémentaires ou s'associer aux protéines virales M1 et NS2/NEP nouvellement synthétisées pour assurer leur export nucléaire polarisé vers le cytoplasme et la membrane plasmique cellulaire et l'incorporation dans de nouveaux virions. Le transport actif des RNPv est réalisé grâce au détournement des protéines cellulaires, telles que CRM1 pour leur export nucléocytoplasmique ou Rab11 et les microtubules cytosoliques pour leur trafic vers la membrane plasmique<sup>81,82</sup>.

En ce qui concerne les glycoprotéines de surface NA et HA et le canal ionique M2, ceux-ci sont, après traduction de leurs ARNm codant dans le réticulum endoplasmique (RE), dirigés vers l'appareil de Golgi pour maturation et adressage vers leur site d'incorporation avec les RNPv dans les virions bourgeonnants au niveau des zones riches en radeaux lipidiques enrichis en cholestérol et en sphingolipides de la membrane plasmique<sup>85</sup>.

Outre son rôle important dans l'infection par le clivage des acides sialiques (activité sialidase) dans le mucus, la NA intervient également à la fin du cycle viral par cette même activité de clivage des résidus sialiques des glycoprotéines de surface pour permettre le relargage des particules virales bourgeonnantes et leur dissémination<sup>86</sup>. Cette étape de sortie est ciblée par l'action des inhibiteurs de NA, tels que le Tamiflu (cf. IV . Traitements). Les principales étapes du cycle viral des virus influenza sont présentées en Figure 5.

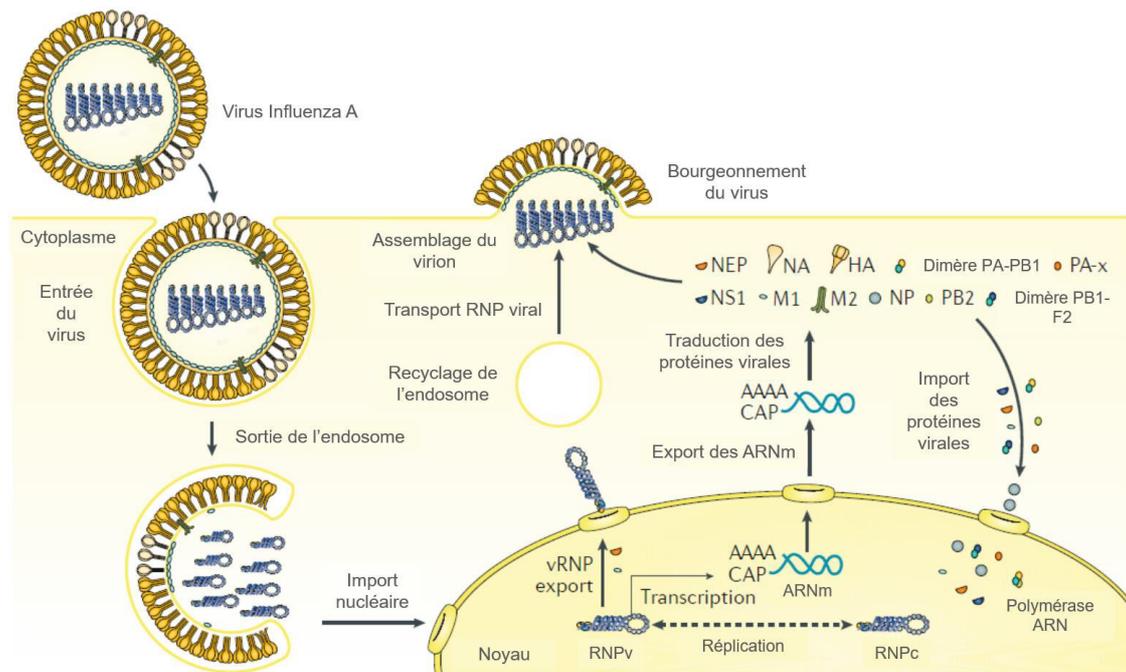


Figure 5: Schéma du cycle réplcatif des virus influenza. Les virus influenza entrent au niveau de l'endosome après reconnaissance des acides sialiques de la cellule hôte. Leur matériel génétique sous forme de RNPv est importé dans le noyau pour les étapes de transcription en ARNm et de réplication de nouvelles RNPv. Les ARNm viraux sont ensuite traduits en protéines virales dans le cytoplasme de la cellule infectée et ces protéines sont assemblées à la membrane plasmique en virions autour des RNPv nouvellement produites (Source : Krammer et al. 2018).

HA, hémagglutinine; M1, protéine de matrice; M2, protéine de membrane; NA, neuraminidase; NEP, protéine d'export nucléaire; NP, nucléoprotéine; NS1, protéine non structurale; PB1, PB2 et PA : Complexe de la polymérase virale; RNPv, complexes ribonucléoprotéiques viraux; RNPc, complexes ribonucléoprotéiques cellulaires.

## II.2. Les pneumovirus

### II.2.A. Classification

Le virus respiratoire syncytial (HRSV) et dans une moindre mesure le métapneumovirus humain (HMPV), sont considérés comme des agents étiologiques majeurs d'hospitalisation et de décès infantiles liés aux IRAs<sup>87,88</sup>. Ces virus appartiennent à l'ordre des *Mononegavirales*, dans la famille nouvellement créée en 2016 des *Pneumoviridae* (l'ancienne nomenclature les intégrait à la famille des *Paramyxoviridae*) et se classent soit dans le genre *Orthopneumovirus*, soit dans le genre *Metapneumovirus* (Tableau 3)<sup>89-91</sup>.

Ces virus partagent la plupart de leurs caractéristiques génomiques et morphologiques, mais diffèrent par la présence de protéines non structurales NS1 et NS2 uniquement chez les *Orthopneumovirus*<sup>89,90</sup>. Bien que de nombreuses similitudes aient été décrites entre les *Pneumoviridae* et *Paramyxoviridae*, ils divergent notamment au niveau de la structure de leur ribonucléoprotéine virale (RNPv), de la présence d'un gène M2 chez les *Pneumoviridae* organisé

selon deux origines de transcription conduisant à la transcription de deux gènes différenciés M2-1 et M2-2, et finalement de l'importante distance phylogénétique qui les sépare.

| Caractéristiques | Description  |
|------------------|--|
| Virion           | Enveloppé, sphérique ou filamenteux avec une ribonucléoprotéine hélicoïdale (RNPv)   |
| Génome           | ARN simple brin (-) non segmenté; de 13.2 à 15.3 kb  |
| Réplication      | Cytoplasmique. La polymérase ARN-dépendante composée de la phosphoprotéine (P) et de la polymérase Large (L) ; la protéine M2-1 est un facteur d'élongation.   |
| Traduction       | La machinerie de traduction opère au sein du cytoplasme (ARNm coiffés et polyadénylés)   |
| Hôtes connus     | Mammifères (Homme, bétail et rongeurs notamment); oiseaux pour le métapneumovirus aviaire  |
| Taxonomie        | <p>Se divise en deux genres :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Orthopneumovirus</i> : <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Virus respiratoire syncytial bovin BRSV</li> <li>▪ <b>Virus respiratoire syncytial humain HRSV (A1 et A2)</b></li> <li>▪ Virus de la pneumonie murine MPV</li> </ul> </li> <li>• <i>Metapneumovirus</i> : <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Métapneumovirus aviaire AMPV</li> <li>▪ <b>Métapneumovirus humain HMPV</b></li> </ul> </li> </ul> |

Tableau 3 : Caractéristiques des Pneumoviridae (Source : ICTV). Sont surlignées en gras les deux espèces ayant été étudiées durant ma thèse.

Pour le HRSV, on dénombre deux groupes antigéniques A et B, majoritairement distincts sur la base de leur gène codant pour la glycoprotéine G (50% de différences en termes de séquences nucléotidiques) et dans une moindre mesure de leur gène codant pour la glycoprotéine de fusion F (qui compte pour 10% de la variabilité)<sup>92</sup>. La protéine G contient deux régions hypervariables : HVR1 et HVR2<sup>93</sup>. Chaque groupe est à son tour subdivisé en génotypes selon la variabilité de HVR2 et à ce jour, au moins 13 génotypes RSVA et 22 RSVB ont été identifiés<sup>94,95</sup>.

Comme pour les virus influenza, au sein d'une même saison épidémique, on observe une co-circulation de plusieurs types de HRSV (A et B)<sup>96,97</sup>. Cette co-circulation est irrégulière et la prévalence de chaque souche alterne selon les années, avec une prévalence cumulée plus importante des virus du groupe A<sup>98-100</sup>. En complément de cette co-circulation, on observe un remplacement progressif de certains génotypes par d'autres, avec notamment l'apparition de variants d'échappement immunitaire ou des variants présentant une meilleure capacité répliquative<sup>100</sup>. Les substitutions d'acides aminés observées sont connues pour coïncider avec la croissance des populations virales pour lesquelles cette substitution est sélectivement avantageuse et éventuellement associée à des mutations d'échappement. Au début des années 1990, les génotypes HRSVA GA2 et GA5 étaient les plus prévalents alors que les génotypes GA1, GA3, GA6 et SAA1 semblaient avoir disparu au cours du temps<sup>101-103</sup>. Sur la même période, les génotypes JA1 et

GB1 de HRSVB ont d'abord été les seuls détectés, puis à partir du milieu des années 1990, ce sont les génotypes GB3, GB3 Insert et SAB3 qui ont co-circulé majoritairement alors que le génotype JA1 semblait s'être éteint<sup>100</sup>.

En ce qui concerne les HMPV, ces virus sont eux aussi classifiés en deux groupes principaux (A et B) qui sont eux-mêmes subdivisés en deux ou trois sous-lignages selon la séquence nucléotidique des gènes F et G : A1, A2a, A2b, B1 et B2<sup>104-109</sup>. Il est à noter que la protéine de fusion codée par le gène F est très conservée entre les sous-types HMPV (>94% d'identité entre les virus du groupe A et du groupe B<sup>110</sup>), alors que la glycoprotéine G est beaucoup moins conservée (<37% d'identité entre les séquences des deux groupes<sup>111</sup>). Il est très intéressant de noter que, contrairement aux virus influenza, la plupart des mutations ponctuelles détectées sur la séquence de l'antigène majeur F des HMPV ne sont pas conservées au cours du temps, ce qui conduit à une dérive antigénique très faible<sup>110</sup>. Cette information est capitale pour le développement d'anticorps monoclonaux et de vaccins. Tout comme le HRSV, une co-circulation des différentes souches est décrite, mais le phénomène de remplacement du groupe prédominant après une ou deux saisons n'est pas encore élucidé<sup>112</sup>. Les différentes souches de HMPV circulent dans le monde entier, à l'exception du sous-groupe A1<sup>112,113</sup>.

## II . 2 . B . Transmission des pneumovirus

Ces virus se transmettraient par voie aéroportée (au niveau de l'oropharynx, des voies respiratoires supérieures et inférieures par inhalation sous forme d'aérosols) ou contact direct<sup>114</sup>. Les personnes infectées par le HRSV ou le HMPV sont généralement contagieuses pendant 3 à 8 jours. Cependant, certains nourrissons et les personnes dont le système immunitaire est affaibli peuvent continuer à transmettre le virus pendant une période pouvant aller jusqu'à 3 semaines<sup>115</sup>.

## II . 2 . C . Epidémiologie

A l'échelle mondiale, plus de 95% des enfants sont infectés par le HRSV avant d'atteindre l'âge de deux ans et par le HMPV avant l'âge de cinq ans. Les infections par le HRSV sont connues sous la forme d'épidémies automnales et hivernales régulières (pics d'incidence entre novembre et janvier), sur tous les continents<sup>116</sup>. Des souches appartenant aux deux sous-groupes A et B de HRSV peuvent être détectés au sein d'une même population, dans des proportions variant selon les épidémies<sup>97,117,118</sup>. La prévalence du HRSV est forte chez les enfants admis dans les hôpitaux<sup>119,120</sup> (1 à 2% des hospitalisations d'enfants de moins de 2 ans sont dues au HRSV chaque hiver), en particulier chez les jeunes enfants<sup>121</sup> (66 000 à 199 000 décès d'enfants de moins de 5 ans dans les pays en voie

de développement), avec un taux de mortalité très important pour les personnes à risque<sup>122-129</sup> (enfants nés avec une maladie cardiaque congénitale, enfants ayant été diagnostiqués avec une affection pulmonaire chronique ou présentant un système immunitaire affaibli par une maladie ou certains traitements tels que la chimiothérapie).

Depuis sa découverte en 2001, la prévalence du HMPV a été constatée à l'échelle mondiale et il est détecté chez 4 à 16% des patients souffrant d'affections respiratoires aiguës<sup>130-133</sup>. Les infections par le HMPV sont moins documentées que celles au HRSV, mais semblent suivre des règles similaires, avec toutefois un pic d'incidence plus tardif que celui du HRSV, vers la fin d'hiver/début printemps et avec une durée d'excrétion du virus plus longue dans le cas du HMPV<sup>134</sup>. Par exemple, dans une étude menée à Caen en 2009, 37% des enfants hospitalisés pour des IRAs étaient dues au HRSV et dans 9.7% des cas, le virus HMPV était en cause ; les autres virus responsables étant les rhinovirus (18%), les virus influenza (15,4%), les adénovirus (9%) et les virus parainfluenza humains (5%)<sup>132</sup>.

Les mécanismes sous-jacents de l'épidémiologie de ces pneumovirus ne sont pas entièrement élucidés à ce jour. La température, les précipitations et l'humidité semblent avoir un impact significatif sur la saisonnalité de ces virus. Par exemple, dans le cas de la circulation des HRSV, la latitude et le mois du calendrier semblent être les facteurs les plus influents en climats tempérés<sup>135-137</sup>.

#### II . 2 . D . Symptômes

Les symptômes apparaissent généralement 4 à 6 jours après l'exposition au virus et se caractérisent par des épisodes de toux et de fièvre, une diminution de l'oxygénation du sang, une respiration rapide ou difficile pouvant progresser vers des formes graves d'insuffisances respiratoires. Chez de jeunes enfants hospitalisés pour une IRA, les signes cliniques d'infection par les virus HRSV et HMPV sont très comparables. Ils comportent des signes d'atteintes des voies aériennes supérieures et inférieures : rhinite, toux, éternuements, bronchiolites, bronchites, pneumonies<sup>133,138-141</sup>. Des complications menant à une insuffisance respiratoire grave sont décrites chez les prématurés ou les jeunes enfants, surtout dans les pays en voie de développement<sup>2,142</sup>. Les cas de réinfection au cours de la vie de l'individu sont très communs. Du fait de la faible cytopathogénicité du HRSV, les symptômes sont alors bien moins sévères chez l'enfant déjà infecté précédemment et l'adulte que chez le nourrisson et les jeunes enfants, se traduisant dans ce cas par un syndrome grippal<sup>143,144</sup>. Chez les patients immunodéprimés et les personnes âgées de plus de 65 ans, il reste néanmoins associé à un risque majeur de bronchopneumopathies sévères pouvant entraîner le décès des patients<sup>125,145</sup>.

## II . 2 . E . Structure du virion et organisation

Les virus HMPV (Figure 6) et HRSV sont des virus enveloppés possédant une structure très similaire. Leurs particules virales sont très pléiomorphes, pouvant être sphériques ou filamenteuses, dont le diamètre moyen est de 200nm, avec un minimum de 150nm et un maximum de 600nm (Tableau 3)<sup>89,146</sup>. Au sein du virion, la nucléocapside qui protège le génome viral est de forme hélicoïdale ; elle est constituée d'anneaux de nucléoprotéines N sur lesquels s'enroule l'ARNv<sup>147</sup>. Les protéines P, L, les facteurs d'élongations M2-1 et de régulation de synthèse ARN (M2-2) interagissent avec cette nucléocapside pour former le complexe RNPv et réaliser la transcription du génome viral. La protéine de matrice M est accolée à l'enveloppe lipidique. Les trois glycoprotéines d'enveloppe sont la protéine d'attachement G, la protéine de fusion F et la viroporine SH (*small hydrophobic*) et forment des spicules qui hérissent la surface de l'enveloppe du virus<sup>89,148</sup>.

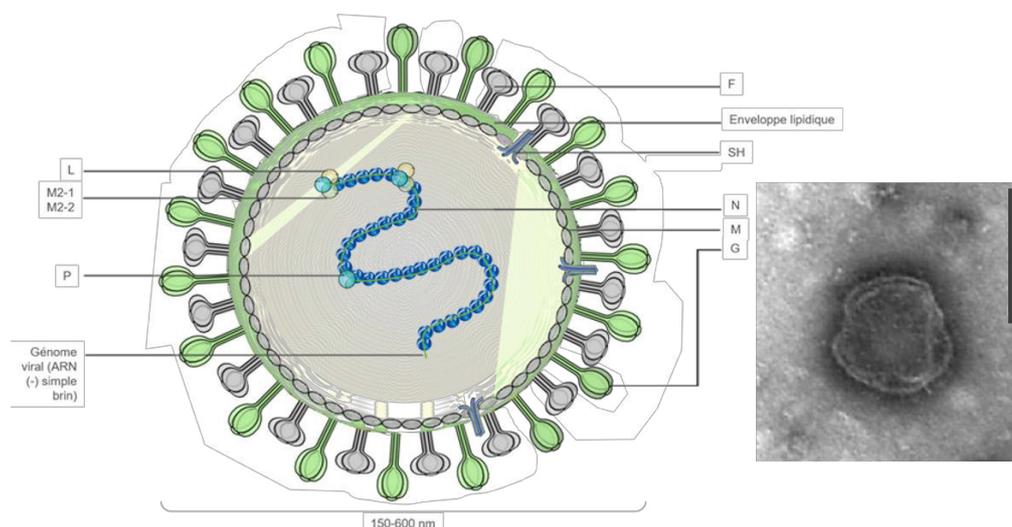


Figure 6: Représentation schématique d'organisation de la particule virale du métapneumovirus humain et visualisation en microscopie électronique. Le virus est représenté sous forme sphérique mais il est généralement de forme irrégulière. Les glycoprotéines de surface (protéine de fusion F, d'attachement G, hydrophobe SH) recouvrent la bicouche lipidique, qui provient de la membrane plasmique des cellules infectées. La protéine de matrice (M) soutient cette enveloppe et participe à la structure de la particule virale. La polymérase large (L), la nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P) et les facteurs d'élongation et de régulation de la synthèse de l'ARN M2-1 et M2-2 sont organisés en complexe ribonucléoprotéique viral (RNPv) pour protéger l'ARN viral simple brin à polarité négative (D'après Feuillet et al. 2012). L'image en microscopie électronique de la particule virale provient de cette même publication de Feuillet et al. de 2012 (Barre d'échelle : 100 nm). F, protéine de fusion; G, protéine d'attachement; SH, petite protéine hydrophobe; M, protéine de matrice; L, polymérase Large; N, nucléoprotéine; P, phosphoprotéines; M2-1, facteur d'élongation; M2-2, facteur de régulation de synthèse.

## II . 2 . F . Structure du génome et fonction des protéines

Le génome viral des pneumovirus est constitué d'ARN simple-brin non segmenté à polarité négative. Sa longueur est de l'ordre de 13.2kb pour le HMPV et de 15.2kb pour le HRSV<sup>149,150</sup>. L'organisation respective de leurs génomes est représentée en Figure 7 et les protéines virales en résultant sont listées dans le Tableau 4.

Brièvement, le génome du HMPV compte 8 gènes, codant pour 9 protéines grâce aux 2 cadres de lecture chevauchants pour le gène M2<sup>90</sup>. Les protéines sont ordonnées selon l'organisation suivante : nucléoprotéine (N), phosphoprotéine (P), protéine de matrice (M), protéine de fusion (F), facteurs de régulation (M2-1 et M2-2), protéine hydrophobe de surface (SH), protéine d'attachement (G) et polymérase (L)<sup>57</sup>.

Le HRSV possède 10 gènes, 8 similaires au HMPV auxquels s'ajoutent les gènes codant pour les protéines non structurales NS1 et NS2, ordonnés de NS1 à L selon l'ordre suivant : NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L (Figure 7). Les gènes correspondant aux protéines NS1 et NS2 sont exprimés durant l'infection virale, mais les protéines en résultant ne sont pas empaquetées dans la particule virale<sup>57</sup>.

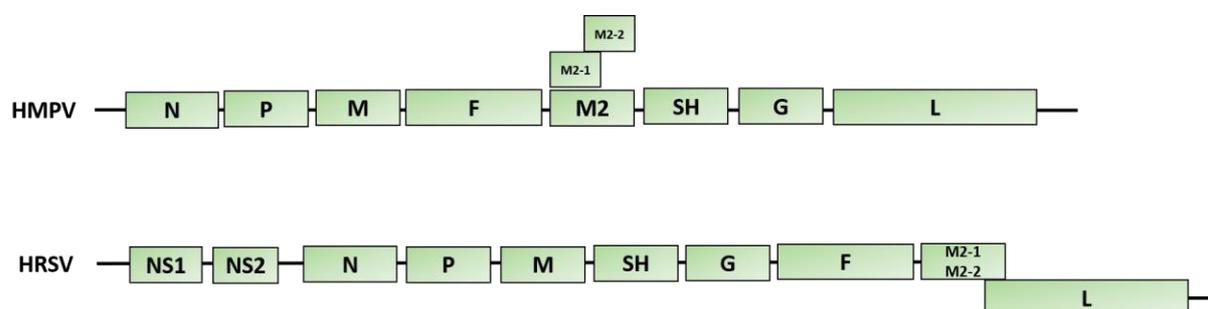


Figure 7: Organisation du génome des pneumovirus HMPV et HRSV. Si l'on compare leur organisation génomique, le HRSV exprime deux protéines supplémentaires vis-à-vis du HMPV (NS1 et NS2), arbore une organisation différente des protéines SH et G et les deux virus ont des cadres de lecture chevauchant différents (M2 pour HMPV et L pour HRSV).

|                                 | Gène | Nom de la/les protéine(s)                                | Taille* |         | Fonction  |
|---------------------------------|------|--|---------|---------|---|
|                                 |      |  | HRSV    | HMPV    |   |
| Complexe de répllication virale | N    | Nucléoprotéine   | 391     | 394     | Encapsidation de l'ARN viral  |
|                                 | P    | Phosphoprotéine  | 241     | 294     | Co-facteur de polymérase  |
|                                 | M2   | Facteur d'élongation M2-1                                | 194     | 187     | Facteur de transcription  |
|                                 | M2   | Protéine M2-2  | 88-90   | 71      | Régulation de la transcription/répllication ARN   |
| Matrice                         | L    | Polymérase <i>Large</i>                                  | 2165    | 2005    | Activité catalytique répllication virale  |
|                                 | M    | Protéine de matrice                                      | 256     | 254     | Assemblage et bourgeonnement  |
| Glycoprotéines de surface       | F    | Glycoprotéine de fusion                                  | 574     | 539     | Attachement et fusion du virus  |
|                                 | G    | Glycoprotéine d'attachement                              | 298     | 229-236 | Liaison aux glycosaminoglycane cellulaires, immunomodulation, échappement de l'immunité   |
|                                 | SH   | Petite protéine hydrophobe                               | 64      | 177-183 | Viroporine, immunomodulation  |
| Protéines régulatrices          | NS1  | Protéine non-structurale 1 (protéine d'export nucléaire) | 139     |         | Inhibition de la polyadénylation des mRNA de l'hôte, inhibition apoptose/induction IFN I, |
|                                 | NS2  | Protéine non-structurale 2                               | 124     |         | Export des complexes ribonucléiques   |

Tableau 4: Résumé des protéines virales des pneumovirus. En gris : Gènes communs au HMPV et HRSV. En bleu : Gènes spécifiques au HRSV. \* Taille de la protéine en acide aminé

## II . 2 . G . Cycle de réplication des pneumovirus

Le cycle viral de ces deux virus, représenté en Figure 8, suit les étapes classiques de réplication des virus à ARN négatif non segmentés.

Leur cycle débute par une première étape d'attachement du virus à la cellule hôte grâce à des récepteurs glycosaminoglycanes de type héparane sulfate ou intégrines  $\alpha/\beta$  à la surface des cellules épithéliales du tractus respiratoire (*via* les protéines G et F), puis d'entrée du virus *via* un mécanisme de fusion de sa membrane avec la membrane plasmique des cellules de l'hôte grâce à l'action de la protéine F (mécanisme indépendant du pH)<sup>151</sup>. La protéine F est en effet une glycoprotéine transmembranaire de fusion de Classe I, organisée en trimères, insérés dans la bicouche lipidique. Cette protéine est peu conservée entre pneumovirus (33% d'identité entre HRSV et HMPV), mais présente une homologie de séquence supérieure à 95% entre les sous-groupes A et B de HRSV et HMPV<sup>110,152</sup>. Pendant l'étape d'entrée du virus, la protéine F dirige seule la fusion membranaire indépendamment des autres protéines d'enveloppe virale. De par le double rôle de la protéine F dans la fusion membranaire mais aussi dans l'attachement de la particule virale à la surface de la cellule hôte, la protéine G est considérée comme une protéine accessoire des virus HMPV et HRSV. D'ailleurs, des virus HMPV ou HRSV n'exprimant pas la protéine G sont répliqués bien que leurs infectivités *in vitro* ou *in vivo* soient réduites, de manière dépendante des souches virales<sup>153-155</sup>.

Une fois la fusion des membranes du virus et de la cellule hôte réalisée, le complexe RNPv est relargué dans le cytoplasme cellulaire et l'étape de transcription débute. La polymérase L et son cofacteur P vont réaliser la transcription du génome viral en ARNm de manière séquentielle à partir d'une séquence *Leader* à l'extrémité 3' de l'ARNv. Pendant cette étape, la protéine M2-1 agit comme facteur d'élongation facilitant la « processivité » de la polymérase virale et permettant la synthèse d'antigénome et l'expression des ARNm viraux. La protéine M2-1 constitue ainsi un facteur essentiel pour la transcription virale, il est unique aux *Pneumoviridae*, bien qu'homologue (fonctions et organisation de domaines) à l'activateur de transcription VP30 des *Filoviridae*<sup>156,157</sup>.

Les ARNm viraux sont ensuite traduits en protéines par la machinerie cellulaire dans le cytoplasme et l'accumulation de protéines N et M2-2 nouvellement synthétisées favorisent la synthèse de nouvelles molécules d'ARNv génomique à partir de molécules d'antigénome viral (brin d'ARN positif servant de matrice). La protéine N se lie étroitement au génome et à l'antigénome pour former les nucléocapsides hélicoïdales et guider la polymérase virale. Dans ce processus, la protéine M2-2 aide à la fixation de la machinerie de réplication virale sur une séquence *Trailer* en 3' de l'antigénome et initie la synthèse de l'ARNv génomique<sup>143,158</sup>.

Après leurs traductions, les protéines F, G et SH sont maturées dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, puis transportées jusqu'à la membrane cellulaire au niveau de radeaux lipidiques où s'accumulent aussi des protéines M de matrice<sup>159</sup>. La protéine M joue un rôle important

dans la morphogenèse et l'assemblage des virions et semble être aussi nécessaire au transport des RNPv néo-synthétisées vers la membrane plasmique<sup>160,161</sup>. L'accumulation de ces protéines provoque une déformation de la membrane cellulaire, sous forme de projections filamenteuses, conduisant au relargage de nouveaux virions.

De plus, les protéines F exprimées à la surface des cellules infectées permettent de faire fusionner entre elles des cellules infectées et non infectées adjacentes. Ce phénomène est clairement observable en modèles expérimentaux *in vitro* par la formation de syncytia (larges cellules multinucléées), ce qui a inspiré le nom du HRSV. En parallèle du bourgeonnement classique des virions, ce mécanisme participe aussi à la propagation virale. La protéine SH appartient à la famille des viroporines qui s'oligomérisent et forment des pores membranaires permettant une propagation facilitée du virus<sup>148,162,163</sup>. Cependant, cette protéine ne semble pas essentielle puisque des HRSV ou HMPV recombinants dépourvus de leur protéine SH se répliquent aussi efficacement que le type sauvage *in vitro*<sup>155,164</sup>, mais présentent un phénotype atténué *in vitro* et/ou *in vivo* pour certaines souches<sup>155</sup>.

Pendant le cycle viral, différents mécanismes d'échappement à la réponse cellulaire ou immunitaire ont été proposés dans le cas des pneumovirus<sup>165</sup>. Par exemple, La protéine N pourrait se lier à la sous-unité alpha de la protéine kinase PKR, ce qui inhiberait la synthèse des protéines de l'hôte et participerait donc à contrer les mécanismes d'immunité innée<sup>166</sup>. Dans le cas du HRSV, les deux protéines non-structurelles NS1 et NS2 auraient un rôle dans les stratégies d'évasion du virus en interférant avec la réponse immunitaire innée notamment *via* la voie de l'interféron<sup>167-169</sup>. Elles inhibent également l'apoptose et pourraient limiter la synthèse d'ARN viral, en évitant son accumulation et donc l'activation de l'immunité innée<sup>170</sup>. De plus, la transcription et la réplication du génome se déroulent exclusivement dans le cytoplasme, sans passage par le noyau, au sein de grands corps d'inclusion cytoplasmiques qui contiennent les protéines virales N, P, M2-1 et L, ainsi que l'ARN viral. Ils permettent une inhibition de la réponse de l'hôte à l'infection par la séquestration des composants de signalisation cellulaires comme certains MAVs dans le cas du HRSV<sup>171</sup>.

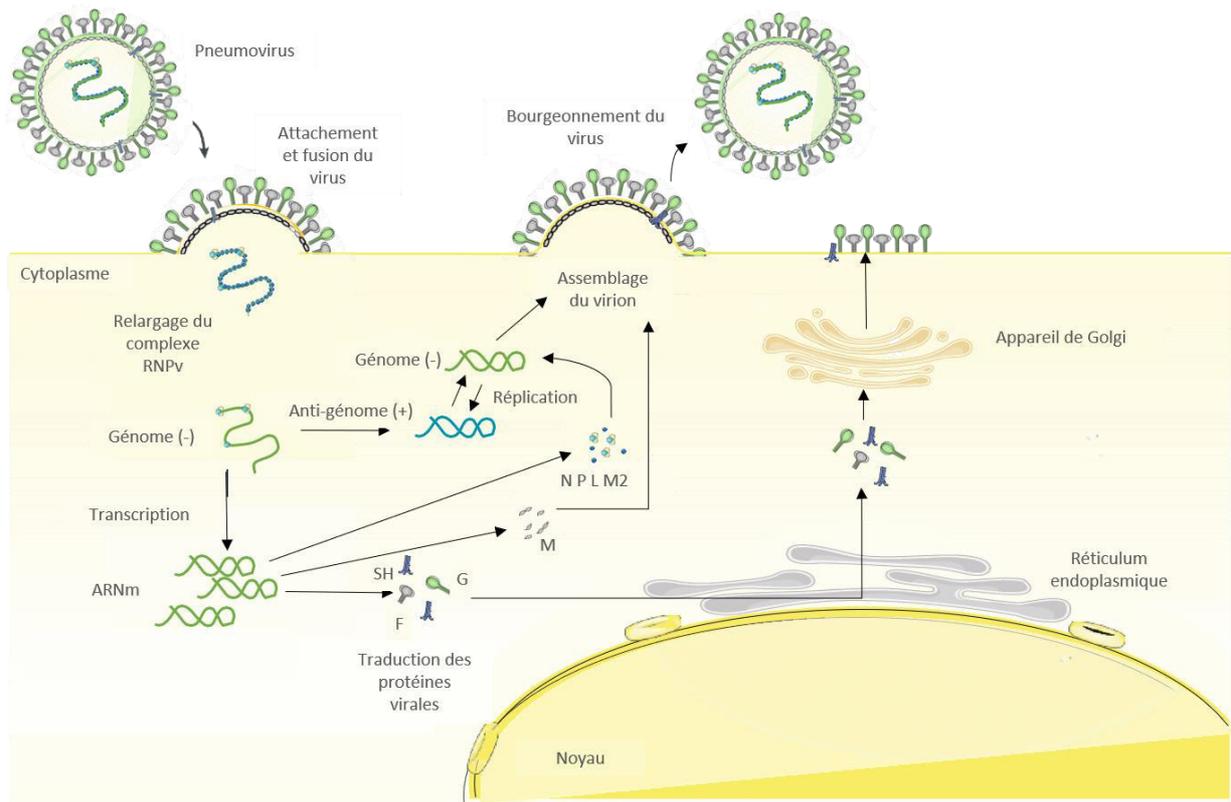


Figure 8: Cycle viral des Pneumovirus. Les étapes d'attachement et de fusion (via les protéines G et / ou F) sont suivies d'un relargage dans le cytoplasme de la nucléocapside virale. Les protéines P, N, L et M2-1 participent à la transcription du génome viral en ARNm qui sont ensuite traduits par la machinerie cellulaire. Grâce à ces mêmes protéines virales et au facteur M2-2, la réplication se déroule après une étape intermédiaire de production d'un ARN simple brin positif (on parle d'antigénome). Les protéines G, SH et F sont maturées à travers le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Accompagnée de la protéine de matrice, la nucléocapside virale néoformée (composée de l'ARN viral et des protéines N, P et L) est transportée jusqu'à la membrane pour assemblage du virion et bourgeonnement (D'après Feuillet et al. 2012).

F, protéine de fusion; G, protéine d'attachement; SH, petite protéine hydrophobe; M, protéine de matrice; L, polymérase Large; N, nucléoprotéine; P, phosphoprotéines; M2-1, facteur d'élongation; M2-2, facteur de régulation de synthèse.

### III . Diagnostic viral

Lors d'une consultation, les médecins de ville privilégient généralement une étude des symptômes d'infections respiratoires (tableau clinique) plutôt qu'une validation par diagnostic en laboratoire. Cependant, comme décrit précédemment, les infections par les principaux virus respiratoires induisent des symptômes assez similaires et il est nécessaire de les identifier pour pouvoir les traiter de manière adaptée (on parle de traitement documenté), en particulier dans le cas d'hospitalisations où le pronostic vital des patients peut être engagé. Enfin, puisque la majorité des infections des voies respiratoires supérieures sont d'origine virale (>90%), il est nécessaire de pouvoir distinguer des infections virales d'infections bactériennes, pour éviter l'utilisation inappropriée d'antibiotiques, favorisant l'apparition de résistances.

Il est donc important de disposer de méthodes de diagnostic efficaces, robustes et rapides<sup>172</sup>. Comme en bactériologie, il existe deux approches de diagnostic complémentaires, dites indirectes et directes (Figure 9).

### III . 1 . Diagnostic indirect

Le diagnostic indirect cherche à expliciter la réaction immunitaire de l'hôte vis-à-vis de l'infection par l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre le ou les virus recherchés. Plusieurs types d'immunoglobulines sont recherchés : des IgM (produits immédiatement après l'exposition à la maladie) et des IgG (correspondant à une réponse ultérieure et conférant généralement l'immunité spécifique à un patient) afin de réaliser des sérologies virales par des méthodes de type ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) ou basée sur la fixation du complément<sup>173</sup>.

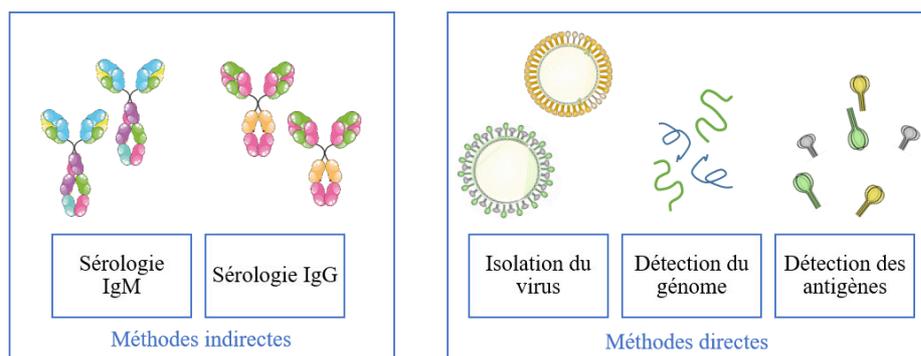


Figure 9 : Méthodes de diagnostic indirect ou direct. On distingue les méthodes directes d'isolation du virus, de détection du génome et d'antigènes viraux des méthodes de sérologies IgM et IgG. La spécificité est plus forte dans les méthodes de détection directes, mais les sérologies restent très utilisées pour le diagnostic d'infections (D'après Peeling et al. 2010)<sup>174</sup>.

Dans le cas de la grippe, le diagnostic par un examen sérologique est simple, mais d'interprétation assez délicate, avec une sensibilité moyenne<sup>175</sup>. Comme les anticorps spécifiques apparaissent typiquement une dizaine de jours après l'infection, les tests sérologiques servent plutôt lors d'études rétrospectives<sup>176</sup>. La détection des IgM est peu sensible alors que celle des IgG est trop sensible. Celles-ci peuvent en effet être témoins d'une infection plus ancienne.

Dans le cadre des infections respiratoires aiguës, ces méthodes de diagnostic ne sont pas adaptées du fait des délais d'obtention des résultats et d'une sensibilité moindre affichée chez les nourrissons et les personnes immunodéprimées.

### III . 2 . Diagnostic direct

D'autres méthodes ont ainsi été développées afin de combler ce besoin d'outil diagnostic rapide et sûr pour les infections virales respiratoires aiguës, on parle alors de diagnostic direct. Cette technique consiste en la détection de la présence du virus ou de certains de ses composants (antigènes et / ou génomes viraux) dans les produits biologiques des patients, comme le sang, la salive, les lavages broncho-alvéolaires<sup>177</sup>...

La plus ancienne méthode de détection et d'étude structurale d'un virus est la microscopie électronique<sup>178</sup>. Historiquement, cette méthode a permis l'identification du SARS-CoV ou la description des différences entre le virus de la variole et celui de la varicelle<sup>178,179</sup>. Cependant, cette méthode est limitée par son coût élevé, son temps de préparation et sa sensibilité moindre en comparaison à d'autres techniques de diagnostic<sup>180,181</sup>.

La détection du virus infectieux fonctionnel s'est faite historiquement par culture cellulaire. Cette technique permet d'isoler et d'amplifier le virus pour une caractérisation précise en tirant parti du caractère parasitaire des virus<sup>182</sup>. On ensemence des cultures de cellules permissives au virus d'intérêt et l'on recherche l'apparition au cours du temps d'un effet cytopathique (ECP). Si des ECPs apparaissent, un immunomarquage spécifique d'un déterminant viral peut être réalisé pour confirmation du diagnostic (détection d'inclusions virales et / ou d'altérations cytoplasmiques ou nucléaires). Cette méthode de diagnostic a été un standard pendant de nombreuses années, notamment en ce qui concerne les adénovirus, les virus parainfluenza, le HRSV ou les virus influenza A et B<sup>183,184</sup>. Bien que cette méthode soit extrêmement spécifique (>95%), son utilisation en diagnostic reste toutefois limitée car la qualité du prélèvement initial conditionne le résultat de l'isolement en culture cellulaire et sa durée d'exécution la rend difficile à utiliser, notamment dans le cas d'hospitalisations qui nécessitent un diagnostic rapide<sup>185</sup>. De plus, l'établissement des conditions idéales nécessite un véritable savoir-faire et présente plusieurs contraintes méthodologiques : utilisation et entretien de lignées cellulaires adaptées et permissives pour chaque pathogène, de différents milieux de culture appropriés, supplémentés ou non en sérum animal, de temps d'incubation longs à des températures variables en fonction des virus, etc. Cette méthodologie reste toujours d'actualité mais en complément et pour confirmation *a posteriori* de techniques plus récentes de biologie moléculaire<sup>186,187</sup>.

D'autres méthodes sont basées sur l'immunodétection d'un virus ou de certains de ces déterminants, telle l'utilisation d'un anticorps dirigé spécifiquement contre une protéine virale<sup>188</sup>. D'autres techniques reposent sur le principe de réactions anticorps-antigènes et en particulier pour les virus influenza, telles que l'inhibition de l'hémagglutination<sup>189</sup> (IHA) ou de la neuraminidase (INA), la microneutralisation (MN), l'agglutination au latex et les méthodes de type ELISA pour la détection

automatisée d'antigènes viraux (trousses de détection immuno-enzymatique rapide d'antigènes<sup>188</sup>). Ces méthodes de détection d'antigènes ont généralement une efficacité moyenne (44-95%), mais une spécificité très élevée (90-95%) notamment pour le dépistage d'infections par les virus influenza A et B ou HRSV. Il est intéressant de noter la sensibilité particulière de ces expériences d'immunodétection (93%) chez les populations pédiatriques infectées par HRSV, s'expliquant par des titres viraux bien plus élevés chez les jeunes enfants que chez les adultes<sup>190-192</sup>. Ces techniques ne permettent pas en revanche d'obtenir une information sur le sous-type de virus influenza par exemple<sup>183,193,194</sup>.

L'avènement de méthodes de biologie moléculaire, beaucoup plus rapides et très spécifiques, a en effet bouleversé le diagnostic clinique virologique<sup>195,196</sup>. Certaines méthodes d'amplification par PCR sont validées (Tableau 5) par les instances de contrôle comme la Food and Drug Administration (FDA)<sup>197,198</sup>. Elles permettent de détecter un ou plusieurs pathogènes à la fois (on parle de *multiplex*), qu'ils soient de nature bactérienne ou virale.

En ce qui concerne les pathogènes respiratoires, on peut citer la technologie NxTAG® (« *Respiratory pathogen panel* », Luminex Corporation) qui permet, à partir de prélèvements nasopharyngés, la détection de 20 pathogènes cibles différents, dont certains IAV (H1, H3) et IBV, mais aussi des hPIV (sérotypes 1 à 4), des adénovirus, ainsi que les pneumovirus (HMPV, HRSV) des groupes A et B<sup>199</sup>. Plusieurs autres kits commerciaux existent tels que *xTAG Respiratory Viral Panel Fast*, *RespiFinder SMART 22*, *CLART PneumoVir* et *Fast Track Diagnostics Respiratory Pathogen 33 kits*<sup>199-205</sup>. Le coût élevé de tels kits est contrebalancé par leur spécificité et leur sensibilité supérieures à 99% et leur utilisation en multiplexage automatisé, permettant l'obtention d'un diagnostic fiable en quelques heures<sup>201</sup>.

Cependant, ces méthodes de diagnostic sont, au même titre que les traitements antiviraux, limitées par le caractère évolutif continu des virus (exemple du glissement antigénique ou des mutations en général). D'autres méthodes sont depuis plusieurs années en développement afin de parer autant que possible à cette contrainte.

| Nom du test  | Fournisseur                 | Technologie                                      | Cible(s)                             |
|--|-----------------------------|--|--------------------------------------|
| <i>NxTAG® respiratory pathogen panel</i>                     | Luminex Corporation         | Real-time RT-PCR                                 | Panel multiplex (20 cibles)          |
| <i>eSensor® respiratory viral panel (RVP)</i>                | GenMark Diagnostics         | Microarray multiplex ou, Hybridation compétitive | Panel multiplex (14 cibles)          |
| <i>Verigene® RP flex</i>                                     | Luminex Corporation         | RT-PCR & et microarray                           | Panel multiplex (16 cibles)          |
| <i>ePlex® respiratory pathogen (RP) panel</i>                | GenMark Diagnostics         | RT-PCR   | Panel multiplex (17 cibles)          |
| <i>FilmArray® respiratory panel (RP)</i>                     | BioFire Diagnostics, Inc.,  | Nested RT-PCR multiplex                          | Panel multiplex (20 cibles)          |
| <i>FilmArray® respiratory panel 2 (RP2)</i>                  | BioFire Diagnostics, Inc.,  | Nested RT-PCR multiplex                          | Panel multiplex (21 cibles)          |
| <i>FilmArray® respiratory panel® (RP) EZ</i>                 | BioFire Diagnostics, Inc.,  | Nested RT-PCR multiplex                          | Panel multiplex (14 cibles)          |
| <i>Lyra® Parainfluenza virus assay</i>                       | Quidel Corporation          | Real-time RT-PCR                                 | Virus parainfluenza types 1, 2, et 3 |
| <i>Lyra® HRSV + HMPV assay</i>                               | Quidel Corporation          | Real-time RT-PCR                                 | HRSV, HMPV                           |
| <i>Simplexa™ Influenza A/B &amp; HRSV Kit</i>                | Focus Diagnostics, Inc.,    | Real-time RT-PCR                                 | IAV, IBV et HRSV                     |
| <i>Panther fusion Influenza A/B/HRSV</i>                     | Hologic, Inc.,              | Real-time RT-PCR                                 | IAV, IBV et HRSV                     |
| <i>Panther fusion parainfluenza assay</i>                    | Hologic, Inc.,              | Real-time RT-PCR                                 | Parainfluenza 1, 2 et 3              |
| <i>Panther fusion AdV/HMPV/RV assay</i>                      | Hologic, Inc.,              | Real-time RT-PCR                                 | Adénovirus, HMPV et Rhinovirus       |
| <i>ARIES® Influenza A/B &amp; HRSV assay</i>                 | Luminex Corporation         | Real-time PCR                                    | IAV, IBV et HRSV                     |
| <i>ARIES® bordetella assay</i>                               | Luminex Corporation         | Real-time PCR                                    | B. pertussis, B. parapertussis       |
| <i>Simplexa™ Influenza A/B &amp; HRSV direct</i>             | Focus Diagnostics, Inc.,    | Real-time RT-PCR                                 | IAV, IBV et HRSV                     |
| <i>Xpert® Influenza/HRSV XC</i>                              | Cepheid                     | Real-time RT-PCR                                 | IAV, IBV et HRSV                     |
| <i>Solana HRSV + HMPV assay</i>                              | Quidel Corporation          | Amplification RT-hélicase-dépendant (HDA)        | HRSV, HMPV                           |
| <i>Illumigene® mycoplasma direct DNA amplification assay</i> | Meridian Bioscience, Inc.   | Amplification Loop-mediated (LAMP)               | Mycoplasma pneumoniae                |
| <i>Illumigene pertussis DNA amplification assay</i>          | Meridian Bioscience, Inc.   | Amplification Loop-mediated (LAMP)               | Bordetella pertussis                 |
| <i>Xpert® xpress Influenza/HRSV</i>                          | Cepheid                     | Real-time RT-PCR                                 | IAV, IBV et HRSV                     |
| <i>Xpert® xpress Influenza</i>                               | Cepheid                     | Real-time RT-PCR                                 | IAV et IBV                           |
| <i>cobas® Liat influenza A/B &amp; HRSV assay</i>            | Roche Molecular Diagnostics | Real-time RT-PCR                                 | IAV, IBV et HRSV                     |
| <i>cobas® Liat influenza A/B assay</i>                       | Roche Molecular Diagnostics | Real-time RT-PCR                                 | IAV et IBV                           |
| <i>Alere i influenza A &amp; B 2 test</i>                    | Abbott Laboratories         | Amplification isotherme                          | IAV et IBV                           |
| <i>Alere i HRSV</i>  | Abbott Laboratories         | Amplification isotherme                          | HRSV                                 |

Tableau 5 : Ensemble des tests de diagnostic par amplification approuvés par la FDA (2018) pour les infections respiratoires. La plupart de ces kits sont adaptés pour des prélèvements de type naso-pharyngés mais certains tolèrent d'autres types d'échantillons : Lavage ou aspirat nasal ou prélèvements de gorge. Ces kits permettent le diagnostic d'un ou plusieurs pathogènes en quelques minutes pour les plus rapides (15min pour les kits Alere influenza et HRSV) et jusqu'à 8h pour le kit eSensor (Source : Das et al. 2018).

Le diagnostic par l'étude du transcriptome est établi en mesurant les différences de profils d'expression d'ARN de l'hôte. Cette méthode a par exemple été utilisée par l'équipe de Chaussabel et collaborateurs<sup>206</sup> en 2006. A partir du transcriptome de plus de 100 patients, ils ont pu identifier une «signature diagnostic» unique pour chaque pathologie étudiée (Lupus érythémateux, IAV, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, patients transplantés du foie sous thérapie immunosuppressive ou greffés de moelle osseuse atteints d'une maladie du greffon contre l'hôte) et une «signature sentinelle», constituée de gènes communément modulés dans les 7 pathologies étudiées. D'autres études ont pu établir des signatures transcriptomiques distinctes entre d'autres virus et bactéries, tels que le HRSV et rhinovirus<sup>207</sup>. La grande majorité de ces études a été réalisée en biopuces et l'avènement des technologies de séquençage permet d'espérer une plus grande exhaustivité et reproductibilité de telles approches. Tout comme l'étude du transcriptome, celle du virome (ensemble des génomes d'une population virale) est toutefois aujourd'hui encore limitée par des contraintes liées aux coûts, mais aussi aux ressources disponibles (bases de données incomplètes par exemple).

Les méthodes de diagnostic virologique se sont donc significativement améliorées au cours des 20 dernières années et les développements actuels des technologies de séquençage (cas du virome et transcriptome) permettent d'envisager dans un avenir proche de disposer de tests diagnostiques non seulement très robustes et rapides, mais aussi exhaustifs. Dans ce contexte, nous pouvons aussi envisager le développement prochain de tests diagnostiques/pronostiques compagnons, permettant de stratifier les patients infectés et de leur prescrire des traitements antiviraux plus efficaces et mieux adaptés (médecine personnalisée), voire à très large spectre contre une panoplie de plusieurs virus respiratoires.

## IV . Traitements

### *IV . 1 . Prophylaxie et vaccins*

Dans la lutte contre les infections virales respiratoires, il existe deux approches principales : la prophylaxie et les traitements thérapeutiques antiviraux. Des mesures « barrière » (masques chirurgicaux pour éviter les contaminations par gouttelettes, lavage des mains, réduction des contacts ou isolement des personnes infectées jusqu'à la guérison, etc.) contribuent également au contrôle de ces pathogènes viraux.

Les approches prophylactiques, reposant sur l'immunisation, principalement par vaccination, sont actuellement très limitées, voire insuffisantes pour faire face efficacement aux IRAs.

En ce qui concerne les virus influenza, la vaccination annuelle est recommandée par le *US Advisory Committee on Immunization Practices* (ACIP ou CTV : Comité technique des vaccinations en France) pour toute personne dont l'âge dépasse 6 mois (sauf contre-indications particulières<sup>208</sup>). Un réseau de surveillance mondial de la grippe (GISRS) coordonne les actions de détection, d'action et de recherche sur les virus de la grippe. Il permet le suivi des épidémies de grippe au sein des 114 états membres de l'OMS et la mise en commun des informations collectées sur les souches circulantes entre les deux hémisphères. Ces informations sont utilisées par l'OMS chaque année pour établir les recommandations en matière de composition vaccinale. Pour la saison 2019/2020 par exemple, il a été acté d'inclure deux virus de type A (A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09-like, A/Kansas/14/2017 (H3N2)-like) et deux virus de type B des lignages Victoria et Yamagata (B/Colorado/06/2017-like et B/Phuket/3073/2013-like)<sup>209</sup>.

Cependant, la variabilité importante et récurrente de ces virus limite l'efficacité de la vaccination<sup>210</sup>. L'efficacité vaccinale antigrippale se situe en effet entre 30 et 70 %<sup>211-213</sup>. Elle varie en fonction de l'adéquation entre les souches circulantes et les virus de la composition vaccinale, mais aussi en fonction de la population vaccinée. Ainsi chez le sujet âgé, l'immunosénescence est responsable d'une réduction de l'efficacité vaccinale.

Le mode de production principal, basé sur l'inoculation d'œufs embryonnés de poule (la Figure 10 reprend les principales étapes de production<sup>26</sup>) accentue également les limites du vaccin, du fait (i) des délais longs incompressibles de production (6 mois) et (ii) de l'accumulation potentielle de mutations (dérive génétique) des souches vaccinales au cours de ce processus.

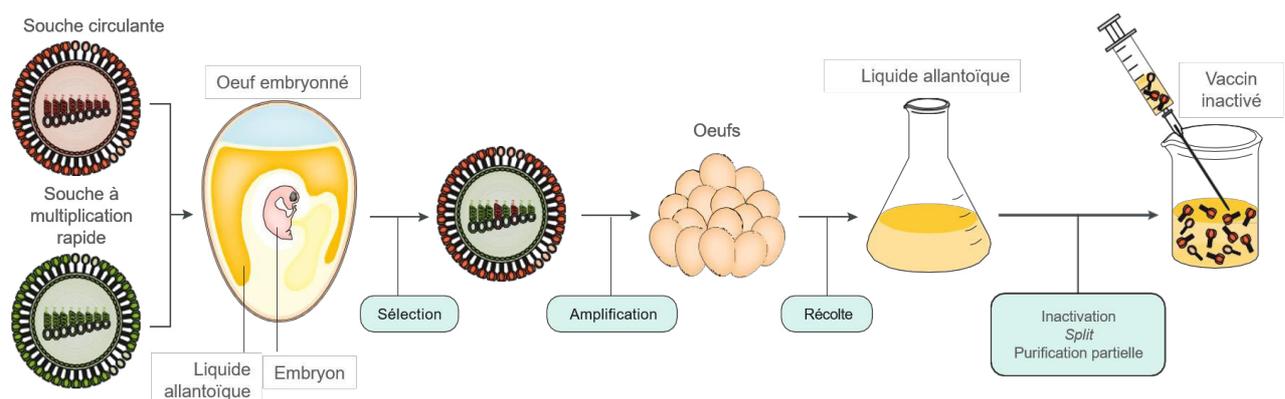


Figure 10: Fabrication du vaccin inactivé influenza A. Chaque œuf reçoit deux souches virales, puis il est incubé pour permettre au virus de se multiplier. La souche influenza A/Puerto Rico/8/1934 (PR8) est un virus qui possède des capacités répliquatives importantes sur œufs embryonnés de poule que l'on utilise lors de la co-infection avec la souche circulante pour la production de vaccin inactivé contre la grippe. Cette co-infection facilite les événements de réassortiment entre ces deux souches afin d'augmenter les capacités de multiplication de la souche circulante. Le virus se réplique au sein de l'œuf embryonné et le liquide allantoïque est récolté. Le virus est fragmenté au triton (ou split), inactivé au formol, filtré et purifié pour enrichir en HA et NA virale (Source : Krammer et al. 2018).

De nombreuses recherches sont actuellement menées dans le but de développer à grande échelle des procédés complémentaires et / ou alternatifs à l'œuf : Sanofi-Pasteur a d'ailleurs fait un pas en ce sens en rachetant la société *Protein Sciences* qui a obtenu en 2016 l'accord de la FDA pour la commercialisation de son vaccin quadrivalent recombinant Flublok® produit en système cellulaire sf9/baculovirus (Tableau 6). En 2012, le Flucelvax® (Seqirus) a été le premier vaccin approuvé par la FDA produit en bioréacteur de cellules MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*). En Europe, ce même vaccin est autorisé comme le Celvapan® (Bohumill) ou Preflucel®<sup>214</sup>. Enfin, le FluMist® (AstraZeneca) propose une administration originale puisque ce vaccin vivant atténué quadrivalent est pulvérisé en intranasal alors que les autres vaccins inactivés sont classiquement injectés par voie intramusculaire. L'ensemble des vaccins disponibles pour la saison 2018-2019 est présenté dans le Tableau 6.

| Pays                 | Nom du vaccin                                 | Fabriquant                                       | Type de vaccin   | Population cible                      |
|----------------------|---|--|--|---------------------------------------|
| France               | VaxigripTetra                                 | Sanofi Pasteur                                   | Tétravalent (2 souches de virus type A et 2 souches de virus type B) | Enfants à partir de 6 mois et adultes |
|                      | FluarixTetra                                  | GSK  |  |                                       |
|                      | InfluvacTetra                                 | Mylan  |  | Adultes à partir de 18 ans            |
|                      | Influvac                                      | Mylan  | Trivalent (2 souches de virus type A et 1 souche de virus type B)    | Enfants à partir de 6 mois et adultes |
| Etats-Unis           | Afluria Quadrivalent                          | Seqirus  |  | Enfants à partir de 6 mois et adultes |
|                      | Fluarix Quadrivalent<br>FluLaval Quadrivalent | GlaxoSmithKline<br>ID Biomedical Corp. of Quebec |  |                                       |
|                      | Flucelvax Quadrivalent                        | Seqirus  | Tétravalent  | Enfants à partir de 4 ans et adultes  |
|                      | Fluzone Quadrivalent                          | Sanofi Pasteur                                   |  | Enfants à partir de 6 mois et adultes |
|                      | Flublok Quadrivalent                          | Sanofi Pasteur                                   | Tétravalent recombinant  | Adultes à partir de 18 ans            |
|                      | Afluria                                       | Seqirus  |  | Enfants à partir de 6 mois et adultes |
|                      | Fluad   | Seqirus  | Trivalent  | Personnes âgées à partir de 65 ans    |
|                      | Fluzone High-Dose                             | Sanofi Pasteur                                   |  |                                       |
| FluMist Quadrivalent | AstraZeneca                                   | Tétravalent atténué                              | Enfants à partir de 2 ans et adultes jusqu'à 45 ans                  |                                       |

Tableau 6: Liste des vaccins anti-grippe en France et aux Etats-Unis (en gris) en 2018. En France, 4 vaccins grippaux sont disponibles pour la campagne de vaccination 2018-2019. 3 vaccins tétravalents : InfluvacTetra, VaxigripTetra, FluarixTetra. Ils contiennent un virus de type A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09, un virus de type A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), un virus de type B/Colorado/06/2017 (lignée B/Victoria/2/87) et un virus de type B/Phuket/3073/2013 (lignée B/Yamagata/16/88), conformément aux recommandations de l'OMS. Le vaccin trivalent Influvac est disponible en quantité limitée. Tous ont été pris en charge par l'assurance maladie durant la campagne 2018-2019 (Source : Ameli). Aux Etats-Unis, 8 vaccins inactivés sont disponibles (dont 5 tétravalents et 3 trivalents), 1 recombinant et 1 atténué (Source : CDC).

Bien que son efficacité soit sous-optimale, voire faible lorsque les souches circulantes sont très différentes des souches vaccinales, comme cela a été le cas en 2014-2015<sup>215</sup>, la vaccination contre la grippe saisonnière constitue malgré tout aujourd'hui la meilleure prévention, notamment pour les populations vulnérables (personnes âgées de 65 ans et plus, personnes atteintes de certaines pathologies chroniques, femmes enceintes et personnes présentant une obésité morbide), ainsi que pour les personnes au contact de personnes fragiles<sup>213,216</sup> (nourrissons, enfants en bas âge, patients hospitalisés, résidents d'établissements d'hébergement pour personnes âgées dépendantes).

En ce qui concerne les pneumovirus, il n'existe actuellement pas de vaccin commercialisé contre le HRSV ou le HMPV. Jusqu'à présent, les recherches en ce sens se sont soldées par des échecs dans les phases cliniques de développement (immunogénicité et / ou protection insuffisante), bien que l'OMS ait considéré le développement de vaccins contre le HRSV comme une priorité. Une seule étude de phase III est recensée aujourd'hui sur la base de données *Clinical Trials* (NCT02624947 par Novavax \_ResVax\_ pour l'immunisation fœto-maternelle). Or, le critère d'évaluation principal de cet essai clinique n'a pas été atteint puisque le vaccin ne semble pas prévenir les infections des voies respiratoires inférieures associées au HRSV chez les nourrissons de moins de 90 jours. Plusieurs autres candidats vaccins contre HRSV sont actuellement en cours d'évaluation dans le cadre d'essais cliniques de phase I ou II et sont listés dans le Tableau 7.

Concernant le HMPV, en 2017, la société Moderna a lancé un essai clinique de phase I (NCT03392389) pour tester la sûreté et l'immunogénicité de l'ARNm-1653 sur des patients séropositifs au HMPV ou parainfluenza humains. Les premiers résultats annoncés en février 2019 semblent indiquer que la vaccination par l'ARNm-1653 stimule la production d'anticorps neutralisants à toutes les doses testées et est généralement bien tolérée. Hormis cette étude, on ne recense actuellement que des preuves de concept *in vitro* ou en modèles animaux<sup>217</sup>. Un seul autre essai clinique avait été mené de 2011-2014 pour évaluer l'efficacité du candidat vaccin vivant atténué rHMPV-Pa (NCT01255410), avec des résultats décevants<sup>218</sup>.

Ainsi dans ce contexte de vaccination limitée contre les virus influenza et faisant défaut en ce qui concerne les pneumovirus, il est nécessaire de développer des antiviraux pour combattre efficacement ces virus respiratoires qui constituent des enjeux sanitaires et économiques majeurs.

| Type de vaccin                               | Avancée  | Entreprise  | Population cible (si applicable)           |
|--|--|---|--|
| <b><u>Vivant-atténué / chimérique</u></b>    | Préclinique  | Codagenix, LID/NIAID/NIH (HRSV)                               |  |
|  |  | LID/NIAID/NIH (HRSV)  |  |
|  |  | LID/NIAID/NIH (PIV1-3/HRSV)                                   |  |
|  |  | Meissa Vaccines (HRSV)  |  |
|  | Phase I  | Intravac (HRSV-ΔG)  |  |
|  | Sanofi, LID/NIAID/NIH (HRSV-ΔNS2/Δ1313/11314L)       |   |  |
|  | Sanofi, LID/NIAID/NIH (HRSV 6120/ΔNS2/1030s)         | Population pédiatrique  |  |
|  | Pontificia Universidad Catolica de Chile (BCG/HRSV)  |   |  |
|  | Sanofi, LID/NIAID/NIH (HRSV D46/NS2/N/ΔM2-2-HindIII) |   |  |
|  | SIPL, St. Jude Hospital                              |   |  |
| <b><u>Entier-inactivé</u></b>                | Préclinique  | Blue Willow Biologics (HRSV)                                  |  |
| <b><u>Sous forme de particule virale</u></b> | Préclinique  | AgilVax (VLP)   |  |
|  |  | Fraunhofer (VLP)  |  |
|  |  | Icosavax (VLP)  |  |
|  |  | University of Massachusetts (VLP)                             |  |
|  |  | Artificial Cell Technologies ( <i>Peptide microparticle</i> ) |  |
|  |  | Georgia State University (VLP)                                |  |
|  |  | TechnoVax (VLP)   |  |
|  |  | Virometix (VLP)   |  |
|  | Phase I  | Novavax (nanoparticule HRSV F)                                | Population pédiatrique                     |
|  | Phase II   | Novavax (nanoparticule HRSV F)                                | Personnes âgées                            |
| Phase III                                    | Novavax (nanoparticule HRSV F)                       | Immunisation maternelle                                       |  |
| <b><u>Vaccin sous-unitaire</u></b>           | Préclinique  | Instituto de Salud Carlos III (protéine F)                    |  |
|  |  | University of Georgia (protéine G)                            |  |
|  |  | Sciogen (protéine G)  |  |
|  |  | University of Saskatchewan (protéine F)                       |  |
|  | Phase I  | Beijin Advaccine Biotechnology (protéine G)                   | Population pédiatrique et personnes âgées  |
|  |  | Immunovaccine, VIB (protéine SH DPX-HRSV)                     | Personnes âgées                            |
|  |  | NIH/NIAID/VRC (protéine F)                                    | Personnes âgées et Immunisation maternelle |
|  |  | GlaxoSmithKline (protéine F)                                  | Population pédiatrique / maternelle        |
|  | Phase II   | Janssen pharmaceutical (protéine F)                           | Personnes âgées                            |
|  |  | Pfizer (protéine F)   | Immunisation maternelle                    |
| <b><u>Acides nucléiques</u></b>              | Préclinique  | CureVac (ARN)   |  |
|  |  | Inovio Pharmaceuticals (ADN)                                  |  |
| <b><u>Vecteur recombinant</u></b>            | Préclinique  | BravoVax (adénovirus)   |  |
|  | Phase I  | Vaxart (adénovirus)   | Personnes âgées                            |
|  | Phase II   | Bavarian Nordic (MVA)   |  |
| Janssen Pharmaceutical (adénovirus)          |  | Population pédiatrique et personnes âgées                     |  |
|  | GlaxoSmithKline (adénovirus)                         | Population pédiatrique  |  |

Tableau 7 : Candidats-vaccin HRSV. La plupart des vaccins en cours de développement pour le HRSV sont dans des phases précoces de développement (recherche préclinique ou phase I). Il est aussi intéressant de noter les quelques candidats pour l'immunoprophylaxie. Synargis (par MedImmune) est la seule prescription à avoir atteint l'étape d'autorisation de mise sur le marché. Synargis/Palivizumab est un anticorps monoclonal recombinant humanisé produit en cellules de myélome murin. Il est prescrit sous la forme d'une injection mensuelle durant la période épidémique aux jeunes enfants (<6 mois) à risque (adapté de Higgins et al. 2016). Depuis février 2019, l'essai clinique de phase III de la compagnie Novavax pour son candidat-vaccin ResVax s'est avéré non satisfaisant vis-à-vis des critères principaux d'évaluation mais la compagnie indique qu'il diminuait la gravité des symptômes et les hospitalisations.

## IV . 2 . Traitements actuellement disponibles ou en cours de développement

### IV . 2 . A . Thérapies de soutien

Lorsqu'un patient est pris en charge à l'hôpital pour une suspicion d'infection virale respiratoire, des thérapies de soutien sont mises en place<sup>2,219</sup>. Elles consistent en un panel de soins : désobstruction nasale, alimentation fractionnée, remplacement des fluides, oxygénothérapie dans les cas de désaturation marquée en oxygène et ventilation mécanique dans les cas les plus sévères<sup>2,219</sup>.

### IV . 2 . B . Traitements antiviraux

Les thérapies antivirales restent malheureusement anecdotiques dans le cas des IRAs<sup>220-223</sup>. Les prescriptions existantes concernent uniquement les cas d'infection par des virus influenza ou (dans une moindre mesure) par le HRSV.

#### IV . 2 . B . a) Cas des virus influenza

##### IV . 2 . B . a) i. Molécules sur le marché

En ce qui concerne la grippe, trois classes d'antiviraux ont été approuvées par les instances réglementaires : (i) les inhibiteurs du canal calcique M2, tels que l'amantadine<sup>224</sup> et la rimantadine<sup>225</sup>, (ii) les inhibiteurs de la neuraminidase (NA), tels que l'oseltamivir<sup>226</sup> et le zanamivir<sup>227</sup> constituent les antiviraux historiques et plus récemment, (iii) des inhibiteurs de l'endonucléase virale (PA) ont été développés, tels que le favipavir<sup>228</sup> ou le baloxavir<sup>229</sup>. A ce jour, 8 antiviraux contre les virus influenza ont été mis sur le marché (Tableau 8). Parmi ces composés, seuls 3 sont encore utilisés aujourd'hui et recommandés par l'OMS. Ils appartiennent à la classe des inhibiteurs de neuraminidase (oseltamivir, zanamivir et peramivir).

En effet les antiviraux ciblant le canal M2 (adamantanes) sont aujourd'hui proscrits du fait de la problématique de résistance aux antiviraux. En effet, une étude réalisée au Mexique illustre parfaitement cette problématique : sur 284 séquences de M2 extraites de bases de données (échantillonnées entre 2000 et 2017), 100% des séquences de H1N1pdm09, 83.6% des séquences H3N2 et 5.8% des séquences saisonnières de H1N1 portent les marqueurs de résistance aux inhibiteurs de M2<sup>230</sup>. Plus généralement, depuis le début des années 2000, toutes les souches de

H3N2 circulantes présentent une résistance aux adamantanes à la suite de l'acquisition de la substitution S31N<sup>231</sup>. Il a donc été nécessaire de développer des traitements alternatifs.

#### IV. 2. B. a) i. 1) Les inhibiteurs de NA

L'oseltamivir, délivré *per os*, est la molécule la plus utilisée des trois inhibiteurs de NA, suivi du zanamivir délivré sous forme de poudre (déconseillé chez les jeunes enfants), puis du peramivir qui est injecté par voie intraveineuse, chez les patients en réanimation, sous ventilation mécanique et ne pouvant donc pas recevoir de traitement par voie orale<sup>232</sup>. A noter qu'en France, seules deux molécules disposent d'une autorisation de mise sur le marché: l'oseltamivir et le zanamivir.

Les inhibiteurs de NA réduisent la durée des symptômes et améliorent la survie des patients, surtout lorsqu'ils sont administrés très tôt<sup>233,234</sup>. Cependant, l'émergence de virus résistants est très documentée notamment pour l'oseltamivir<sup>235,236</sup>. Les premiers rapports de résistance à l'oseltamivir apparaissent au cours des saisons grippales 2007-2008 et 2008-2009, avec jusqu'à 90% des souches en circulation présentant une résistance<sup>237-239</sup>. Par chance, les souches en circulation durant la pandémie de 2009 contenaient rarement ces mutations de résistance à l'oseltamivir. Les virus influenza résistants à l'oseltamivir portent soit les substitutions d'acides aminés H274Y et N294S (H1N1) ou E119V et R292K (H3N2), R152K et D198N (IBV). Les mutations E119V ou R292K confèrent une résistance respectivement 500 à 10 000 fois supérieure au virus non muté<sup>240</sup> (réaction enzymatique). Cependant, jusqu'à présent, les patients atteints de grippe due à un virus résistant à l'oseltamivir ont pu être traités avec succès par le zanamivir du fait de l'absence de résistance croisée, à la différence des mutations associées aux traitements par l'amantadine et la rimantadine<sup>232,237,241</sup>.

Les virus résistants aux inhibiteurs de NA peuvent non seulement émerger sous la pression de la sélection du traitement, mais aussi naturellement au cours de l'évolution. Cela a été le cas en 2007-2009, avec le signalement d'une forte prévalence de virus analogues à A/Brisbane/59/2007 (H1N1) résistants à l'oseltamivir (mutation H274Y) dans le monde entier<sup>231,239,242</sup>. La propagation de tels virus mutants dépend en grande partie de leur « *fitness* », c'est-à-dire leur capacité à se répliquer et à se transmettre efficacement.

Par ailleurs, il est intéressant de noter l'avis de la Haute Autorité de Santé en France concernant le traitement préventif à l'oseltamivir de sujets à risque (sujets vivant en collectivités ou présentant une contre-indication au vaccin ou sujets ou situations où la protection vaccinale est incomplète par rapport à la souche circulante): le service médical rendu par l'oseltamivir reste « modéré dans le traitement prophylactique de la grippe » (09/07/2014) et est « insuffisant pour justifier une prise en charge par la solidarité nationale, en tant que traitement curatif de la grippe chez les nouveau-nés à

terme et enfants de moins d'un an, présentant des symptômes typiques de la grippe en période de circulation du virus » (07/06/2017).

#### IV. 2. B. a) i. 2) Les inhibiteurs de polymérase

Le favipiravir (prodrogue, analogue de nucléoside) est actuellement en cours d'évaluation pour son effet anti-grippe<sup>243</sup>. La réduction de la réplication virale par l'inhibition de la polymérase virale (ARN-dépendante) en ferait un antiviral à large spectre contre plusieurs virus à ARN tels que les flavivirus, entérovirus mais également contre le HRSV<sup>244,245</sup>. *In vitro*, le favipiravir est efficace contre tous les sous-types de virus grippaux testés, y compris les virus aviaires et ceux décrits comme peu sensibles ou insensibles aux inhibiteurs de NA<sup>246</sup>. En modèle murin, la molécule prévient ou réduit la sévérité de l'infection lors de challenges infectieux mortels, en particulier en combinaison avec l'oseltamivir<sup>247,248</sup>. Il est recensé actuellement 5 essais cliniques de phase II ou de phase III (NCT01068912, NCT02026349, NCT02008344, NCT01728753 et NCT03394209). Cependant, il faut noter que seuls les résultats de l'essai NCT01068912 (pour l'établissement d'une dose optimale) sont disponibles, bien que les autres études soient finalisées depuis plusieurs mois.

Malgré cela, la prescription très encadrée du favipiravir est autorisée au Japon chez les patients infectés par un virus de la grippe nouveau ou ré-émergent résistant aux autres antiviraux<sup>249</sup>.

Depuis 2018, il existe un nouveau médicament sur les marchés japonais et américain : le baloxavir marboxil (Xofluza). Il est le premier antiviral contre la grippe approuvé depuis une vingtaine d'années. Il cible l'activité de l'endonucléase virale (PA) permettant une réduction des symptômes en 53.7h (similaire à l'effet de l'oseltamivir) et une baisse importante du titre viral<sup>229,250</sup>. Cependant, une susceptibilité décroissante a aussi été décrite lors de l'essai clinique de phase III (NCT02954354). Des substitutions au niveau du site actif de l'endonucléase (I38T/F) sont en effet corrélées avec cette baisse d'efficacité du baloxavir. Par exemple, les virus portant la substitution I38M/F sont moins sensibles au baloxavir et ont été retrouvés chez presque 10% des patients inclus (chiffre en hausse depuis l'essai précédent de phase II). Ainsi, à peine mis sur le marché qu'émergent et circulent des résistances virales au baloxavir, comme cela a été rapporté chez un enfant non traité<sup>250-252</sup>. De plus, les virus résistants (A(H1N1)pdm09 and A(H3N2), substitution I38T) ne présentent pas de *fitness* altéré, ce qui fait craindre une potentielle dissémination exacerbée de ces virus<sup>253</sup>.

Bien que ce médicament présente une efficacité certaine, il n'est pas surprenant que nous soyons confrontés aux mêmes problématiques de résistance virales que celles rencontrées avec l'oseltamivir. La stratégie classique consistant à cibler un déterminant viral est une stratégie présentant des risques majeurs du fait des caractéristiques de grande variabilité des virus influenza

et donc de l'apparition systématique de virus résistants à ces antiviraux classiques, même peu de temps après l'introduction d'un nouvel antiviral sur le marché et sans pression de sélection puisqu'aucune politique publique de prophylaxie n'a été mise en place à ce jour.

| Nom de l'antiviral                   | Nom commercial              | Classe pharmacologique         | Effets secondaires  | Résistances rapportées  |
|--------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|---|---|
| Oseltamivir phosphate*               | Tamiflu                     |                                | Nausées, vomissements   | Influenza A(H1N1) : substitution H275Y                              |
| Zanamivir                            | Relenza                     |                                | Bronchospasmes, diarrhées, nausées, maux de tête, vertiges              | Influenza A (H1N1) : H275Y ou E119D ou E119G                        |
| Peramivir (USA, Japon, Corée du Sud) | Synagis                     | Inhibiteur de neuraminidase    | Neutropénies, diarrhées   | Influenza A(H1N1) : H275Y   |
| Laninamivir octanoate (Japon)        | Inavir                      |                                |   |   |
| Favipiravir* (Japon)                 | Avigan                      | Inhibiteur de polymérase       |   | Influenza A(H1N1) : K229R et P653L                                  |
| Amantadine hypochloride*             | Gocovri/ Osmolex/ Symmetrel | Inhibiteur du canal ionique M2 | Evènements cardiaques, neurologiques et gastrointestinaux, neutropénies | Influenza A (H3N2) et (H1N1) pdm09 (pas d'effet anti- Influenza B)  |
| Rimantadine hypochloride*            | Flumadine                   |                                | Evènements cardiaques et neurologiques                                  | Influenza A (H3N2) et (H1N1) pdm09 (pas d'effet anti- Influenza B)  |
| Baloxavir marboxil*                  | xofluza                     | Inhibiteur d'endonucléase      | Diarrhées, bronchites   | Influenza A (H3N2) et (H1N1) : I38F/M/F (diminution susceptibilité) |

Tableau 8: Antiviraux actuellement sur le marché pour le traitement d'infections aux virus influenza humains (Adapté de Hijano et al. 2018). Le baloxavir marboxil a été développé par la compagnie Shinogi pour le traitement de patients atteints de grippe et est approuvé depuis octobre 2018. Des résistances sont déjà décrites dans 10% des cas de l'essai de phase III. \* Evènements de résistance rapportés

#### IV. 2. B. a) ii. Candidat médicaments en développement

Le Tableau 9 résume l'ensemble des antiviraux en développement pour le traitement d'infections aux virus influenza.

Le pimodivir est un antiviral prometteur, pour lequel deux essais cliniques de phase III sont en cours (NCT03376321, NCT03381196) et une pré-approbation de cette même molécule existe pour le traitement de patients infectés par H7N9 (NCT03834376). Il inhibe la réplication virale par son action sur la sous-unité PB2<sup>254</sup>. Des études *in vitro* et en modèle murin ont montré que le pimodivir était efficace contre plusieurs IAV, y compris sur un panel de souches résistantes aux inhibiteurs de NA. Selon le sous-type de virus, son activité varie significativement, probablement en raison de différences dans la structure de PB2 entre les divers virus A<sup>255</sup>. Chez l'Homme, les résultats d'essais cliniques de phase IIa et IIb sont très positifs, avec une réduction importante de la charge virale et du délai de résolution des symptômes associés, en particulier en combinaison avec l'oseltamivir<sup>256,257</sup>. Cependant, comme dans le cas du baloxavir ou des inhibiteurs de NA, le traitement par le pimodivir a été associé à l'apparition de mutations conférant une sensibilité moindre des virus à ce médicament candidat. L'émergence de substitutions de PB2 ou d'une résistance phénotypique au pimodivir a notamment été mise en évidence chez 11 des 172 patients, méritant une attention toute particulière<sup>257</sup>.

L'ensemble des protéines du virus de la grippe ont été décrites comme cibles thérapeutiques potentielles, ainsi que l'ARNm et les cytokines sécrétées lors de l'infection. D'autres déterminants viraux sont également la cible de plusieurs candidats médicaments, tels que l'umifenovir (ou Arbidol<sup>258</sup>), inhibiteur de fusion ou l'ingavirin, antiviral par son action sur la NP (migration retardée) (Tableau 9).

Puisque les sites de glycosylation de la HA des IAV sont relativement bien conservés et que les anticorps neutralisants dirigés contre ces sites semblent efficaces contre un grand nombre de virus influenza, cela a encouragé des recherches en vue de développer des anticorps monoclonaux (MAB) ciblant spécifiquement ces régions conservées<sup>259</sup>. Les MEDI8852, CT-P27, CR6261, CR8020, MHAA4549A, TCN-032 et VIS410 ont atteint la phase II de développement<sup>260-262</sup> (Tableau 9). L'administration de ces MAB a permis de réduire le pic de charge virale, la durée de l'excrétion virale et les scores des symptômes grippaux par rapport à ceux du groupe placebo, le tout sans l'apparition de virus résistant<sup>260-262</sup>. Cependant, l'association de l'oseltamivir avec MHAA4549A ou MEDI8852 chez des adultes infectés (NCT02293863 et NCT02603952) n'apporte aucun avantage clinique significatif en comparaison au traitement par oseltamivir seul. En plus de leur activité limitée uniquement aux IAV, cela semble être un frein important au développement de telles stratégies.

Alternativement, de nouvelles approches ciblant la cellule hôte plutôt que les déterminants viraux ont été développées notamment en association avec des antiviraux classiques. C'est dans cette dynamique que s'inscrivent les travaux de notre équipe et mon travail de recherche doctoral, comme décrit dans la partie Résultats. D'autres laboratoires ont également privilégié cette approche, telle que présentée dans l'étude de Belardo et collaborateurs, qui s'est intéressée à la combinaison d'inhibiteurs de NA classiques avec du nitazoxanide<sup>263,264</sup>. En culture cellulaire (modèles humains et aviaires), cette combinaison a révélé des effets anti-grippaux synergiques. Un essai clinique de phase II sur 260 patients atteints d'IRAs a été mené sur 3 saisons épidémiques (de 2014 à 2017) au Mexique. Le critère principal d'évaluation était le temps écoulé entre la première dose et la sortie de l'hôpital. Cet essai clinique n'a pas montré de bénéfice significatif du traitement au nitazoxanide ni concernant la durée d'hospitalisation ni la supplémentation en oxygène ni l'excrétion de virus respiratoires<sup>265</sup>. Deux essais cliniques complémentaires ont été achevés, mais les résultats ne sont pas encore publiés (NCT01610245 et NCT02612922).

Le DAS181 (Fludase) constitue un candidat prometteur ciblant l'hôte. En effet, le DAS181 permet un clivage enzymatique des acides sialiques de la cellule épithéliale, empêchant la fixation de multiples virus respiratoires dont les virus influenza ou parainfluenza. Son efficacité a été évaluée et

validée lors d'un premier essai clinique de phase II chez des patients immunosupprimés, sous ventilation mécanique et présentant une infection des voies aériennes basses par un virus parainfluenza<sup>266</sup> (NCT01644877). Un essai de phase III est en cours pour cette même indication (NCT03808922). Les essais sont en phases de développement moins avancées en ce qui concerne les infections aux virus influenza.

Il est aussi intéressant de noter le cas du célécoxib (anti-inflammatoire non stéroïdien, inhibiteur de COX-2, modulateur d'inflammation et de réponse immunitaire) qui, en combinaison avec l'oseltamivir, réduit la mortalité chez les souris infectées par une souche d'H3N2 (effet sur l'immunopathologie induite par l'infection)<sup>267</sup>. Un essai de phase III pour cette combinaison a été réalisé sur des patients atteints d'une infection grave par IAV, nécessitant une hospitalisation et un apport en oxygène (NCT02108366). Les résultats définitifs ne sont pas encore publiés.

La diversité et la variabilité des virus influenza compliquent le développement de traitements antiviraux contre l'ensemble des souches, mais la stratégie ciblant la cellule hôte permet d'envisager le développement d'antiviraux de nouvelle génération présentant non seulement des propriétés inhibitrices à large spectre, mais également l'avantage de diminuer le risque d'apparition de résistance virale.

| Nom de l'antiviral                             | Classe ou mécanisme d'action                              |
|--|---|
| DAS181 (Fludase) <sub>1</sub>                  | Cible les acides sialiques (récepteurs)                   |
| Laninamivir (CS-8958) déjà en licence au Japon | Inhibiteur de neuraminidase                               |
| JNJ-63623872 (VX-787 pimodivir) <sub>3</sub>   | Inhibiteur non nucléosidique (PB2)                        |
| Nitazoxanide (NT-300 alinia) <sub>3</sub>      | Thiazolides (inhibe la maturation de la HA)               |
| AVI-7100 (Radavirsen) <sub>1</sub>             | Oligonucléotide anti-sens (inhibe la traduction M1 et M2) |
| JNJ-64155806 (AL-794) <sub>1</sub>             | Inhibiteur d'endonucléase                                 |
| Ingavirin <sub>3</sub>                         | Inhibe la nucléoprotéine                                  |
| Umifenovir déjà en licence en Russie           | Inhibiteur de fusion                                      |
| Anaferon déjà en licence en Russie             | Anticorps (Anti-INF-g)                                    |
| Ergoferon déjà en licence en Russie            | Anticorps (Anti-INF-g, anti-CD4, et antihistamine)        |
| MEDI8852 <sub>2</sub>                          | Anticorps monoclonal (HA)                                 |
| CT-P27 <sub>2</sub>                            | Anticorps monoclonal (HA)                                 |
| CR6261 <sub>2</sub>                            | Anticorps monoclonal (HA)                                 |
| CR8020 <sub>2</sub>                            | Anticorps monoclonal (HA)                                 |
| MH <sup>n</sup> 4549A <sub>2</sub>             | Anticorps monoclonal (HA)                                 |
| TCN-032 <sub>2</sub>                           | Anticorps monoclonal (M2)                                 |
| VIS410 <sub>2</sub>                            | Anticorps monoclonal (HA)                                 |

Tableau 9: Antiviraux et anticorps en cours de développement pour le traitement d'infections par les virus influenza. Les résultats des essais cliniques de phase II s'intéressant au traitement par les anticorps monoclonaux MHAA4549A ou MEDI8852 n'ont pas permis de conclure à un avantage significatif de ce traitement comparé aux inhibiteurs de NA classiques. Cependant, compte tenu de la grande conservation de sites de glycosylation dans la tige de la HA, des Mab continuent d'être évalués pour le traitement d'infections par le(s) virus de la grippe. Modifié à partir de GlobalData ([www.globaldata.com](http://www.globaldata.com)), Nicholson et al. et Hijano et al. 2018. <sub>1</sub> : phase I / <sub>2</sub> : phase II / <sub>3</sub> : phase III

IV. 2. B. b) i. 1) Molécules sur le marché

La seule thérapie actuellement approuvée par la FDA contre le HRSV est l'administration par aérosol de ribavirine, analogue nucléosidique de synthèse qui inhibe l'action de la déshydrogénase (Tableau 10). Elle est proposée afin d'éviter la progression de l'infection vers les voies basses de l'appareil respiratoire, en particulier chez les enfants en bas âge hospitalisés ou à risque<sup>221,268</sup>. L'administration par aérosol de la ribavirine ne peut être envisagée que dans les cas les plus graves puisque la molécule cause des bronchospasmes sévères, pouvant potentiellement aggraver les symptômes de l'infection<sup>269</sup>. De plus, des effets indésirables parfois graves ont été observés lors de l'administration conjointe de ribavirine et d'interféron: affections du sang (anémie ou neutropénie), troubles psychiques (baisse de moral, état dépressif, idées suicidaires, irritabilité, agressivité, troubles du sommeil), maux de tête, difficulté de concentration et étourdissements ou affections respiratoires (toux, essoufflement), parmi d'autres. L'administration de ribavirine par voie orale a également été proposée dans les cas de patients immunodéprimés, avec une efficacité qui reste à démontrer<sup>222</sup>.

Une autre approche thérapeutique, s'appuyant sur l'utilisation d'immunoglobulines, a également été développée. Les recherches ont notamment débuté par l'administration d'immunoglobuline par voie intraveineuse (IVIg) en combinaison avec de la ribavirine. Chez des enfants ayant reçu une transplantation de moelle, cette association a permis la survie de 11/12 patients en 2000<sup>270</sup>. Les IVIg comme le RespiGam<sup>143</sup> ont été abandonnées au profit du palivizumab (MAb humanisé injecté en intramusculaire)<sup>88</sup>. Cette IgG monoclonale synthétique est actuellement utilisée pour prévenir l'aggravation des symptômes d'une infection par le HRSV chez des nourrissons ou enfants à risque (atteints de dysplasie bronchopulmonaire, naissance prématurée ou maladie cardiaque congénitale)<sup>271-274</sup>. Cependant, ce traitement ne permet pas de modérer la progression (vers des formes sévères ou décès) de l'infection par HRSV chez des adultes immunodéprimés<sup>275</sup>. De plus, compte tenu du prix élevé du palivizumab et des résultats assez mitigés globalement obtenus, son utilisation clinique n'est pas routinière, notamment chez les adultes immunodéprimés<sup>276</sup>. Il est intéressant de mentionner les deux essais cliniques de phase II/III et III (NCT03979313 et NCT03959488) concernant le MEDI8897 (issu d'un accord entre MedImmune et Sanofi Pasteur), un nouvel anticorps monoclonal destiné à la prévention des affections des voies respiratoires inférieures causées par le HRSV. Ces essais cliniques font suite à des résultats très encourageants sur des nourrissons prématurés non éligibles au traitement par la ribavirine<sup>277</sup>.

| Nom de l'antiviral | Nom commercial | Classe pharmacologique | Effets secondaires                           | Résistances rapportées |
|--------------------|----------------|------------------------|--|------------------------|
| Ribavirine         | Rebetol        | Analogue de nucléoside | Hémolyse bronchoplasmique et toxicité rénale | Aucune                 |

Tableau 10: Antiviraux actuellement approuvés pour le traitement d'une infection par le HRSV (Adapté de Hijano et al. 2018).

#### IV. 2. B. b) i. 2) Candidat médicaments en développement

Les thérapies antivirales contre le HRSV en développement s'intéressent majoritairement à l'étape d'entrée du virus dans la cellule épithéliale ou cherchent à interférer avec la réplication virale<sup>278</sup>. En effet, le BTA-9881 ou le MDT-637 ciblent la protéine de fusion<sup>158</sup> pour empêcher l'entrée du virus (Tableau 11). Une autre stratégie s'intéresse à la nucléocapside, pour laquelle les protéines N, P et L sont de potentielles cibles thérapeutiques et font l'objet d'évaluations précliniques. Les échecs en phases avancées de développement d'antiviraux anti-HRSV peuvent être illustrés par l'exemple de la lumicitabine. L'exploitation de la lumicitabine (ALS-008176, analogue de nucléoside, polymérase ARN-dépendante) a été abandonnée par la compagnie Johnson & Johnson en mars 2019 malgré des résultats cliniques précédents très encourageants<sup>279</sup>. Les informations disponibles mentionnent en effet l'observation d'anomalies graduelles des neutrophiles suite au traitement (numéro EudraCT 2013-005104-33), conduisant ainsi à l'arrêt des essais cliniques et à l'analyse de nouvelles données non cliniques supplémentaires.

| Nom de l'antiviral                   | Classe ou mécanisme d'action                  |
|--------------------------------------|---|
| GS-5806 (Presatovir) <sub>2</sub>    |   |
| VP-14637 (MDT-637)                   |   |
| JNJ-53718678 <sub>2</sub>            |   |
| MDT-637 <sub>1</sub>                 | Inhibiteurs de fusion                         |
| JNJ-53718678 <sub>2</sub>            |   |
| BTA-C585 (Enzaplatovir) <sub>2</sub> |   |
| RV521 <sub>2</sub>                   |   |
| AK-0529 <sub>2</sub>                 |   |
| HRSV604 <sub>2</sub>                 | Inhibiteur de nucléoprotéine (Benzodiazepine) |
| ALN-HRSV01 <sub>2</sub>              | Petit ARN interférant (Nucléocapside / ARNm)  |
| REGN2222 (Suptavumab)                | Anticorps monoclonal                          |
| MEDI8897                             | Anticorps monoclonal                          |
| ALX-0171 (Caplacizumab) <sub>2</sub> | Anticorps monoclonal (protéine F)             |
| EDP-938 <sub>1</sub>                 | Inhibiteur de réplication (cible inconnue)    |
| JNJ-64417184 <sub>1</sub>            | Inhibiteur de polymérase                      |
| PC786 <sub>2/3</sub>                 | Inhibiteur de polymérase (Protéine L)         |
| RI-001 <sub>2</sub>                  | Anticorps neutralisant                        |

Tableau 11: Antiviraux et anticorps en cours de développement pour le traitement d'infections par le HRSV. Modifié à partir de GlobalData ([www.globaldata.com](http://www.globaldata.com)), Nicholson et al. et Hijano et al. 2018. <sub>1</sub> : phase I / <sub>2</sub> : phase II / <sub>3</sub> : phase III

#### IV. 2. B. b) ii. HMPV

##### IV. 2. B. b) ii. 1) Molécules sur le marché

En ce qui concerne le HMPV, aucun composé n'est à ce jour autorisé sur le marché pour une indication thérapeutique efficace et sans danger.

La ribavirine n'a pas prouvé son efficacité ni *in vitro*<sup>280</sup>, ni en modèle de souris BALB/c<sup>281</sup>. Les immunoglobulines ont une activité antivirales contre HMPV *in vitro* mais leur utilisation chez de jeunes enfants semble difficile à mettre en place à cause des volumes de fluides nécessaires<sup>280</sup>. La combinaison ribavirine-IVIg a montré une certaine efficacité dans quelques cas de pneumonies dues au HMPV<sup>282</sup>.

##### IV. 2. B. b) ii. 1) Candidat médicaments en développement

Le Tableau 12 liste l'ensemble des stratégies envisagées pour le traitement des infections par le HMPV. Le NMSO3 (lipide sialique sulfaté) empêcherait par exemple l'attachement et la fusion à la cellule hôte (mécanisme de compétition), ce qui expliquerait son activité antivirale *in vitro* et en souris BALB/c<sup>280,283</sup>.

Les résultats de la thérapie monoclonale au palivizumab sur le HRSV encouragent la recherche d'anticorps ciblant par exemple la protéine F du HMPV. En plus d'être son antigène principal, cette protéine est très conservée entre les sous-types d'HMPV, d'où son potentiel important de cible antivirale. Hamelin et collaborateurs ont par exemple utilisé le MAb 338 (MAb murin, MedImmune, Inc.) en prophylaxie et thérapie pour des souris BALB/c infectées par HMPV, conduisant à une réduction drastique du titre viral<sup>284</sup>. Ces thérapies devront être adaptées chez l'Homme. D'autres pistes de développement s'intéressent à l'inhibition de la protéine de fusion<sup>285,286</sup> ou aux ARN interférents<sup>287</sup>.

| Stratégie de traitement | Traitement(s)               | Modèles testés et résultats  |
|-------------------------|-----------------------------|--|
| Antiviral               | Ribavirine                  | <i>In vitro</i> : activité antivirale  |
|                         |                             | <i>In vivo</i> (souris BALB/c) : Diminution répllication et inflammation (poumon)<br>Chez l'Homme : quelques utilisations anecdotiques   |
| Anticorps polyclonal    | IVIg                        | <i>In vitro</i> : activité neutralisante<br>Chez l'Homme : quelques utilisations anecdotiques  |
| Acide sialique          | NMSO3                       | <i>In vitro</i> : activité antivirale  |
|                         |                             | <i>In vivo</i> (souris BALB/c) : Diminution répllication et inflammation (poumon)  |
|                         | MAB 234 and MAB 338         | <i>In vivo</i> (Hamsters) : Effet protecteur<br><i>In vivo</i> (souris BALB/c) : Diminution des titres viraux pulmonaires (MAB338)   |
|                         | Fab DS7                     | <i>In vivo</i> (Sigmodon ou Cotton rats) : Diminution des titres viraux pulmonaires (thérapeutique)  |
| Anticorps monoclonal    | MAB MPE8                    | <i>In vitro</i> : activité antivirale<br><i>In vivo</i> (souris BALB/c) : Effet protecteur (prophylaxie) contre HMPV et HRSV   |
|                         | MAB 54G10                   | <i>In vitro</i> : activité neutralisante contre 4 sous-types HMPV et HRSV<br><i>In vivo</i> (souris DBA/2) : Effet protecteur (prophylaxie et thérapeutique) contre HMPV et HRSV |
|                         | Séquence synthétique F      | <i>In vitro</i> : inhibition d'infectiosité virale<br><i>In vivo</i> (souris BALB/c) : Effet protecteur  |
| Inhibiteur de fusion    |                             |  |
| ARN interférant         | Cible les ARNm de N, P ou G | <i>In vitro</i> : Activité antivirale particulièrement avec les ARNi N et P  |
|                         |                             | <i>In vivo</i> (souris BALB/c) : Diminution titres viraux (ARNi N)   |

Tableau 12: Stratégies de recherche pour combattre les infections à HMPV (Source : Wen et al. 2015).

L'arsenal thérapeutique actuel est donc largement insuffisant pour le traitement des infections par les pneumovirus, malgré un besoin critique en clinique, notamment pour le traitement des nouveau-nés infectés par HRSV.

Globalement, nous restons assez désarmés face à ces virus respiratoires puisque nous pouvons observer un déficit global de traitements antiviraux efficaces. La grande variabilité et l'acquisition spontanée de résistances sont des limites majeures au développement de nouveaux antiviraux efficaces, surtout dans le cas des virus influenza. Il est nécessaire d'envisager de nouvelles pistes de traitement et de nouvelles stratégies antivirales, pour éviter l'émergence de résistances. De nouvelles perspectives très prometteuses ont d'ailleurs pu être proposées avec l'objectif non seulement de développer de nouvelles molécules antivirales mais aussi d'obtenir des molécules ciblant plusieurs virus, notamment par le développement de stratégies ciblant la cellule plutôt que le virus.

## Chapitre 2 : Le repositionnement de médicaments : principe et applications

Dans ce contexte de défaut de traitements adaptés et efficaces, le laboratoire VirPath vise à identifier et valider des antiviraux de nouvelle génération qui ciblent la cellule hôte et s'appuie sur une démarche innovante de repositionnement de médicaments déjà sur le marché pour de telles indications anti-infectieuses. Avant de définir ce qu'est le repositionnement de médicaments, sont présentés dans le paragraphe suivant la définition d'un médicament, le marché des médicaments et les étapes clefs de leur développement jusqu'à leur accès au marché national et international.

### I. Développement classique d'un médicament

#### *I. 1. Définition d'un médicament*

L'article 1, paragraphe 2, de la directive 2001/83/CE3 du Parlement européen et du Conseil du 6 novembre 2001 définit le médicament à usage humain comme suit:

*(a) toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines;*

ou

*(b) toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'Homme ou pouvant lui être administrée en vue soit de restaurer, de corriger ou de modifier des fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique, soit d'établir un diagnostic médical.*

#### *I. 2. Le marché du médicament en quelques chiffres clefs*

Le marché mondial des médicaments a dépassé le seuil des 1 000 milliards de dollars (environ 826 milliards d'euros) de chiffre d'affaires en 2017<sup>288</sup>. Le marché américain (Etats-Unis) reste le plus important, avec une part de marché de 45%, ce qui le place devant l'Europe (16.5%) et le Japon (7.8%).

La France occupe la 5<sup>ème</sup> place au niveau mondial (3.7%), ce qui correspond à 5.9% du marché européen. En 2017, le chiffre d'affaires des entreprises françaises du médicament s'est élevé à 54.1 milliards d'euros (exprimé en prix fabricant hors taxes), dont 47 % (25.1 milliards d'euros) à

l'exportation. Les exportations françaises de médicaments sont préférentiellement destinées à l'Europe (55.5%), qui dépasse largement le reste du monde (Amérique : 15.6%, Asie : 13.0%, Afrique : 11.2%, Proche et Moyen-Orient : 4.1% et les autres : 0.6% ; Tableau 13).

| Zone Géographique      | % des exportations françaises |
|------------------------|-------------------------------|
| Europe                 | 55.5%                         |
| Amérique               | 15.6%                         |
| Asie                   | 13.0%                         |
| Afrique                | 11.2%                         |
| Proche et Moyen-Orient | 4.1%                          |
| Autres                 | 0.6%                          |

*Tableau 13: Répartition des exportations françaises de médicaments par zone géographique en 2017 (adapté du LEEM, statistiques douanières). Avec 25.1 milliards d'euros d'exportations (-3.7% par rapport à 2016), la France est très ouverte vers l'Europe (55.5%, ce qui correspond à 13.9 milliards) : l'Allemagne, l'Italie et la Belgique sont les interlocuteurs privilégiés puisqu'ils totalisent 43.2% des exportations françaises. Le Royaume-Uni totalise 10.4 % des exportations de la France en Europe, suivi de près par la Suisse et l'Espagne (respectivement 10.1 % et 6.0 %). A titre de comparaison, la France a importé près de 18 milliards d'euros de médicaments en 2017 (montant comparable à celui de 2016). Ces importations proviennent principalement d'Allemagne (17.1 %), des Etats-Unis (16.1 %), de Suisse (12 %) et d'Irlande (9.6 %).*

A l'égard des maladies infectieuses respiratoires, les traitements contre la grippe saisonnière ont représenté un marché de près de 6 milliards d'euros en 2015. L'antiviral le plus prescrit est l'oseltamivir (Tamiflu®, Roche) ; son chiffre d'affaires associé était de 876 millions d'euros en 2014, représentant 80% du marché. Depuis 2017, les brevets de l'oseltamivir sont tombés dans le domaine public.

Le marché des traitements contre les infections au HRSV est estimé à environ 2 milliards d'euros en 2024, avec une croissance annuelle de 29.9%. Le principal traitement est le Palivizumab (Synagis®, AstraZeneca), mais son brevet est tombé dans le domaine public en 2015. Son chiffre d'affaires était d'environ 1.1 milliard d'euros en 2008.

En ce qui concerne les autres virus majeurs responsables des IRAs comme le HMPV ou les coronavirus, aucun traitement efficace et aucun vaccin n'ont été mis sur le marché à ce jour. La plupart des médicaments prescrits aujourd'hui ne soignent que les symptômes et non l'origine des infections virales respiratoires. En termes de concurrence, il n'y a que 8 entreprises ou grands groupes qui commercialisent aujourd'hui les 9 molécules ou produits antiviraux, dont la majorité est spécifique des virus influenza uniquement.

Il est à noter qu'une évolution très récente des stratégies des industries pharmaceutiques s'est opérée par le développement de nouvelles molécules antivirales dirigées contre la cellule infectée, avec l'objectif de remédier aux limites des antiviraux classiques.

### 1.3. La découverte d'un nouveau médicament : des prémices à son autorisation de mise sur le marché

Le processus aboutissant à la mise sur le marché d'un nouveau médicament est très long et très coûteux (Tableau 14 et Figure 11). Il débute en laboratoire par une phase de découverte et de développement. La phase de découverte peut être initiée lors de l'acquisition de nouvelles informations sur une pathologie ou un traitement. En effet, on peut parcourir la littérature afin de retracer d'éventuels effets imprévus d'un traitement déjà existant ou s'intéresser à la description de voies biologiques impliquées dans une pathologie pouvant par exemple indiquer des mécanismes insoupçonnés (inflammation ? immunité ? autres ?) et donc une piste à suivre, qui oriente les recherches pour la conception de molécules ciblant des pathogènes ou des voies biologiques de l'hôte. Des cribles plus systématiques existent aussi avec des tests d'activité à très haut débit de composés divers.

A ce stade du processus, on compte des milliers de composés candidats au titre de médicament. Un set d'essais préliminaires *in vitro* permet de réduire le nombre de composés en fonction de leur efficacité, leur toxicité ou leur biodisponibilité (pharmacocinétique et métabolisme de la molécule).

La phase de développement commence avec la recherche d'informations clefs sur les composés candidats en question : comment sont-ils absorbés ? métabolisés ? éliminés ? à quelle dose ? selon quelle(s) voie(s) d'administration ? pour quel(s) bénéfice(s) ? *via* quel(s) mode(s) d'action ? associé(s) à quel(s) effet(s) secondaire(s) ? quelle(s) interaction(s) avec d'autres traitements ?

Ces composés sont ensuite testés *in vitro* (systèmes moléculaires inertes, cellulaires ou tissulaires en culture) puis *in vivo* avec des tests en modèles animaux (on parle d'étapes de recherche préclinique)<sup>289</sup>. Une fois ces étapes précliniques validées, une nouvelle phase démarre avec la mise en place d'essais cliniques sous la responsabilité de médecins investigateurs. Il faut noter qu'aujourd'hui, seul un composé candidat sur dix validés en préclinique atteint ce stade d'évaluation clinique.

La conception d'études cliniques est très encadrée et suit un processus réglementaire bien établi qui liste les critères de sélection, le nombre de personnes à inclure dans l'étude, la durée de celle-ci, la posologie et l'administration des médicaments candidats, les types de données cliniques et échantillons biologiques collectés, et l'encadrement des analyses de ces données. Le(s) critère(s) de jugement principal de ces études sont également clairement définis<sup>290</sup>. Les études cliniques se divisent en 4 phases principales :

- La phase I vise à enrôler 20 à 100 volontaires sains sur quelques mois afin de vérifier l'innocuité et la tolérance du produit (administration de doses croissantes à des volontaires sains).

- La phase II permet le recrutement de plusieurs centaines de patients afin de s'assurer de l'efficacité de la molécule et déterminer ses effets secondaires éventuels, en fonction de la dose délivrée. Cette phase vise à définir la dose pour une efficacité optimale.
- De 300 à 3000 volontaires sont nécessaires pour la phase III afin d'asseoir l'efficacité de la molécule et surveiller les réactions indésirables sur plusieurs années (1 à 4 ans).
- Après l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché (AMM), la sécurité et l'efficacité de la molécule sont enfin validés lors de la phase IV, qui recrute plusieurs milliers de volontaires. On parle alors de pharmacovigilance.

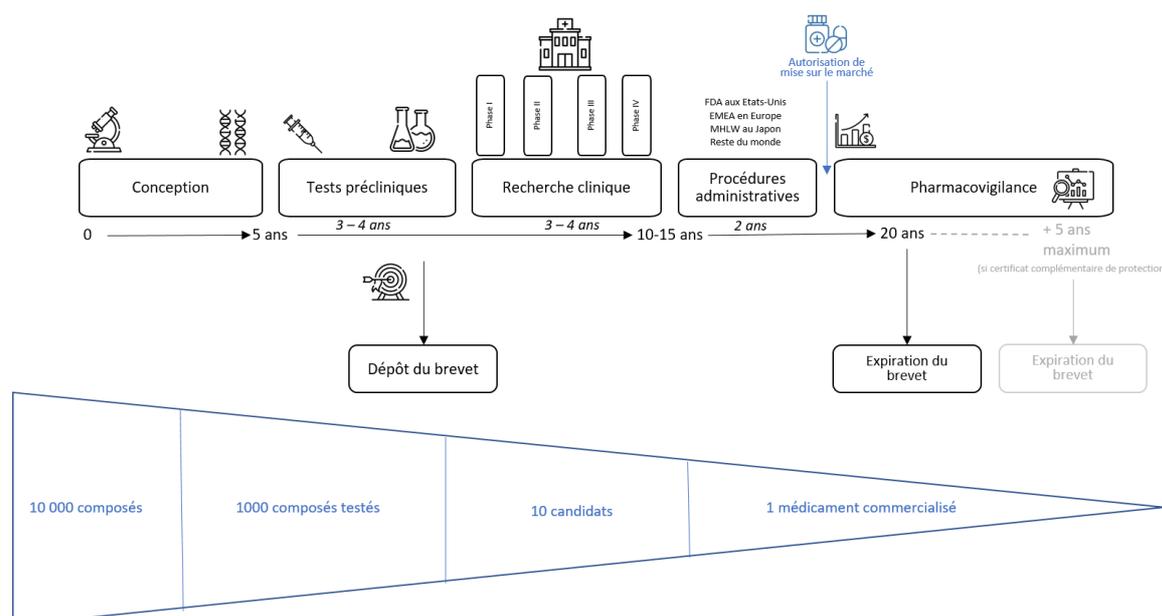


Figure 11: De la découverte d'un composé intéressant à sa mise sur le marché, la route du développement de novo est longue. L'approche traditionnelle de genèse d'un médicament se décompose en 4 étapes principales. La première étape de criblage et découverte peut être due au hasard, mais est souvent le fruit de criblages *in vivo* / *in vitro*. La chimie de composé devra être optimisée et ses caractéristiques ADMET (Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination et Toxicité) seront étudiées lors d'une phase de recherche préclinique. S'en suivent les essais cliniques (à partir de la phase I) et la déclaration auprès des autorités compétentes (FDA aux États-Unis, EMEA en Europe, MHLW au Japon, ANVISA au Brésil ...) pour une arrivée sur le marché presque 20 ans après la première manipulation de ce composé (D'après Almeida Moreira de Oliveira et Lang 2018)<sup>291</sup>.

Si les phases cliniques prouvent l'innocuité et l'efficacité d'un candidat-médicament pour l'usage auquel il est destiné (indication thérapeutique principale), une demande d'AMM peut être déposée auprès des instances de régulation soit au niveau national (FDA aux États-Unis et Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé - ANSM en France), soit au niveau européen (auprès de l'Agence européenne des médicaments - EMA). Outre les données précliniques et cliniques, les industriels doivent également déposer dans leur dossier d'enregistrement les analyses de ces études ainsi que des informations complémentaires (brevets, conformité, mode d'emploi, étiquetage, etc.). Avant d'être introduits sur le marché européen ou français, tous les

médicaments doivent tous recevoir une AMM, centralisée (pour les 27 états membres) ou nationale (L5121-8 code de la santé publique).

Un suivi de pharmacovigilance sera réalisé par les instances de contrôle afin d'ajouter des précautions d'usage ou mettre à jour les problèmes potentiels de sécurité. Les brevets déposés au cours de ce processus pour l'exclusivité d'exploitation ont une durée de vie de 20 ans. Dans le contexte de développement de nouveaux médicaments, une demande de certificat complémentaire de protection (CCP) peut être effectuée. Ce certificat permet de prolonger la durée de protection d'un produit (principe actif) entrant dans la composition d'un médicament ou du procédé d'obtention ou l'application de celui-ci. Il a vocation à compenser le temps nécessaire à l'obtention de l'AMM de nouveaux médicaments, qui peut retarder considérablement l'exploitation sous monopole du brevet. Le CCP prend le relai du brevet à l'expiration de celui-ci pour une durée maximale de 5 ans et demi. Au-delà, la molécule tombe dans le domaine public. Les données administratives du dossier d'AMM tombent quant à elles dans le domaine public huit ans après l'obtention de l'AMM : cela permet à des laboratoires de génériques de préparer leur copie en vue d'une commercialisation ultérieure, dès la chute du brevet princeps.

Globalement, sur 10 000 molécules criblées lors d'étapes précliniques, en moyenne 10 composés feront l'objet d'un dépôt de brevet et seulement 1 seule molécule obtiendra une AMM. Ce processus de développement d'un médicament (Tableau 14), qui dure en moyenne sur une période de douze ans est très complexe et très coûteux. En 2012, une étude avait estimé que la mise au point d'une nouvelle molécule représentait un investissement d'environ 900 millions de dollars<sup>292</sup>. Ces coûts sont en hausse et ont été ré-évalués à 2 voire 3 milliards de dollars en moyenne en 2016 pour une durée de développement de 13 à 15 ans<sup>293,294</sup>.

|                                |            |             | Phase I     | Phase II    | Phase III   |                            |             |
|--------------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------------------|-------------|
|                                | Découverte | Préclinique | Clinique    |             |             | Procédures administratives | TOTAL       |
| Durée (années)                 | 5          | 3-4         | 1,3         | 2,2         | 2,4         | 0,9                        | > 15 ans    |
| Coûts engagés (\$) par composé | 76 540 000 | 86 800 000  | 149 500 000 | 316 900 000 | 235 900 000 | 33 300 000                 | 899 000 000 |

Tableau 14: Coût du développement d'un médicament (Source : Mestre-Ferrandiz 2012). En plus d'être la plus risquée, la partie clinique du développement d'un nouveau médicament est de loin la plus coûteuse puisqu'elle totalise plus de 78% des dépenses totales.

Malgré cette hausse significative des coûts de développement, force est de constater que de moins en moins de « *blockbusters* » arrivent aujourd'hui sur le marché, or il existe actuellement un manque crucial de traitements pour de nombreuses pathologies, en particulier dans le domaine des

infections microbiennes respiratoires, du fait en particulier des problèmes de résistances virales et bactériennes accrues. Dans ce contexte, il est nécessaire de développer de nouvelles approches innovantes pour identifier des opportunités thérapeutiques, mais aussi afin de mieux comprendre et / ou d'identifier des modes d'action, ainsi qu'anticiper voire exploiter les effets secondaires de certains composés<sup>295-299</sup>.

## II . Le repositionnement de médicaments

Une AMM peut être amenée à être transférée (changement de titulaire) ; elle peut aussi être modifiée. L'alternative majeure au développement classique d'un médicament, tel que présenté précédemment, consiste à repositionner des médicaments pour de nouvelles indications thérapeutiques, dans le but d'exploiter au mieux l'ensemble de la pharmacopée existante et disponible<sup>300</sup>.

### II . 1 . Définition du repositionnement de médicaments

On définit le repositionnement comme la démarche permettant de trouver de nouveaux usages pour des médicaments déjà existants, en dehors de leur indication thérapeutique première<sup>300-303</sup>. Le repositionnement peut également concerner les médicaments candidats évalués en phases II et III d'essais cliniques, mais dont l'efficacité contre leur indication initiale n'est pas suffisante pour poursuivre leur développement final vers une AMM. Les raisons d'un repositionnement peuvent également être d'ordre commercial (médicaments discontinués pour des raisons commerciales, médicaments licenciés uniquement dans certains pays pour l'indication première, etc.)<sup>304</sup>.

L'avantage majeur de la stratégie de repositionnement des médicaments tient dans la réduction très significative des délais et des coûts de leur développement jusqu'à leur mise sur le marché pour la nouvelle indication thérapeutique (Figure 12). En effet, alors que le développement *de novo* d'une molécule prend en moyenne 12 à 15 ans, les médicaments repositionnés peuvent obtenir une AMM en moins de 6 ans avec des coûts largement diminués (environ 300 millions d'euros contre 2 à 3 milliards pour un développement *de novo*). Ceci s'explique notamment du fait que les caractéristiques ADMET (Absorption, Distribution, Métabolisme, Élimination et Toxicité) et / ou les effets secondaires associés de ces médicaments, soient connus et largement décrits dans leur demande initiale d'autorisation de mise sur le marché.

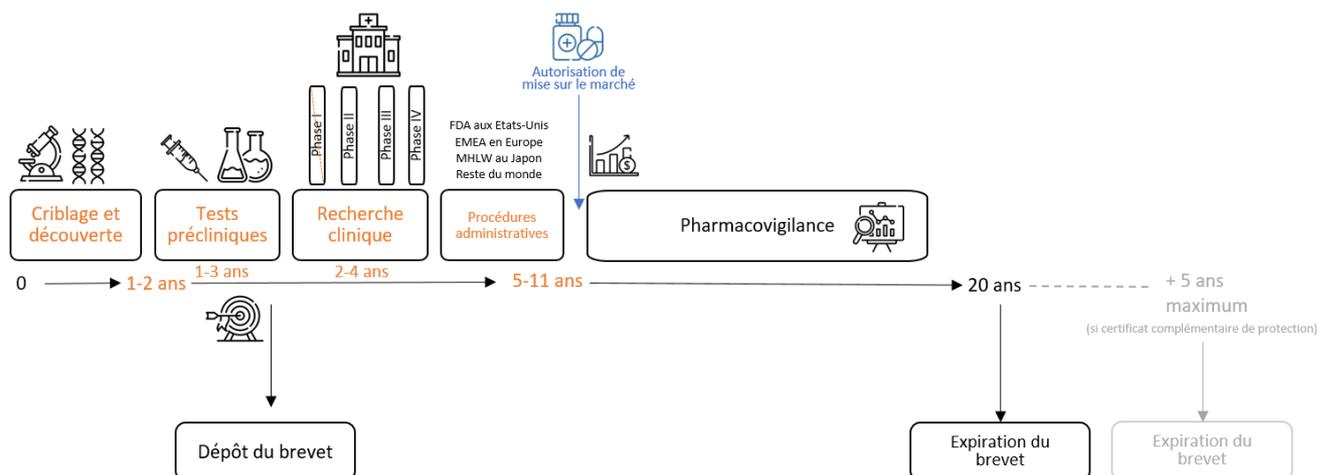


Figure 12: Une durée de développement raccourcie pour les médicaments repositionnés, synonyme d'une réduction des coûts et des risques. Le point de départ d'un repositionnement peut être un médicament déjà sur le marché (ADMET déjà établi, permettant de passer directement aux phases cliniques II et III) ou un composé ayant échoué au cours du processus de développement (Efficacité clinique insuffisante en phase II ou III par exemple). De ce fait, la plupart des candidats au repositionnement ont déjà validé les étapes majeures du processus menant à la mise sur le marché, permettant ainsi de diminuer de moitié le délai jusqu'à leur commercialisation pour la nouvelle indication thérapeutique, et ce pour moins d'un quart du prix (D'après Almeida Moreira de Oliveira et Lang 2018)<sup>291</sup>.

## II. 2. Le marché du repositionnement de médicaments

Du fait que le repositionnement de médicament permet en moyenne un gain de temps de 4.5 à 6 ans et une réduction des coûts de 85% en comparaison avec le développement de molécules *de novo*, le marché du repositionnement est en pleine croissance (5.1%/an) et il est estimé à 27.6 milliards d'euros pour 2020. Entre 2007 et 2009, 30 à 40% des médicaments ou produits biologiques approuvés ou lancés pour la 1ère fois aux USA sont issus du repositionnement.

Bien qu'étant une approche relativement récente, le repositionnement fait l'objet de la création croissante de start-up spécialisées (14 à 16 compagnies ont été créées en moyenne tous les 5 ans depuis une vingtaine d'années) et de l'attention grandissante des grands groupes pharmaceutiques qui commencent à investir des ressources dans cette approche (10 à 20% des dépenses R&D sont désormais consacrées au repositionnement). Quatre des plus grands groupes pharmaceutiques ont d'ailleurs mis en place des départements dédiés à cette stratégie (Pfizer, Bayer, GSK et Novartis).

## II. 3. Quelques exemples de repositionnement de médicaments réussis

Il existe de nombreux exemples de repositionnement de médicaments, dont l'un des plus représentatifs est celui du Thalidomide. Après avoir été vendu dans plus de 46 pays pour traiter les nausées de la femme enceinte, il a été retiré du marché en 1961 pour son caractère tératogène responsable de malformations congénitales<sup>305-307</sup>. Mais en 1964, le docteur Jacob Sheskin utilisa ce

médicament hors de son indication (prescription dite « *Off-label* ») pour ses propriétés sédatives afin de soulager un de ses patients souffrant d'une forme très agressive d'érythèmes noueux lépreux. Une observation fortuite et non attendue révéla des effets bénéfiques du Thalidomide pour le patient (guérison des plaies et soulagement des douleurs)<sup>308</sup>. Le Thalidomide bénéficie aujourd'hui d'une recommandation temporaire d'utilisation (RTU) en France dans la prise en charge d'aphtoses sévères, de formes cutanées du lupus érythémateux, d'érythèmes noueux lépreux, de maladies de Crohn active.

Nous pouvons également citer l'exemple du Bupropion, initialement prescrit en cas de dépression et repositionné aujourd'hui contre l'addiction au tabac, ou celui du Minoxidil, développé pour traiter l'hypertension artérielle et qui s'est révélé efficace contre la chute des cheveux suite à une analyse rétrospective des données des essais cliniques. Les ventes du Minoxidil repositionné ont représenté un chiffre d'affaires de 860 millions de dollars en 2016.

Enfin, l'exemple d'un repositionnement pré-AMM très connu est celui du Sildénafil de Pfizer qui fait référence dans le domaine. En effet, grâce à l'observation d'effets secondaires, ce candidat antihypertenseur initial est à présent plus connu sous le nom commercial de Viagra, et il est utilisé en seconde indication pour traiter le dysfonctionnement érectile<sup>300</sup>. D'autres exemples plus récents sont listés dans le Tableau 15.

| Traitement                                | Indication de prescription originale  | Nouvelle indication  |
|---|---|--|
| Aspirine                                  | Inflammation ou douleurs  | AVC et / ou infarctus du myocarde  |
| Bevacizumab                               | Cancer colorectal   | Cancer de l'ovaire sensible au platine   |
| Canakinumab                               | Maladies auto-inflammatoires rares appelées « <i>cryopyrin-associated periodic syndromes (CAPS)</i> » | Syndrome périodique associé au récepteur du facteur de nécrose tumorale; syndrome d'hyperimmunoglobuline D; fièvre méditerranéenne familiale |
| Facteur de coagulation VIIa (recombinant) | Hémophilie  | Thrombasthénie de Glanzmann  |
| Collagenase clostridium histolyticum      | Contracture de Dupuytren (fibrose rétractile)   | La maladie de Peyronie   |
| Difluprednate                             | Inflammation et douleurs liées aux chirurgies de l'oeil   | Uvélite antérieure endogène  |
| Dimethyl fumarate                         | Psoriasis   | Sclérose en plaque   |
| Everolimus                                | Rejet de greffon  | Tumeurs neuroendocrines d'origine gastro-intestinale ou pulmonaire; Cancer du sein HER2 négatif  |
| Lenvatinib                                | Cancer thyroïdien différencié métastatique, réfractaire à l'iode radioactif                           | Carcinome rénal avancé   |
| Mifepristone                              | IVG   | Hyperglycémie dans le syndrome de Cushing  |
| Nintedanib                                | Fibrose pulmonaire idiopatique  | Cancer poumon (non-small-cell)   |
| Propranolol                               | Hypertension, angine de poitrine, tachyarythmie, infarctus du myocarde, tachycardie                   | Hémangiome infantile   |
| Rapamycine                                | Rejet de greffon  | Lymphangioliomyomatose   |
| Ruxolitinib                               | Myélofibrose  | Polycythemia vera  |
| Sorafenib                                 | Cancer du foie et des reins   | Cancer thyroïde  |
| Topiramate                                | Epilepsie   | Obésité  |

Tableau 15: Quelques exemples récents de repositionnement de médicaments (Source : Polamreddy et Gattu 2019).

## II. 4. Exemples de repositionnement dans la grippe

En ce qui concerne les infections respiratoires et plus particulièrement la grippe, un total de 37 nouvelles molécules sont en cours de développement. En termes de repositionnement, on compte 17 molécules<sup>309</sup>. Une majorité de celles-ci sont en phase d'études précliniques : metformine, gemcitabine, dapivirine, acide nalidixique, dorzolamide, ruxolitinib, lisinopril, etanercept, trametinib et des agonistes de PPAR (« *peroxisome proliferator-activated receptor* ») comme le gemfibrozil (agoniste PPAR- $\alpha$ ). Ces derniers ont été proposés comme candidats en réponse à l'observation des effets pathologiques (complications cliniques) de la réponse immunitaire de l'hôte, exacerbée lors d'infections par des virus influenza (tempête cytokinique). En effet, les stratégies de modulation de l'inflammation sont alors apparues comme des pistes de recherche intéressantes pour de nouveaux antiviraux ciblant la cellule plutôt que le virus. Parmi les agents immunomodulateurs évalués, le gemfibrozil permet par exemple une survie augmentée de 26% à 52% 4 jours post-infection en modèle murin d'infection<sup>310</sup>. Cependant, malgré des résultats encourageants obtenus *in vitro* et en modèle murin, une étude rétrospective récente sur l'administration d'agonistes de PPAR chez l'Homme (comme la rosiglitazone utilisée pour la prise en charge du diabète de type II) a montré un risque accru de mortalité pour les patients présentant des pneumonies lors d'une infection par des virus influenza<sup>311</sup>.

Les candidats-médicaments dans les phases les plus avancées sont répertoriés dans le Tableau 16.

| Nom du candidat-médicament       | Prescription initiale      | Approche de repositionnement                    | Activité anti-influenza                        |
|----------------------------------|----------------------------|---|--|
| Statines <sub>2</sub>            | Modulateurs de cholestérol | Hasard  | Immunomodulateur                               |
| Nitazoxanide <sub>3</sub>        | Anti-parasitaire           | Hasard  | Inhibiteur de maturation de HA et du transport |
| LASAG (BAY81-87981) <sub>2</sub> | Anti-inflammatoire         | Hasard et criblage ciblé                        | Inhibiteur NF-kB                               |
| Célécoxib <sub>3</sub>           | Anti-inflammatoire         | Crible ciblé                                    | Immunomodulateur                               |
| Naproxen <sub>2</sub>            | Anti-cancéreux (Ph1)       | Crible <i>in silico</i> ( <i>target-based</i> ) | Inhibiteur de liaison entre NP et l'ARN        |
| Midodrine <sub>2</sub>           | Anti-hypotenseur           | Crible phénotypique assisté <i>in silico</i>    | Immunomodulateur                               |
| Diltiazem <sub>2</sub>           | Anti-hypertenseur          | Crible phénotypique assisté <i>in silico</i>    | Immunomodulateur                               |

Tableau 16 : Candidats-médicaments en phases cliniques d'évaluation pour le repositionnement de médicaments pour le traitement de patients infectés par des virus de la grippe.

<sub>1</sub> : phase I / <sub>2</sub> : phase II / <sub>3</sub> : phase III

Les statines diminuent la réplication d'IAV *in vitro* alors qu'elles sont plus connues pour leur action de stabilisation et / ou restauration de l'intégrité de la barrière vasculaire<sup>312</sup>. Les études *in vivo*

n'ont pour l'instant pas permis de certifier leur rôle protecteur de manière significative, mais leur administration chez des patients en réanimation pour des cas de pneumonies, d'infections (notamment influenza) et / ou de sepsis pourrait conférer une survie augmentée<sup>313-316</sup>. Il est possible que les statines contribuent à améliorer la survie, entre autres par leur régulation de cytokines pro-inflammatoires. Un essai clinique de phase II (NCT02056340) pour l'évaluation des effets de l'atorvastatine chez des patients infectés par des virus influenza s'est terminé récemment et les premiers résultats communiqués indiquent une p valeur non significative pour leur caractère principal d'évaluation. Seuls les résultats d'une sous-étude concernant le dosage du Coenzyme Q (CoQ10) sur une partie de la cohorte recrutée sont actuellement publiés<sup>317</sup>.

Le nitazoxanide est connu depuis les années 80 pour son action anti-protozoaire mais ses propriétés anti-influenza n'ont été documentées qu'à partir de 2009<sup>318</sup>. Dans le cas de la grippe, le nitazoxanide inhibe la fonction de la protéine ERp57 du réticulum endoplasmique, essentielle à la maturation de la HA virale, impactant ainsi le trafic intracellulaire et l'insertion dans la membrane plasmique de l'hôte<sup>318</sup>. Ce médicament présente une activité antivirale *in vitro* contre un large panel de souches en circulation qui s'explique en partie par le fait que cette molécule cible les mécanismes de la cellule hôte plutôt que le virus lui-même<sup>319</sup>. Comme évoqué précédemment, l'efficacité du nitazoxanide pour le traitement de patients atteints de grippe a été investiguée dans le cadre de plusieurs essais cliniques de phases avancées, mais les premiers résultats n'ont pas été concluants<sup>265</sup> et les résultats des essais complémentaires ne sont pas encore publiés<sup>320</sup>.

Le LASAG (VR736, *Lysine acetylsalicylate glycine* ou aspirine) diminue l'inflammation et ralentit la réplication du virus de la grippe en modèle murin par son action sur la voie de signalisation cellulaire IKK/NF-kappaB. Un premier essai clinique de phase I a permis de vérifier que l'inhalation de LASAG était bien tolérée par les patients, et ce sans effets secondaires (données non publiées)<sup>321</sup>. Le critère d'évaluation principal de l'essai clinique de phase II (délai de réduction des symptômes cliniques) a été atteint (38.3 heures contre 56.2 heures avec le placebo;  $p = 0.03$ )<sup>321</sup>. Le critère d'évaluation secondaire de l'atténuation des signes cliniques a également été significativement amélioré dans le groupe LASAG par rapport au placebo (24.9 heures contre 44.1 heures;  $p = 0.002$ ). A notre connaissance, il n'existe à ce jour pas d'essai de phase plus avancé pour compléter cette étude de validation de concept de phase II.

Comme mentionné précédemment, les résultats précliniques obtenus pour l'immunomodulateur célécoxib (inhibiteur de COX-2) ont été très satisfaisants<sup>267</sup>. Un essai de phase III sur des patients atteints d'une infection grave par IAV traités soit par oseltamivir seul soit en combinaison avec le célécoxib s'est terminé, mais les résultats définitifs ne sont pas publiés (NCT02108366). Une note de congrès disponible en ligne indique une réduction significative de la mortalité ainsi que des autres critères d'évaluation dans le groupe traité par la combinaison, sans effets secondaires augmentés<sup>322</sup>.

Le naproxène est un anti-inflammatoire non stéroïdien présentant des activités anti-inflammatoires, mais aussi antalgiques, antipyrétiques et ayant des propriétés inhibitrices des fonctions plaquettaires par son action inhibitrice de la synthèse des prostaglandines. Cet autre inhibiteur de COX-2 a été découvert par criblage de molécules ciblant la nucléoprotéine. Il inhibe l'infection par compétition de liaison de l'ARN à la nucléoprotéine<sup>323</sup>. Des suites de ces observations précliniques, un essai a été initié en 2015 (ISRCTN11273879) pour évaluer les effets d'un traitement à l'amoxicilline-clavulanate et oseltamivir ou la combinaison d'un traitement au naproxène avec clarithromycine, le tout comparé à un bras contrôle de patients traités par amoxicilline-clavulanate et oseltamivir. Les résultats ne sont pas disponibles à ce jour.

Bien que le repositionnement de molécules soit très prometteur, le bilan actuel en ce qui concerne les infections à virus influenza est plutôt mitigé. En effet, nous sommes forcés de constater que malgré un grand nombre d'essais cliniques initiés (notamment en phases avancées), aucun résultat concluant n'a pu être établi. L'une des explications de ces échecs peut être un défaut ou une inadaptation de la conception des essais cliniques. Une autre explication serait la stratégie qui a été privilégiée pour le repositionnement de ces médicaments, à savoir celle de cibler un déterminant cellulaire unique, alors que l'ambivalence et l'hyper-redondance des voies cellulaires préconisent plutôt une approche globale de la cellule. C'est en tout cas la démarche qu'a engagée le laboratoire VirPath, pour minimiser ces risques liés à la redondance et l'ambivalence des voies de signalisation et métaboliques cellulaires, en caractérisant et exploitant des signatures virogénomiques (modulations viro-induites de l'expression des gènes de la cellule hôte) et chémogénomiques (modulations induites par un ou plusieurs composés de l'expression des gènes de la cellule hôte) dans le but d'identifier des médicaments candidats au repositionnement comme antiviraux. Aujourd'hui le seul médicament repositionné toujours en cours d'évaluation clinique de phase II est le diltiazem, proposé par notre laboratoire. Cette stratégie d'approche globale de la cellule de l'hôte, à laquelle j'ai contribué par mon travail de thèse, pour l'identification et la validation pré-clinique du diltiazem, est détaillée dans la partie Résultats de ce manuscrit.

A notre connaissance, aucun médicament repositionné n'est aujourd'hui testé en préclinique ou en clinique pour une nouvelle indication contre les pneumovirus. Les résultats encourageants obtenus en modèles précliniques pour plusieurs médicaments sélectionnés pour leur repositionnement, nous permettent aujourd'hui d'envisager de proposer notre stratégie de repositionnement pour répondre aux besoins non pourvus vis-à-vis des infections à pneumovirus.

## II . 5 . Principes et stratégies du repositionnement de médicaments : démarches expérimentales et computationnelles

Si les exemples de repositionnement des statines et du nitazoxanide pour des activités anti-influenza, découlent d'observations fortuites, la plupart des repositionnements de médicaments sont issus aujourd'hui de stratégies de cribles plus systématiques. On distinguera ainsi des approches complémentaires expérimentales et computationnelles pour le repositionnement de médicaments, basés sur leur(s) effet(s) « *On-target* » et / ou « *Off-target* ».

### II . 5 . A . Approches expérimentales

#### II . 5 . A . a) Repositionnement de médicaments selon leur(s) cible(s) identifiée(s) *via* des effets « *On-target* » ou « *Off-target* »

Dans l'organisme, les médicaments interagissent avec des récepteurs membranaires ou nucléaires, des canaux ioniques, des transporteurs, des hormones, des acides nucléiques ou des enzymes, on parle alors de cibles cellulaires thérapeutiques. Cette première approche expérimentale ciblant un facteur cellulaire précis, repose sur la connaissance préalable de cette cible et de son rôle fonctionnel dans une ou plusieurs pathologies données (Figure 13). En oncologie par exemple, les protéines kinases constituent aujourd'hui les cibles d'un grand nombre de médicaments anticancéreux<sup>324</sup>.

Dans le domaine des infections virales, les avancées sur la connaissance de la biologie fondamentale des virus SARS-CoV et MERS-CoV ont par exemple montré que leur cycle répliatif nécessite la kinase cellulaire Abl2 (Abelson tyrosine-protéine kinase 2). Coleman et collaborateurs ont ainsi pu proposer de repositionner un inhibiteur de cette kinase, l'imatinib, déjà utilisé comme anti-cancéreux, comme inhibiteur à large spectre des coronavirus<sup>325</sup>. Dans la même dynamique, nous pouvons citer également la saracatinib, un inhibiteur de tyrosine kinases de la famille des Src/Abl (SFK) qui a montré un effet antiviral significatif *in vitro* contre le MERS-CoV<sup>326</sup>. Les perspectives d'une telle démarche sont importantes car d'autres composés (comme le dasatinib ou le bosutinib) sont également utilisés aujourd'hui comme inhibiteurs de Src/Abl et pourraient ainsi être testés contre le MERS-CoV.

Cette stratégie de repositionnement établie à partir de l'identification d'une cible commune à différents pathogènes viraux a également été mise en œuvre avec le favipiravir, décrit précédemment comme antigrippe. Son activité antivirale réside dans sa capacité à inhiber l'ARN polymérase virale ARN dépendante (commune à tous les virus à ARN et notamment à l'ensemble des

virus influenza), ce médicament présentait le potentiel d'une activité antivirale à large spectre. Une étude en modèle murin a montré une efficacité de protection de 83% contre une infection létale par le filovirus Ebola<sup>327</sup>. Une étude rétrospective sur 163 patients présentant une infection confirmée par le virus Ebola lors de l'épidémie de 2015 en Guinée a même montré un temps de survie plus élevé pour les patients traités par le Favipiravir<sup>328</sup>.

Ainsi, pour une même cible, cette démarche qui consiste à rechercher d'autres indications thérapeutiques pour une même molécule est basée sur l'effet dit de « *on-target* » (Figure 13).

Alternativement, le concept récent de polypharmacologie s'appuie sur le potentiel des molécules à avoir plusieurs cibles distinctes connues ou inconnues<sup>329-331</sup>. On parle alors d'un effet « *off-target* » des médicaments (Figure 13). La découverte de nouvelles cibles découle souvent de l'observation initiale d'effets secondaires. Il existe de nombreux exemples comme la teicoplanine, l'ivermectine, l'itraconazole, ou le nitazoxanide (non commercialisé à ce jour, utilisé uniquement en soins hospitaliers), qui, en plus de leurs activités antimicrobiennes spécifiques, possèdent des propriétés antivirales<sup>332,333</sup>. Dans le cas de l'itraconazole par exemple, une molécule déjà décrite comme antifongique et anticancéreux, Strating et collaborateurs ont démontré une activité d'inhibition des entérovirus (poliovirus, coxsackievirus, enterovirus-71 ou rhinovirus), car cette molécule cible deux protéines (OSBP et ORP4) qui se lient à un dérivé oxydé du cholestérol (oxystérol), impliqué dans la réplication des entérovirus et de l'hépatite C<sup>332</sup>.

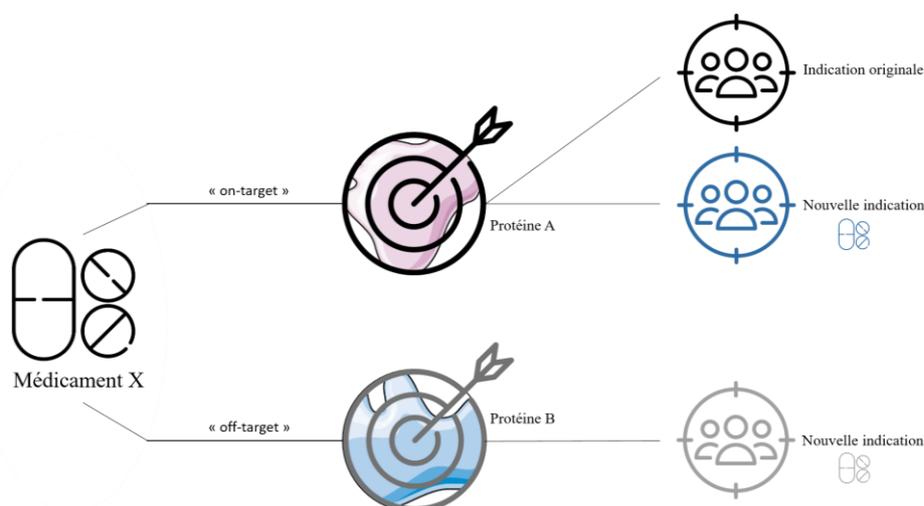


Figure 13 : Le repositionnement de molécules selon leur(s) cible(s). Dans la plupart des cas, un médicament (X) est mis sur le marché pour une indication thérapeutique précise, pour son action sur une cible spécifique (Protéine A). Or, si celle-ci est décrite dans une autre pathologie, le médicament a le potentiel d'être aussi efficace pour cette nouvelle indication, il s'agit dans ce cas d'un effet « *on-target* ». Alternativement, ce médicament peut également interagir avec une cible différente supplémentaire (Protéine B, ou plusieurs), on parle alors d'effet « *off-target* ». Celle(s)-ci, nouvellement décrite(s) peuvent avoir un rôle majeur dans d'autre(s) pathologie(s), conduisant à une nouvelle indication thérapeutique du médicament en question (D'après Almeida Moreira de Oliveira et Lang 2018)<sup>174,291</sup>.

## II . 5 . A . b) Approche complémentaire de criblage phénotypique pour le repositionnement de médicaments

La chromatographie d'affinité et la spectrométrie de masse ont été largement utilisées par exemple pour l'identification d'interactions potentielles entre des composés et des cibles multiples<sup>334</sup>. Cependant, cette stratégie ne peut pas être systématiquement mise en œuvre du fait de nos connaissances incomplètes de la biologie fondamentale des cellules et des pathogènes, des physiopathologies et des modes d'action des médicaments. Une seconde stratégie complémentaire est alors nécessaire pour le repositionnement de médicaments, et repose sur le criblage phénotypique<sup>335</sup>.

De nombreuses altérations phénotypiques induites par des composés dans le cadre de cribles sur différents modèles sont décrites dans la littérature. L'exemple du modèle d'embryologie poisson-zèbre (*Danio rerio* ; Figure 14) est très illustratif. La ponte de 200 à 300 œufs par couple plusieurs fois par an, la petite taille des embryons (moins d'un millimètre de diamètre) et leur caractère transparent en font un modèle animal très intéressant au regard des modèles murins ou des gros animaux (cochons, chiens...). Les études menées sur ce modèle s'appuient sur l'inspection visuelle des changements morphologiques et / ou fonctionnels sans avoir à sacrifier les individus. Les embryons peuvent ainsi être utilisés dans des cribles phénotypiques à haut débit (HTS) de chimiothèques (les embryons sont distribués dans des plaques de 96 ou 384 puits). L'effet des molécules sur les embryons peut alors être aisément observé<sup>336</sup>. L'équipe de Cousin et collaborateurs s'est par exemple intéressée à l'impact sur la locomotion des poissons-zèbres de 39 molécules approuvés par la FDA pour les traitements anti-tabac<sup>337</sup>.

Un autre exemple est celui de l'étude de Buckley et collaborateurs de 2010 sur la sclérose multiple (MS). Dans une optique de traitement de cette maladie auto-immune, l'équipe cherchait un composé pouvant aider à la re-myélinisation. Leur crible de 1 170 composés sur le modèle de poisson-zèbre a mis en lumière 25 composés semblant altérer le recrutement et / ou la prolifération des oligodendrocytes et / ou modulant la transcription de la protéine mbp (*myelin basic protein*)<sup>338,339</sup>.

En alternative au poisson-zèbre (organisme entier, *in vivo*), d'autres modèles *ex vivo* et *in vitro* peuvent aussi être utilisés pour le criblage à haut débit. En virologie, par exemple, cette démarche est basée sur la microtitration virale et la mesure de viabilité cellulaire (effet cytopathique). Ces criblages peuvent s'effectuer sur des lignées cellulaires de référence ou des modèles plus élaborés d'organoïdes<sup>340</sup>. Dans le domaine des virus respiratoires, des modèles d'épithélium respiratoire humain reconstitués et cultivés en interface air/liquide sont de plus en plus utilisés. Le modèle

Mucilair™ (Epithelix), utilisé au laboratoire, sera décrit en détail dans ce manuscrit dans la partie consacrée aux Résultats.

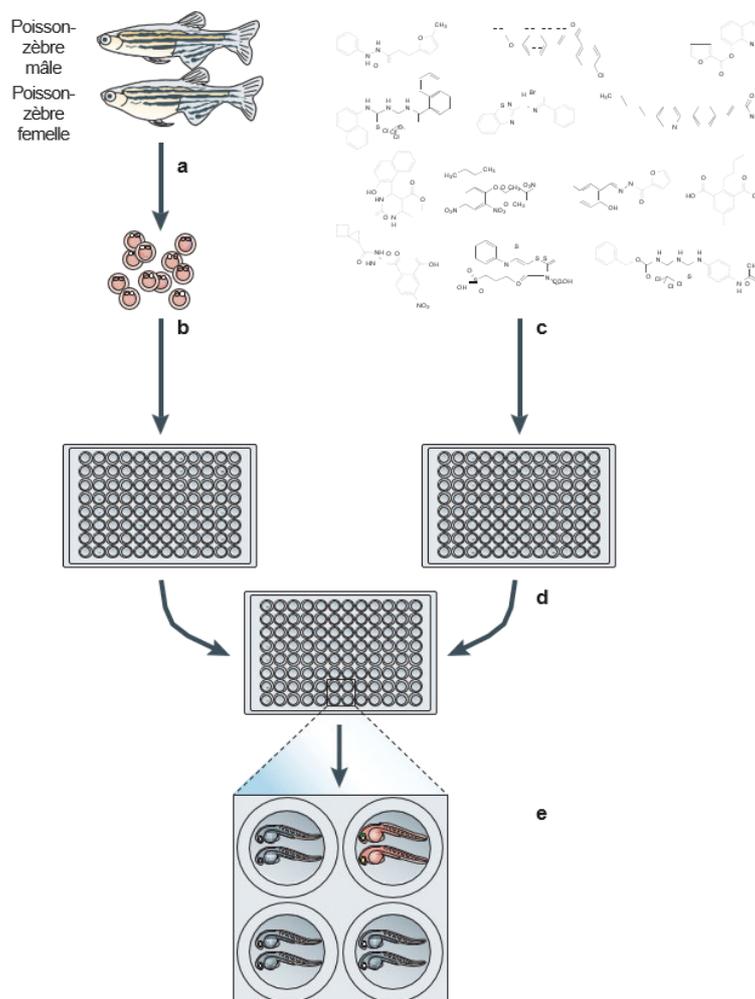


Figure 14: Méthode de criblage de molécules sur le modèle de poisson-zèbre. L'accouplement des poissons-zèbres adultes (a) permet la production de 200 à 300 embryons/femelle. Ces embryons sont distribués par 3 en moyenne (b) dans des plaques 96 ou 384 puits. Un composé (ou une combinaison de composés) de la chimiothèque à tester (c) est ajouté (d) dans un puit (de préférence en triplicata) contenant les poissons-zèbres. Après une période d'incubation, les effets phénotypiques des composés peuvent être observés (e) visuellement ou de manière automatisée (Source : Zon 2005).

La robotisation et l'automatisation, ainsi que d'autres avancées technologiques comme la cytométrie de flux (exemple du repositionnement de la decitabine et la gemcitabine contre le HIV) ou la microfluidique, ont permis le développement à très grande échelle de cette stratégie de crible phénotypique à haut débit<sup>341,342</sup>. Ainsi, à titre d'exemple, l'étude de Miller et collaborateurs en 2010 s'est intéressée aux composés dérégulant la voie NF-KB dans une optique de découverte de molécules présentant des propriétés anticancéreuses et / ou anti-inflammatoires potentielles<sup>343</sup>. Ainsi, 2 800 médicaments issus de la chimiothèque du NIH (*Chemical Genomics Center Pharmaceutical Collection*) à 15 concentrations différentes ont été testés en système rapporteur  $\beta$ -lactamase sur lignée ME-180 (carcinome cervical humain). Une inhibition de la voie NF-KB a

effectivement été observée pour 19 médicaments et notamment pour l'ecteinascidin-743, prescrite dans les cas de cancer ovarien<sup>344</sup>. Plus récemment, 2 000 composés ont été criblés pour leur activité anti-coronavirus et 56 ont présenté un potentiel intéressant (HCoV-OC43 exprimant la *Renilla* luciférase<sup>345</sup>). Parmi ces 56 composés, 36 ont été testés *in vitro* sur plusieurs souches sauvages (HCoV-OC43, et HCoV-NL63, MERS-CoV (beta-CoV), virus murin de l'hépatite (MHV)-A59 (beta-CoV), et 7 parmi eux (lycorine, emetine, monensine sodium, mycophénolate mofeti, mycophénolic acid, phénazopyridine et pyrvinium pamoate) ont démontré une action *in vitro* significative à large spectre.

#### II . 5 . B .      Approches computationnelles : Criblage *in silico* et bases de données

Par analogie avec les techniques expérimentales classiques de crible *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*, on parle de criblage *in silico* (ou crible virtuel) lorsqu'on utilise des ressources informatiques pour identifier des candidats-médicaments (calculs et modèles informatisés). Les méthodes *in silico* constituent une aide à la prise de décision et permettent d'orienter la recherche de molécules d'intérêt par un crible virtuel<sup>346</sup>. Elles reposent sur l'accès à une masse très importante de données de natures diverses (données d'expression génique, d'interactions moléculaires, structure chimique, génétiques ou protéomiques, données cliniques, dossiers de santé électroniques) et impliquent l'analyse systématique et intégrée de ces données pour le repositionnement de médicaments.

##### II . 5 . B . a)      Définition du criblage virtuel

A partir de connaissances préétablies par la communauté scientifique et en mettant à profit les bases de données publiques ou propriétaires, le criblage virtuel cherche à identifier des composés possédant une ou des activité(s) biologique(s) d'intérêt et à décrire de nouvelles cibles potentielles et / ou de nouveaux composés<sup>347</sup>. Le criblage virtuel permet de filtrer certaines molécules inactives, toxiques, ou présentant des effets indésirables connus, et au contraire choisir les molécules les plus prometteuses pour une nouvelle indication. On compare souvent le criblage virtuel à un entonnoir (Figure 15), permettant, à partir d'un nombre élevé de molécules, et selon une multitude de critères définis de n'en retenir que quelques dizaines, centaines ou milliers pour constituer une chimiothèque privilégiée qui pourra dans un deuxième temps être évaluée expérimentalement, par crible phénotypique par exemple<sup>348</sup>.

Les stratégies de crible virtuel, qui permettent une pré-évaluation de composés sans consommation de ressources hormis computationnelles, peuvent combiner plusieurs approches en parallèle et / ou en série afin de mener une analyse intégrée multiparamétrique visant à une

prédiction avancée de propriétés des composés (Figure 15). Ces protocoles s'appuient sur des données de structures bi-dimensionnelles (2D) et tridimensionnelles (3D), de ligands et de cibles multiples (protéines, acides nucléiques, lipides...), des effets décrits sur l'expression des gènes et / ou les voies cellulaires impliquées dans une pathologie, des effets phénotypiques ou secondaires décrits, une recherche de similarité, un apprentissage automatique (*machine learning*), des modélisations moléculaires etc. En complément aux techniques classiques de criblage, le criblage virtuel permet ainsi une approche hybride et synergique de repositionnement des médicaments.

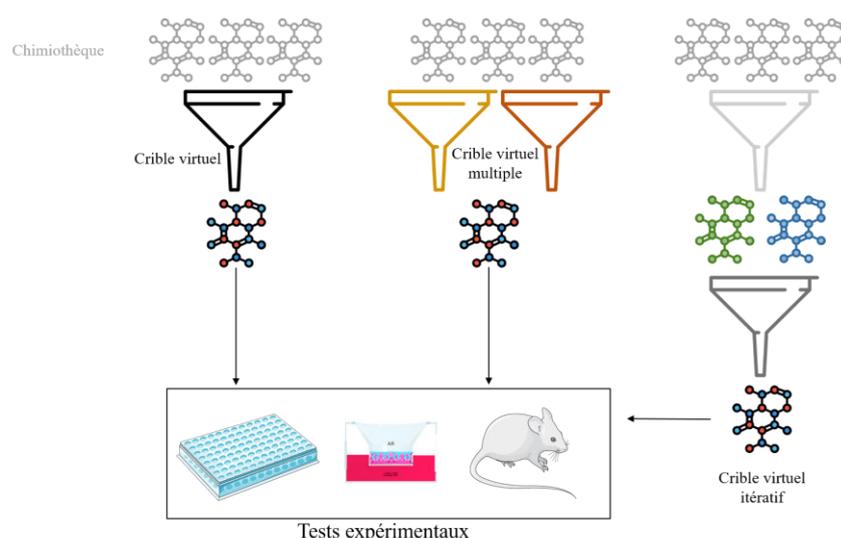


Figure 15: Criblage virtuel (Source : Tanrikulu et al. 2013). A partir d'une librairie de composés (en gris), le criblage virtuel selon des critères spécifiques réduit le nombre de composés qui seront testés expérimentalement a posteriori. Trois catégories de criblage sont représentées ici : (i) Crible virtuel simple (ii) Multiples cribles virtuels menés en parallèle (iii) Cribles itératifs. Quelle que soit la stratégie adoptée, le but est de diminuer drastiquement le nombre de composés qui seront testés expérimentalement<sup>174,291</sup>.

## II . 5 . B . b) Stratégies de repositionnement *in silico*

On compte classiquement 5 stratégies de repositionnement par approche computationnelle : (i) la comparaison de signatures, (ii) l'ancrage (« *docking* ») moléculaire virtuel, (iii) les études d'associations pan-génomiques, (iv) l'analyse des voies biologiques ou réseaux et enfin (v) les études rétrospectives de données cliniques.

### II . 5 . B . b) i. La comparaison de signatures « OMICS »

Cette stratégie s'intéresse aux signatures « OMICS », c'est-à-dire à l'ensemble des modifications spécifiques induites par une molécule ou une pathologie donnée et leur comparaison avec celles d'un autre médicament, d'une autre maladie ou d'un autre phénotype clinique<sup>349-351</sup>. On définit ces

signatures par opposition aux changements ou effets ponctuels (selon la notion de cible unique et définie, telle que détaillée précédemment), puisque le terme signature comporte une dimension plus globale de l'ensemble des modifications. Les principaux types de signatures « *OMICS* » sont transcriptomiques (ARN), protéomiques et métabolomiques.

Pour l'établissement de la signature protéomique d'un médicament, on compare le protéome d'une cellule ou d'un tissu (l'ensemble des protéines produites), avant et après traitement avec ledit médicament. Pour établir la signature protéomique d'une pathologie, ce sont les profils protéomiques associés à une condition pathologique et ceux observés dans des conditions sans pathologie ou après guérison, qui sont comparés<sup>352</sup>. Ces signatures diverses peuvent alors être comparées entre elles et des corrélations peuvent être calculées. Si on observe des signatures similaires entre des molécules, il est possible d'en déduire des hypothèses pour expliquer un effet secondaire, un mode d'action ou une efficacité potentielle vis-à-vis d'une pathologie autre que celle pour laquelle le médicament a été développé (culpabilité par association). L'équipe de Velez et collaborateurs propose de s'appuyer sur des biopsies de patients atteints de vitréorétinopathie inflammatoire néovasculaire (NIV), une maladie auto-inflammatoire héréditaire, et d'en évaluer le protéome pour proposer un traitement efficace<sup>353</sup>. Ils ont choisi d'établir les signatures de 200 cytokines à différents stades de progression de la pathologie. Ils ont ainsi identifié une signature de 64 protéines (61 surexprimées et 3 sous-exprimées dans la condition pathologique) comme autant de cibles potentielles d'anticorps injectables déjà utilisés en clinique. Ils ont notamment observé une surexpression significative de VEGF en comparaison des patients sains, et en corrélation avec une progression de la pathologie vers des formes plus graves. Sur cette base, ils ont testé l'effet du bevacizumab (anticorps anti-VEGF, développé à l'origine pour bloquer la vascularisation des tumeurs) chez un patient et ont décrit une résorption totale de l'hémorragie vitreuse et une forte d'amélioration de la vision. Ces auteurs proposent ce traitement injectable pour la prise en charge de la vitréorétinopathie inflammatoire néovasculaire, complémenté par des injections intravitréennes de méthotrexate (antagoniste de l'acide folique qui inhibe la prolifération de cellules tissulaires, indiqué dans la prise en charge de cancers divers, mais aussi polyarthrites ou psoriasis) dans le but d'atténuer l'inflammation post-chirurgicale des patients. Tous ces résultats alimentent des bases de données, servant de base pour les comparaisons de signatures, même entre technologies (on parle alors d'analyse multi-omics).

L'approche transcriptomique pour le repositionnement de molécules pharmaceutique a été choisie au laboratoire VirPath et sera donc plus détaillée dans la suite ce manuscrit.

Les outils de prédiction de conformation *in silico* sont également utilisés pour le repositionnement de médicaments. En effet, à partir de structures 3D protéiques, des algorithmes ont été développés pour prédire les changements de conformation fonctionnelle et de stabilité de ces protéines (Cupsat ou FoldX par exemple), leur agrégation (Aggrescan, Tango) et / ou leurs régions désordonnées (sans structure tertiaire fixée).

Ainsi, à partir des structures d'un ligand ou d'un récepteur (conformations et structures protéiques), des simulations d'interactions possibles peuvent être effectuées avec l'outil SwissDock par exemple. On parle alors d'ancrage (*docking*) moléculaire virtuel<sup>354</sup>. Cette méthodologie permet de prédire la complémentarité de domaines de liaison entre un ligand (par exemple, un médicament) et sa cible (par exemple, un récepteur impliqué dans une pathologie). L'ancrage est dit classique quand une cible et plusieurs ligands sont interrogés dans des bases de données. Inversement, des bibliothèques de molécules peuvent être explorées contre un ensemble de différents récepteurs cibles, dans ce cas, on parle d'ancrage inverse (plusieurs cibles et un ligand). Ces recherches dans des banques de données appliquent différents types de contraintes (descripteurs physicochimiques, pharmacophore, topologie d'un site actif) afin de sélectionner dans une chimiothèque, un nombre restreint de molécules à fort potentiel qui pourront être testées expérimentalement dans un second temps. Les bases de données comme la *Protein Data Bank* ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)), PubChem ([www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)), ChEMBL ([www.ebi.ac.uk/chembl](http://www.ebi.ac.uk/chembl)), PharmGKB ([www.pharmgkb.org](http://www.pharmgkb.org)) ou DrugBank ([www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca)) parmi d'autres servent de source de données pour ces outils de prédiction<sup>355,356</sup> (cf. ci-dessous). Les potentiels effets « *off-target* » ou « *on-target* » des molécules sélectionnées peuvent également être prédits dans une démarche de repositionnement. La Figure 16 présente un résumé des différentes stratégies de design *in silico* et notamment de *docking* virtuel.

L'équipe de Dakshanamurthy a utilisé cette méthode d'ancrage virtuel à haut débit sur 3 671 médicaments approuvés par la FDA avec 2 335 structures 3D connues de protéines humaines<sup>357</sup>. Ils ont notamment mis en lumière l'antiparasitaire mébendazole (antihelminthique benzimidazolé), comme candidat potentiel pour l'inhibition du récepteur cellulaire VEGFR2 au récepteur du facteur de croissance endothélial médiateur de l'angiogenèse. Cette prédiction a été validée expérimentalement : en modèle cellulaire, le mébendazole se lie directement au VEGFR2 et affecte l'activité de la VEGFR2 kinase avec une valeur d'IC50 de 3.6  $\mu\text{M}$ <sup>357</sup>.

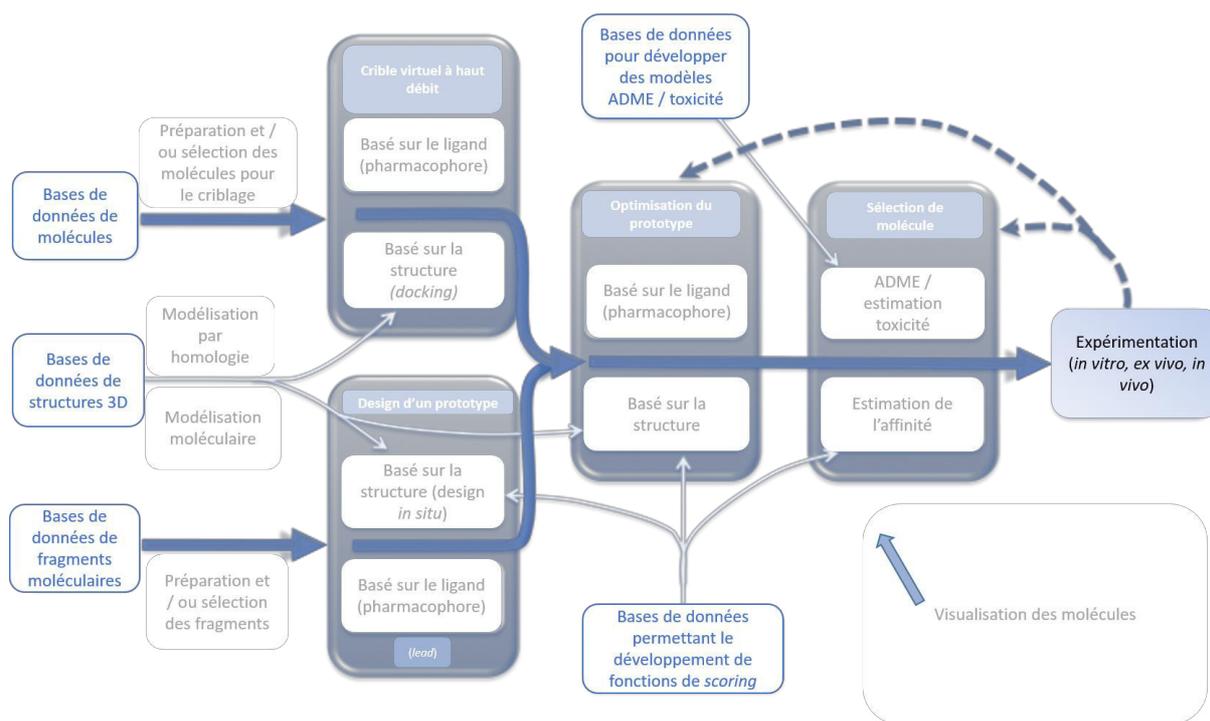


Figure 16 : Design *in silico* de nouveaux médicaments. Le site web Click2Drug référence un grand nombre de logiciels, de bases de données et de services Web de conception de médicaments *in silico* (actuellement 807 liens vers des ressources externes <http://www.click2drug.org/>).

### II . 5 . B . b) iii. Etudes d'association pangénomiques (Genome-wide association studies ou GWAS)

Une autre stratégie de repositionnement *in silico* s'appuie sur le génotypage à grande échelle, on parle d'étude d'association pangénomique (GWAS). Cette stratégie cherche à identifier des variants génétiques associés à une maladie pour mieux comprendre la biologie fondamentale de la pathologie associée et ainsi pouvoir identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, pouvant d'ailleurs être communes à différentes pathologies<sup>358</sup>. Le denosumab, identifié à partir des données de GWAS publiées par le National Human Genome Research Institute (NHGRI) en est un exemple. Le denosumab (Prolia, Amgen) est commercialisé depuis 2010 pour le traitement de femmes ménopausées présentant de l'ostéoporose. C'est un anticorps monoclonal anti-TNFSF11/RANKL (ligand du facteur de nécrose tumorale), administré sous forme sous-cutanée qui se lie de façon spécifique et avec une forte affinité au facteur TNFSF11/RANKL. Cet anticorps empêche ainsi l'activation de son récepteur situé à la surface des ostéoclastes (macrophages des os) et de leurs précurseurs et bloque leur développement pour diminuer la résorption osseuse. Or, il a été démontré que le TNFSF11 est fortement activé chez les patients atteints de la maladie de Crohn, qui sont d'ailleurs nombreux à souffrir d'ostéoporose<sup>359</sup>. Un variant génétique de TNFSF11 (rs2062305) a été associé à la maladie de Crohn par GWAS<sup>360</sup>. Sanseau et collaborateurs ont donc étudié l'effet de

ce variant sur des cellules lymphoblastoïdes B humaines et ostéoblastes, permettant de créer un potentiel lien de causalité entre TNFSF11 et la maladie de Crohn<sup>358</sup>. En modèle murin, l'injection quotidienne de denosumab a permis la diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et modifie la diversité du microbiote intestinal. Un essai clinique de phase I / II (NCT02321280) est en cours pour établir l'efficacité du denosumab chez des patients atteints de la maladie de Crohn active. Les résultats ne sont pas encore publiés.

Malgré quelques succès, il faut noter que l'identification d'un gène causal (ou de ses variants) par GWAS peut être difficile (déséquilibre de liaison important). De plus, on manque généralement d'informations biologiques et fonctionnelles qui permettent de faire sens aux résultats de GWAS : *quid* notamment des nouveaux gènes décrits grâce aux avancées technologiques ou l'identification d'un variant n'est pas systématiquement associé à un phénotype fonctionnel qui reste souvent difficile à évaluer<sup>358,361,362</sup>.

#### *II . 5 . B . b) iv. L'étude des voies biologiques et de leurs réseaux*

Certains gènes identifiés par GWAS pouvant s'avérer être inutilisables comme cibles médicamenteuses potentielles, il est primordial de s'intéresser aux autres gènes en amont et aval au sein de la voie biologique associée. Le travail de Yue et collaborateurs a ainsi permis d'identifier 12 molécules antiparkinsoniennes candidates par cette méthode, dont 5 ayant déjà été décrites comme traitement potentiel (dont l'estradiol, déjà décrit comme protecteur des neurones dopaminergiques dans un modèle cellulaire de maladie de Parkinson ou comme protecteur de cette maladie chez des femmes ménopausées) et 6 potentiellement repositionnables pour les patients atteints de Parkinson<sup>363-365</sup>.

En ce qui concerne les pathogènes respiratoires, on peut citer le travail de Smith et ses collaborateurs en 2012 qui a mis à profit des signatures transcriptomiques publiées afin d'en extraire des gènes et voies communément modulées entre différents virus<sup>366</sup> (IAV, HRSV, rhinovirus, SARS-CoV, HMPV, coxsackievirus et cytomegalovirus). A partir des 67 voies biologiques communes identifiées, cette étude proposait de nouvelles indications thérapeutiques pour des composés (clenbuterol, pranlukast, amrinon, minocycline ...) ciblant les protéines codées par les gènes F3, IL1B, TNF, CASP1 ou MMP9. Cependant, aucune étude clinique n'a été rapportée à ce jour.

#### *II . 5 . B . b) v. Etudes rétrospectives de données cliniques*

Comme exemplifié précédemment avec le repositionnement du minoxidil, les analyses cliniques rétrospectives sont une stratégie classique pour le repositionnement de médicaments. L'étude

rétrospective de dossiers de santé a permis notamment le repositionnement du sildénafil, de l'aspirine, du propranolol ou du raloxifène pour de nouvelles indications (Tableau 15). L'informatisation des dossiers de patients (diagnostic, traitement, tests effectués, imagerie, description clinique des symptômes etc.), des données de surveillance et des données issues d'essais cliniques a rendu possible des analyses plus systématiques, par opposition aux observations ponctuelles fortuites<sup>367-371</sup>. On peut citer la méthode décrite par Paik et collaborateurs qui ont choisi d'utiliser les signatures cliniques extraites de dossiers médicaux électroniques sur 13 ans<sup>372</sup>. Cette cohorte est constituée de plus de 530 000 patients et de données issues de 9.4 millions de tests de laboratoires. L'étude a ainsi permis de proposer le sulfate de terbutaline (utilisé en indication primaire pour l'asthme) pour les cas de sclérose latérale amyotrophique. Cette prédiction a été validée *in vivo* (poisson-zèbre). Cependant, aucun essai clinique n'est à ce jour répertorié pour l'évaluation de cette indication.

#### II . 5 . B . c) Bases de données

Pour mener des criblages *in silico*, il est nécessaire d'avoir accès aux informations clefs qui permettent un raisonnement éclairé ; celles-ci sont regroupées sous la forme de bases de données publiques ou privées (expression de gènes, structure chimique, génotype ou protéome, ou données médicales).

Une base de données est un ensemble structuré permettant le stockage et l'accès à un ensemble de données, brutes ou raffinées, dont les volumes sont parfois très imposants.

Depuis le début des années 1960, de nombreuses bases de données se sont mises en place, balayant un très large éventail de connaissances (données de localisation, de fonction, de structure, de séquence ...) et jouant un rôle crucial dans l'organisation des connaissances biologiques. Ces bases de données sont autant essentielles dans des stratégies *de novo* de conception de nouvelles molécules (chemoinformatique) que dans des stratégies de repositionnement.

##### II . 5 . B . c) i. Séquence, annotation, structure et interaction des protéines

La base de données UniProt (*l'Universal Protein Resource* issue de la collaboration entre SwissProt, TrEMBL-EBI et PIR) recense un très grand nombre de séquences protéiques ainsi que d'importantes métadonnées associées<sup>373-377</sup>.

Cette base de données se compose de quatre sous-ensembles interconnectés : UniParc, UniRef, UniProtKB/Swiss-Prot et UniProtKB/TrEMBL. La section UniParc (*UniProt Archive*) contient

des séquences protéiques non redondantes. La section UniRef (*UniProt Reference Clusters*) fusionne des ensembles de séquences ou fragments de séquences (on parle de clusters de séquences), masque les séquences redondantes pour obtenir une meilleure résolution et accélérer les requêtes (UniRef100, 90 ou 50). Par exemple, tout en gardant l'intégralité des informations issues d'UniProtKB et / ou UniParc, UniRef100 combine en une référence unique des séquences identiques et des sous-fragments présentant au moins 11 résidus communs. Les données annotées manuellement grâce à la littérature et ayant été vérifiées par des curateurs sont regroupées dans la section UniProtKB/Swiss-Prot. La section UniProtKB/TrEMBL contient les données annotées automatiquement, en attente d'une annotation manuelle complète. Du fait de l'explosion du nombre de séquences déposées, les banques généralistes de séquences protéiques révisent automatiquement les séquences déposées sur leurs plateformes (TrEMBL ou Genpept par exemple). Ces annotations automatisées s'appuient sur la similarité des séquences pour identifier et annoter des domaines protéiques. En ce qui concerne UniProtKB/TrEMBL, les annotations protéiques sont identifiées selon un gradient d'évidences : validation expérimentale au niveau de la protéine (preuves expérimentales de l'existence de la protéine par séquençage partiel ou complet, identification par spectrométrie de masse, structure aux rayons X, interaction protéine-protéine ou détection de la protéine par des anticorps) ou au niveau du transcrit (l'existence de la protéine n'est pas strictement prouvée, mais les données d'expression de RT-PCR ou de Northern blot indiquent l'existence d'un transcrit), prédiction par homologie (l'existence d'une protéine est probable car des orthologues clairs existent dans des espèces étroitement apparentées), prédiction (les entrées sans preuve au niveau de la protéine, du transcrit ou de l'homologie) ou incertitude sur l'existence de cette protéine.

Ces besoins d'annotation automatisée (séquences nucléiques, génomes entiers ou séquences protéiques) sont liés à la décroissance du coût des technologies de séquençage, notamment depuis 2007, date de la mise sur le marché du premier séquenceur à haut débit 454 de Roche, 500 fois plus rapide et 50 fois moins cher que la technique historique de Sanger<sup>378</sup> (Figure 17).

Le repliement tridimensionnel des protéines est étroitement lié à leur(s) fonction(s) respective(s). La *Protein Data Bank* (PDB) en est la base de données de référence. Les structures de macromolécules biologiques peuvent être déterminées *in silico* (par homologie) ou expérimentalement (par radiocristallographie, microscopie électronique, spectroscopie RMN, diffraction de neutrons, cristallographie électronique). Les fonctions de collecte, organisation et diffusion de ces structures sont assurées par différents acteurs : *Protein Data Bank Japan* (PDBj), *Protein Data Bank in Europe* (PDBe), *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank* aux Etats-Unis (RCSB PDB).

Par exemple, dans la PDBe-KB (*Protein Data Bank in Europe - Knowledge Base*, ressource européenne répertoriant les structures 3D, annotations fonctionnelles et prédictions issues de PDB), il est possible de trouver 5 structures 3D correspondant à la neuraminidase du virus influenza

A/California/04/2009 (H1N1) ainsi que sa structure 3D en interaction avec l'antiviral zanamivir, cité précédemment (Figure 18). Ces ressources immenses peuvent ainsi permettre d'identifier des résidus protéiques fonctionnellement importants dans leur liaison au substrat et / ou dans les interactions protéine-protéine.

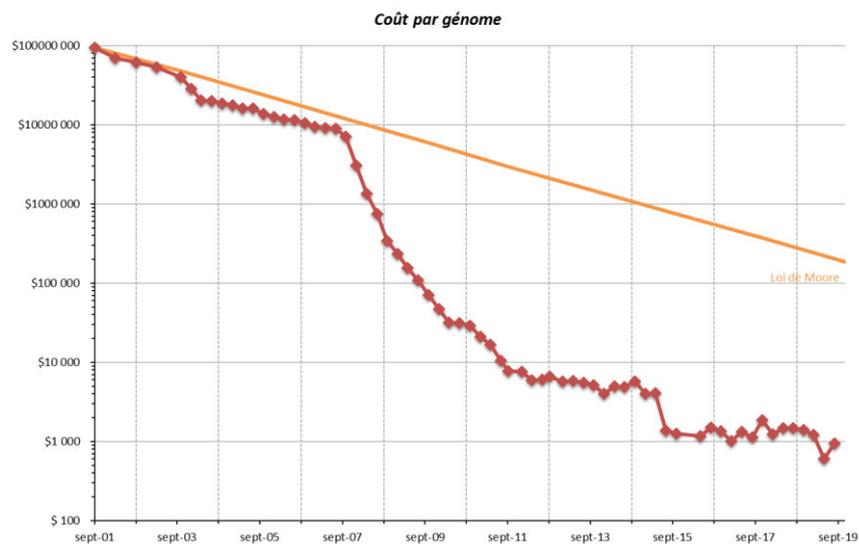


Figure 17: Evolution des coûts de séquençage de 2001 à 2019. 2003 correspond à l'année de complétion du séquençage du génome humain. En 2005 sont introduites les technologies de séquençage de nouvelle génération conduisant à la chute du prix de séquençage à partir de 2007 (Source : National Human Genome Research Institute).

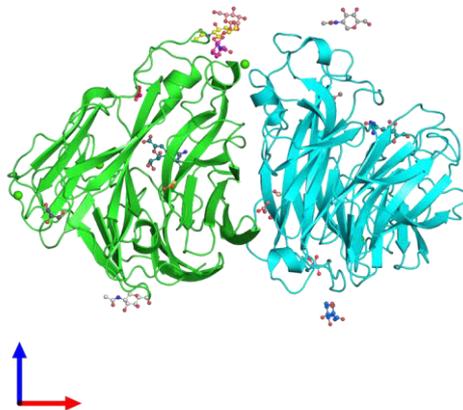


Figure 18: Structure cristallisée de la neuraminidase du H1N1 pandémique complexée au Zanamivir publiée par Vavricka et al. en 2011. La structure déposée sur la PDB (3ti5) est représentée ici vue de face et colorée par chaîne. Elle contient : 2 copies de NA, 6 entités non-polymériques, 5 copies de N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE, 1 copie de BETA-D-MANNOSE, 5 copies d'ION CALCIUM, 2 copies de ZANAMIVIR, 3 copies de GLYCEROL et 5 copies d'ION ACETATE.

Les protéines ayant un panel très large de structures et d'activités enzymatiques, d'autres bases de données viennent compléter les informations de structure. On peut citer la base de données CATH (*Class, Architecture, Topology, Homologous superfamily*), qui classifie hiérarchiquement les domaines observés dans les structures tri-dimensionnelles de protéines (motifs

structuraux) pour donner des informations fonctionnelles, ou encore PROSITE et ProDom qui listent les motifs dans les séquences, des descriptifs de familles et de sites fonctionnels et permettent de visualiser des alignements multiples, etc.<sup>379-384</sup>. Dans l'ensemble des données disponibles, peu de protéines humaines sont relativement caractérisées expérimentalement ; ces bases de données permettent ainsi de rechercher des protéines homologues animales dont les fonctions connues ont été validées expérimentalement, et ce avec l'objectif d'établir des modèles 3D prédictifs. La base de données CATH peut aussi être exploitée pour identifier de potentiels effets secondaires d'une molécule dont on connaît la cible protéique par exemple, en recherchant des structures similaires ou partagées par d'autres protéines qui pourraient potentiellement être ciblées et donc impactées par ce traitement. Enfin, on peut citer la base de données PDBBind, qui contient plus de 19 000 entrées, correspondant à l'ensemble des données d'affinité de liaison mesurées expérimentalement pour tous les complexes biomoléculaires déposés sur PDB<sup>385</sup>.

#### *II.5.B.c) ii. Chimiothèques et données d'interactions*

Au même titre que les données protéiques, les données relatives aux composés chimiques ont leurs propres bases de données. Les plus connues sont PubChem (NIH) et DrugBank<sup>386</sup>. PubChem consigne principalement des données relatives à de petites molécules, mais également à des nucléotides, glucides, lipides... Y sont regroupées des informations relatives aux structures moléculaires, aux propriétés physico-chimiques, aux activités biologiques, aux brevets, etc. DrugBank regroupe des informations relativement similaires sur les médicaments (substances chimiques, pharmacologiques et pharmaceutiques), ainsi que sur leurs cibles (séquence, structure et voies biologiques). La dernière version de DrugBank (version 5.1.3) compte 13 339 entrées de médicaments, approuvés ou expérimentaux. ChEMBL est une base de données complémentaire, qui rassemble des données chimiques, bioactives et génomiques de molécules aux propriétés médicamenteuses<sup>387</sup> (structures 2D, poids moléculaire, SMILES, constantes de liaison, ADMET, etc.). Enfin, on peut citer ChemSpider, ZINC 15 et SWEETLEAD, trois bases de données regroupant notamment les structures 3D de milliers de molécules, très utiles pour les projets de design ou de repositionnements de molécules pharmaceutiques<sup>388,389</sup>.

Les données d'interaction physiques, voire fonctionnelles, disponibles dans la littérature sont accessibles sur de nombreuses bases de données comme BioGrid<sup>390</sup>, PDID<sup>391</sup>, STITCH<sup>392</sup>, DrugBank<sup>386</sup>, DrugCentral<sup>393</sup>, ChemProt<sup>394</sup>, Comparative Toxicogenomics Database<sup>395</sup>, PubChem<sup>396</sup> ou DGldb<sup>397</sup>. Par exemple, la base de données STITCH recense les interactions connues et prédites entre produits chimiques et protéines, directes (physiques) et indirectes (fonctionnelles), pour plus de 9 millions de protéines de 2 031 organismes différents<sup>398</sup>. Un exemple de résultat de requête est présenté en

Figure 19. Une recherche par identifiant, nom commun, séquence protéique ou structure (SMILES) de produits chimiques et de protéines est possible afin d'identifier des produits chimiques similaires par exemple.

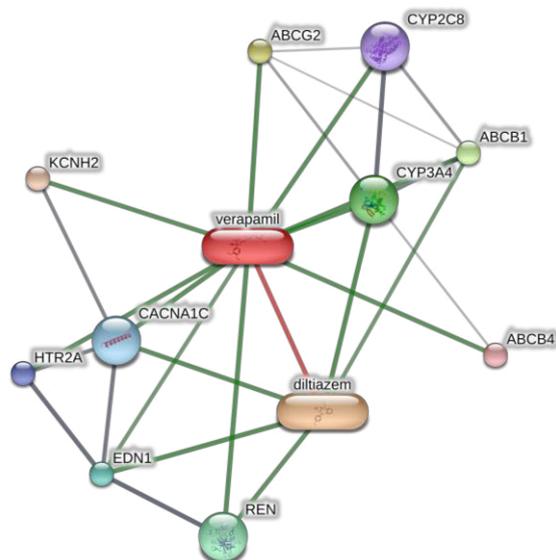


Figure 19: Visualisation en réseau des associations connues ou prédites entre deux médicaments antihypertenseurs : le verapamil et le diltiazem (*Homo sapiens*). Les associations les plus fortes sont représentées par des traits épais. Les interactions protéine-protéine sont représentées par des traits gris, celles entre molécules et protéines sont en vert et celles entre molécules sont en rouge. Le verapamil est un bloqueur de canaux calciques (type L) de la classe phenylalkylamine. Il est prescrit pour le traitement de l'hypertension, angines de poitrine ou arythmies cardiaques. C'est un vasodilatateur, tout comme le diltiazem, dérivé de la benzodiazépine (action antagoniste sur les canaux calciques). Ces deux composés sont co-cités dans Pubmed et des validations expérimentales ou homologues valident leur lien fonctionnel avec CYP3A4 ou CACNA1C.

### II . 5 . B . c) iii. Séquences ADN et ARN

Les séquences d'acides nucléiques constituent le point de départ essentiel à la compréhension de la fonction de gènes issus d'organismes divers. L'intérêt de leur établissement et de leur collecte a été très tôt identifié et des collaborations internationales ont donc été mises en place. L'*International Nucleotide Sequence Database Collaboration* (INSDC) est une initiative de collaboration entre la DDBJ (*DNA Databank of Japan*, hébergée par le *National Institute of Genetics*), l'EMBL-EBI (*European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute*) et le NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Cette collaboration permet de regrouper les données brutes et / ou filtrées et / ou transformées disponibles (Tableau 17). Actuellement, si l'on souhaite publier des résultats portant sur une séquence biologique, il est nécessaire de déposer ses données sur l'une de ces bases de données et elles seront synchronisées entre elles. Sur la même organisation que la DDBJ, l'EMBL-EBI et le NCBI, le Beijing Genomics Institute (BGI) a mis en place une nouvelle base de données depuis 2016 : le *BIG Data center*<sup>399</sup> (BIGD).

L'ensemble des séquences disponibles peut donc être consulté à partir de la base de données GenBank (NIH). GenBank accepte le dépôt de séquences d'ARNm ou de séquences génomiques appariées aux informations sur l'organisme source et l'annotation. Les séquences non

contiguës, séquences d'amorces, séquences protéiques sans soumission de nucléotide sous-jacent, séquences issues d'un mélange de séquences génomiques et d'ARNm, séquences consensus, séquences d'une longueur inférieure à 200 nucléotides ne peuvent pas être déposées sur GenBank ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/submit\\_types/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/submit_types/)). Les données brutes issues de séquençage de nouvelle génération doivent être soumises à la *Sequence Read Archive* (SRA).

| Type de données  | DNA Databank of Japan (DDBJ) | European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) | National Center for Biotechnology Information (NCBI) |
|--|------------------------------|--|--|
| Données obtenues par séquençage de nouvelle génération | <i>Sequence Read Archive</i> |  | <i>Sequence Read Archive</i>                         |
| Données obtenues par méthode capillaire (Sanger)       | <i>Trace Archive</i>         | <i>European Nucleotide</i>   | <i>Trace Archive</i>                                 |
| Séquences annotées                                     | <i>DDBJ</i>                  | <i>Archive (ENA)</i>   | <i>GenBank</i>                                       |
| Echantillons   | <i>BioSample</i>             |  | <i>BioSample</i>                                     |
| Etudes/Projets   | <i>BioProject</i>            |  | <i>BioProject</i>                                    |

Tableau 17 : Collaboration entre les principales bases de données de nucléotides mondiales. Selon le statut analytique des données, elles sont réparties entre la DDBJ, l'EMBL-EBI et le NCBI. Ces données sont librement accessibles dans la mesure où les auteurs d'origines sont crédités pour leur travail. L'ensemble des politiques de l'INSDC est résumé dans la publication de Brunak et al. 2002 (Source : <http://www.insdc.org>).

En ce qui concerne l'annotation des séquences, les banques de données de séquences d'acides nucléiques GenBank, EMBL et DDBJ ont choisi d'uniformiser leurs normes en matière de gestion d'annotation depuis la fin des années 80. On y retrouve des informations relatives aux positions génomiques des frontières intron-exon, aux séquences régulatrices, aux répétitions, aux noms des gènes et aux produits protéiques associés si déjà décrits. Si certaines bases de données englobent un ensemble d'organismes (comme GenBank, qui recense aussi bien des séquences génomiques ou ARNm bactériens qu'humains ou murins), certaines ont choisi d'être spécifiques d'un organisme unique comme le MGI (*Mouse Genome Informatics*) pour la souris, la SGD pour la levure (*Saccharomyces Genome Database*), le BGD (*Bovine Genome Database*) pour les bovins, FlyBase pour la drosophile, WormBase pour *C. elegans* etc.

Les outils d'exploration de génomes (*genome browsers*) les plus connus sont les bases de données génériques comme Ensembl (Sanger Institute + EBI), l'UCSC (University California Santa Cruz) ou NCBI *genome*. La base de données Ensembl permet par exemple l'annotation de gènes ou la prédiction de fonctions de régulation. Les outils Ensembl incluent notamment BLAST, BLAT, BioMart, VEP (*Variant Effect Predictor*) pour toutes les espèces de vertébrés disponibles.

En réponse au besoin grandissant de la communauté scientifique de faire sens de la complexité et de l'abondance des informations biologiques disponibles, de grands projets se sont mis en place afin de recueillir, organiser et synthétiser de telles données. Ces projets s'illustrent par exemple par l'instauration de la base de données relationnelle Reactome qui s'intéresse aux molécules de signalisation et / ou métabolisme et leurs relations, organisées en voies et processus biologiques<sup>401</sup>. Les acides nucléiques, protéines, vaccins ou molécules participent à des réactions. Elles sont alors organisées en réseaux biologiques et sont regroupées en voies (signalisation, régulation de la transcription, l'apoptose, etc.).

Cette base de données est étroitement liée à d'autres ressources externes de référence, telles que NCBI Gene, Ensembl, UniProt, UCSC, ChEBI et PubMed. On peut aussi citer la base de données KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), qui recense un grand nombre de voies cellulaires d'intérêt (KEGG Pathway), mais aussi des informations sur les fonctions et les réactions enzymatiques en lien avec de petites molécules (KEGG Ligand) ou encore un catalogue de gènes et leurs descriptifs (KEGG Genes). La base de données KEGG Pathway est très utilisée pour visualiser des voies biologiques, réseaux d'interactions, de réactions et de relations moléculaires pour des données de métabolisme, processus cellulaires ou pathologies humaines. Elle est souvent utilisée en association avec la base de données d'ontologie « *Gene Ontology* »<sup>402-405</sup>. Une ontologie se définit comme une classification des concepts liés à un champ disciplinaire qui se destine ici à la structuration des informations relatives aux gènes et à leurs produits. En effet, en plus de l'unification et la gestion des vocabulaires associés à un gène (comme UniProtKB Keywords), la *gene ontology* (GO) gère les annotations et notamment les inconsistances entre annotations. Elle établit une classification des gènes et de leurs produits selon trois branches complémentaires : la composante cellulaire (intracellulaire ou extracellulaire : cytoplasme, noyau, etc.), la fonction moléculaire (activité lactase, transporteur de glucose, liaison aux récepteurs *Toll-like*, etc.), le processus biologique associé (réparation de l'ADN, transport transmembranaire de glucose, réplication, etc.). Des notions de relation (hiérarchique ou non) entre termes sont incluses (régulation, positive ou négative et participation à un autre terme). Des outils comme QuickGO ou AmiGO permettent d'interroger efficacement cette base de données<sup>406-408</sup>.

Les méthodes d'interrogation de ces bases de données varient, mais leur but premier est de faire sens de l'abondance d'informations disponibles. Face à une liste brute de gènes modulés, il est difficile de déterminer simplement si ceux-ci (et leurs produits protéiques) interagissent ou influencent des processus biologiques d'intérêt. Les recherches manuelles gène par gène dans la littérature sont d'une part une tâche très fastidieuse et d'autre part occultent une partie de la complexité biologique, où synergies et antagonismes existent, aussi bien entre gènes qu'entre

protéines. On parle alors d'analyse fonctionnelle et d'enrichissement. La méthode débute par l'association systématique des gènes et des protéines à leurs annotations biologiques affiliées (leurs ontologies par exemple). On compare ensuite l'importance de l'occurrence d'un terme GO dans un ensemble de gènes donné par rapport à un ensemble de gènes de même taille sélectionnés de manière aléatoire<sup>409</sup>. On cherche à identifier des termes qui sont statistiquement (test exact de Fisher, probabilité binomiale ou distribution hypergéométrique par exemple) sur ou sous-représentés dans une liste d'intérêt afin d'identifier des termes d'importance dans un processus ou un comportement biologique sous-jacent<sup>410-412</sup>.

On considère classiquement 3 stratégies d'enrichissement : *singular enrichment analysis* (SEA), *gene set enrichment analysis* (GSEA) et *modular enrichment analysis* (MEA)<sup>413</sup>. L'approche la plus communément utilisée est la SEA. On calcule alors une valeur d'enrichissement p qui correspond à la comparaison de la fréquence observée d'un terme biologique avec la fréquence attendue due au hasard. Sont considérés comme enrichis les termes dépassant les seuils fixés (p valeur < 0.05 par exemple). On répète ces calculs pour chaque terme. Ce principe de SEA est appliqué dans des outils comme GStat<sup>414</sup> et BiNGO<sup>415</sup>. Cependant, dans la mesure où SEA considère chaque terme indépendamment, les relations hiérarchiques entre les termes sont ignorées, d'où le développement d'autres stratégies : GSEA et MEA<sup>415</sup>. La méthode GSEA ne nécessite pas de tri initial des données. Après un classement de l'ensemble des gènes, on calcule un score d'enrichissement maximum (MES). Ce MES (issu d'une liste classée) est comparé à des distributions générées aléatoirement<sup>413,416</sup> (calcul de la valeur d'enrichissement p). Des gènes partageant une annotation particulière (un terme GO ou une co-expression par exemple) seront associés en classes. La dernière méthode définie par Huang et collaborateurs est la MEA. Cette méthode est la seule à utiliser les relations pouvant exister entre différents termes d'annotation lors de l'enrichissement. Des outils comme Ontologizer ou topGO appliquent cette méthode<sup>417,418</sup>. L'outil en ligne DAVID<sup>419</sup> (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) utilise cette méthode et intègre des informations issues de multiples sources : des termes d'annotation classiques (GO) mais aussi des annotations relatives aux interactions protéine - protéine, aux domaines fonctionnels des protéines (ex : InterPro), aux associations de maladies (ex : OMIM), aux voies biologiques (ex : KEGG ou BioCarta), aux caractéristiques de séquence, à l'homologie, aux modèles d'expression (ex : GEO) et à la littérature<sup>419</sup>. Par l'intégration de ces multiples sources, l'interprétation biologique des ensembles de gènes modulés est facilitée<sup>413,420</sup>.

Ces stratégies ont été très largement utilisées lors de mes travaux de thèse puisqu'à partir d'échantillons *in vitro* et *in vivo*, nous avons souhaité identifier des voies biologiques clefs associées aux gènes dont l'expression était fortement modulée par les différentes infections virales. Nous avons choisi non seulement d'inspecter individuellement les gènes modulés (signature fine), mais aussi d'apprécier une approche plus globale de ces bouleversements afin d'identifier des

biomarqueurs d'intérêt et des voies cellulaires à cibler pour le développement de nouveaux antiviraux, et ainsi éviter l'écueil du focus spécifique sur un déterminant cellulaire unique (cf. le repositionnement de molécules anti-grippe développé plus tôt).

#### II.5.B.c) v. Bases de données de séquençage ou biopuces

Selon leur statut analytique, les données d'expression de gènes issues de biopuces ou de séquençage sont déposées sur des bases de données différentes (Tableau 17). Les 4 bases de données majeures sont celles du NCBI *Gene Expression Omnibus* (GEO) et SRA et celles de l'EMBL-EBI *ArrayExpress* et *European Nucleotide Archive* (ENA). Des données brutes de séquençage devront être déposées sur la SRA alors qu'une version raffinée d'expression de ces mêmes données sera plutôt déposée sur l'ENA. Les données brutes issues de puces seront préférentiellement déposées sur GEO ou *Array Express*. Nos données d'expression issues de biopuces ont été déposées sur la plateforme GEO (GSE93731, appartenant au BioProject PRJNA362217). Comme toutes les autres bases de données citées précédemment, la démarche de mise à disposition à l'ensemble de la communauté scientifique de ces données permet la réutilisation de ces mêmes données dans d'autres études, en tant que support d'hypothèses, matériel pour développer des algorithmes divers ou pour être ré-analysée sous un autre angle. Il est intéressant de noter la mise en place de consignes précises pour le dépôt de données, indispensable pour toute réutilisation de ces données (MIAME : « *Minimum Information About a Microarray Experiment* » et MINSEQE : « *Minimum Information About a Next-generation Sequencing Experiment* » sur GEO). Le premier numéro de l'année de la revue *Nucleic Acid Research* est consacré à la revue des bases de données existantes ou des portails comme OMICtools ou ExPASy qui permettent d'accéder à de nombreuses ressources de protéomique, génomique, métabolomique, imagerie, etc.

#### II.5.B.c) vi. Données cliniques

Comme mentionné précédemment, une des stratégies de repositionnement de médicaments peut être d'analyser et de comparer la liste de leurs effets secondaires respectifs afin d'orienter la recherche de nouvelles applications. Dans ce cadre, des bases de données de type MedEffet (Canada), EudraVigilance (Europe) ou FAERS (*FDA Adverse Event Reporting System* aux Etats-Unis) ont été mises en place. On peut aussi citer DART (*Drug Adverse Reaction Target database*) ou l'ADReCS-Target (*Adverse Drug Reaction Classification System-Target Profile*, base de données non maintenue), SIDER (*Side Effect Ressource*), OFFSIDES et TWOSIDES, qui ont pour but de lister les effets secondaires décrits pour un certain nombre de composés<sup>421-424</sup>. Les données de surveillance

post-commercialisation (phase IV) et d'essais cliniques constituent une source cruciale d'information, mais l'accès peut en être limité pour des raisons commerciales ou de confidentialité. Cependant, depuis 2016, l'Agence Européenne du Médicament a commencé à fournir un accès public direct aux données des essais cliniques soumises par les sociétés pharmaceutiques. Un accès facilité à de telles informations peut faciliter le développement de nouveaux médicaments, notamment ceux issus du repositionnement.

Selon la stratégie de repositionnement employée, il est donc nécessaire de pouvoir s'appuyer sur un panel très large de bases de données : informations relatives à des médicaments/molécules, leurs interactions avec d'autres médicaments, gènes, cibles, voies biologiques ou maladies, essais cliniques, effets secondaires et profils de toxicité, démarches de repositionnements, structure 3D mais aussi génomes complets ou en cours de complétion, données d'annotation, phylogénie, structures primaires/secondaires/tertiaires et quaternaires de protéines, etc. Notre travail a donc été d'intégrer les informations de ces diverses sources pour servir nos besoins en ce qui concerne les virus respiratoires. Nous avons ainsi choisi de débiter nos recherches de molécules antivirales en nous intéressant aux bouleversements qu'elles induisent sur l'expression des gènes cellulaires et des voies et fonctions biologiques impactées. La capacité de ces mêmes molécules candidates à modifier l'expression de ces gènes ou voies biologiques dans un contexte d'infection virale a ensuite été évalué après qu'elles aient été davantage éprouvées pour leur usage en clinique pour le traitement d'IRAs (retrait de molécules tératogènes par exemple). L'ensemble de la stratégie et des ressources utilisées est détaillé dans la partie Résultats.



## Chapitre 3 : Application de l'approche transcriptomique en recherche clinique et pharmaceutique

### I. Contexte historique et définitions

#### I. 1. Quelques dates de référence

En 1944, les travaux d'Avery et collaborateurs permettent de décrire l'ADN comme le support universel de l'hérédité<sup>425</sup>. Cette découverte ne fait pas l'unanimité au sein de la communauté scientifique de l'époque, pour qui les protéines constituaient les candidates plus plausibles pour le support de l'hérédité. En 1953, Rosalind Franklin, James D. Watson, Francis H. C. Crick et Maurice Wilkins proposent une structure tridimensionnelle en forme de double hélice pour la molécule d'ADN<sup>426</sup>. Cette découverte leur vaut le prix Nobel de médecine ou physiologie en 1962.

Des suites de ces découvertes, Francis H. C. Crick décrit alors en 1958 ce qu'il appelle le « dogme central de la génétique », qui est un modèle hiérarchisé de conservation et d'utilisation de l'information génétique (Figure 20).

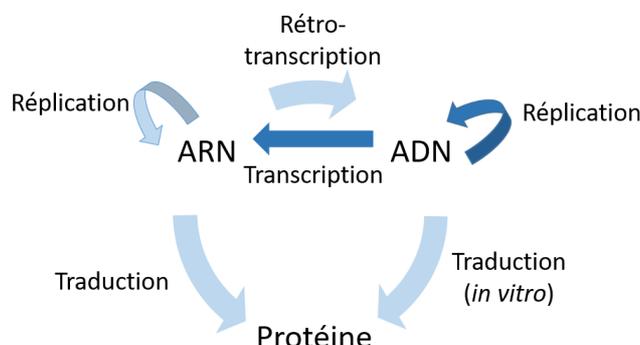


Figure 20 : Dogme central de la biologie moléculaire. Ce dogme établit les transferts d'informations existants entre les molécules du vivant (acides désoxyribonucléiques, acides ribonucléiques et protéines). Flèches bleu foncé : transferts connus en 1970. Flèches claires : transferts supposés sans preuve à la même époque.

C'est à partir de cette période qu'établir la séquence nucléotidique complète de l'ADN est devenue une évidence pour caractériser un organisme vivant.

Les avancées technologiques permirent, dès le milieu des années 1970, le développement d'une technologie de séquençage efficace. En effet, Frederick Sanger mit au point (entre 1975 et 1977) une première méthode de séquençage dont le principe est présenté en Figure 21<sup>427,428</sup>. En 1977, le

premier organisme entièrement séquencé est un phage ( $\phi$ X174) dont le génome est d'une longueur de 5kb. Frederick Sanger est alors récompensé d'un second prix Nobel de chimie en 1980 pour sa méthode de séquençage (son premier prix Nobel date de 1958, pour la publication de la première séquence protéique, celle de l'insuline). Des sociétés comme Perkin Elmer, Beckman Coulter ou Applied Biosystem améliorèrent et automatisèrent ensuite le débit de cette technologie pour que l'ensemble de la communauté scientifique puisse y accéder. Puis en 1985 débutent les séquençages du ver modèle *Cænorhabditis elegans* (finalisé en 1998) et de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (achevé en 2000). Si les grands projets de séquençage humain se sont mis en place à la fin des années 1980, il faudra attendre la date historique du 12 janvier 2001 pour que les revues scientifiques Nature et Science publient la séquence quasi complète des 3 milliards de bases du génome humain.

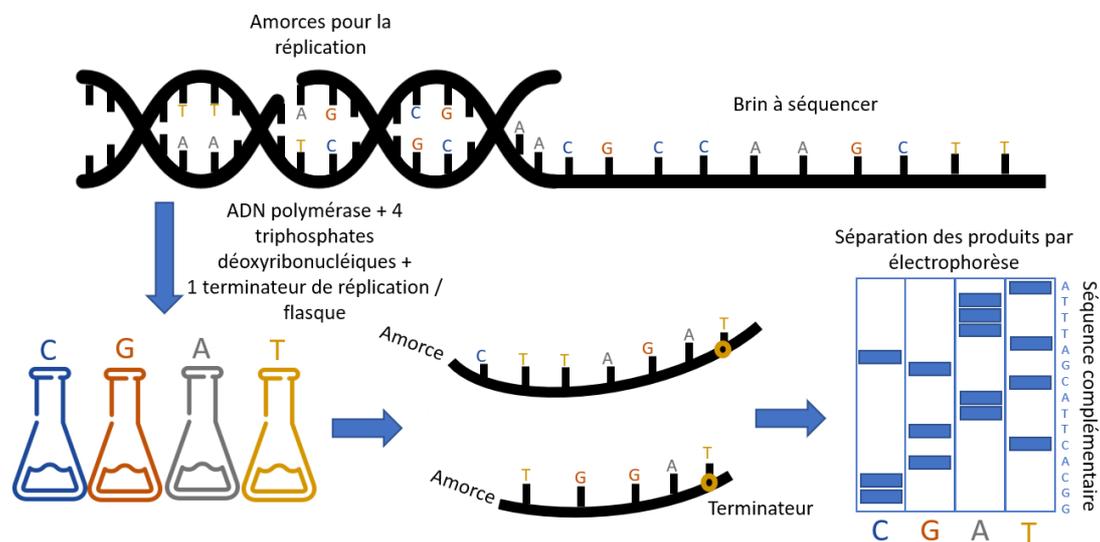


Figure 21 : Séquençage Sanger. Le séquençage Sanger se base sur l'utilisation de nucléotides terminateurs (ddNTPs). Ces ddNTPs permettent d'interrompre l'élongation de la chaîne d'ADN en cours de synthèse par l'ADN polymérase. Cela conduit à la synthèse de molécules d'ADN de différentes tailles suivant où l'incorporation du ddNTP a eu lieu. En faisant migrer ces produits sur un gel, on peut retrouver la séquence en ayant réalisé la réaction dans 4 tubes différents (1 par ddNTP) ou en ayant étiqueté ces ddNTPs avec un marqueur radioactif ou fluorescent<sup>291</sup>.

Parallèlement, les travaux de Jean Brachet (entre autres) s'intéressèrent aux fonctions des ARN (acide ribonucléique) dans le processus de production des protéines. Alors que leur fonction était totalement inconnue, il montre en 1950 que la quantité d'ARN est toujours proportionnelle à l'activité de synthèse protéique dans une cellule<sup>429</sup>. Il faudra attendre la fin des années 50 et la publication des travaux de François Jacob et Jacques Monod pour que s'impose le paradigme selon lequel il existe un ARN messager (ARNm), intermédiaire entre l'ADN et les protéines (Figure 22)<sup>430</sup>.

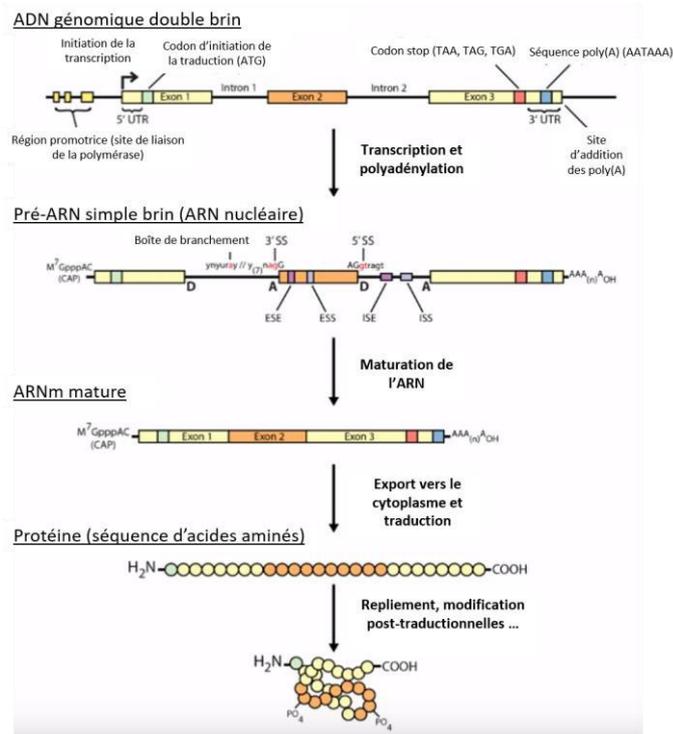


Figure 22 : De l'ADN aux protéines. Lors de la transcription d'un gène, l'ARN-polymérase et les différents facteurs de transcription viennent s'associer sur le gène au niveau de séquences promotrices. L'ADN est alors transcrit en ARN pré-messager. Dans le noyau, cet ARN est mûri : ajout d'un nucléotide méthylé et d'une queue poly-A, excision des introns et épissage des exons. On obtient alors un ARNm mature. L'ARNm migre ensuite dans le cytoplasme pour y être traduit en protéine à partir des acides aminés grâce à l'action de ribosomes et des ARN de transfert. Les gènes de structure complexe peuvent, par épissage alternatif entre les exons, donner des transcrits différents à partir desquels seront traduits des peptides différents.

## 1.2. Génomique fonctionnelle et transcriptome

Le génome est l'ensemble du matériel génétique d'un individu ou d'une espèce. Chez la majorité des organismes dans les règnes animal et végétal, le génome est porté par des molécules d'ADN. Dans une cellule humaine, le génome se compose des informations portées par les 23 paires de chromosomes du noyau ainsi que l'ADN présent dans les mitochondries (ADNmt). Le projet génome humain (débuté en 1990 et achevé en 2001) indique que l'ensemble de l'information génétique humaine est portée par 20 000 à 25 000 gènes. La détermination de la position génomique et des fonctions biologiques de chacun d'eux (génétique fonctionnelle) constitue un axe majeur de recherche dans le monde afin de connaître notamment leur rôle dans certaines pathologies<sup>431</sup>. On peut citer le consortium ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements*) initié en 2003 et qui a pour but de déterminer les rôles fonctionnels de tous les éléments du génome<sup>432,433</sup>. A ce jour, ce consortium a permis d'assigner des fonctions biochimiques à 80% du génome, y compris en dehors des régions codantes pour des protéines. Chez l'homme, la majorité des ARN sont transcrits à partir de l'ADN génomique contenu dans le noyau des cellules. Ces transcrits (ARNm, ARNr, ARNt et autres ARN non codants) peuvent exhiber des profils d'expression spécifiques variant dans le temps, mais aussi dans l'espace cellulaire et / ou selon les stimuli et l'état d'activité physiologique de la cellule

(caractéristique d'un état normal, pathologique ou en réponse à un stimulus particulier). Dans leur ensemble, ils constituent le transcriptome cellulaire, à un moment donné et pour une condition physiologique donnée.

### 1.3. La transcriptomique

La transcriptomique est l'étude du transcriptome. A travers l'analyse quantitative et qualitative des transcrits cellulaires, la transcriptomique a pour but de dresser une signature exhaustive des transcrits modulés (analyse différentielle entre deux états différents de la cellule), en réponse par exemple à différents stimuli environnementaux, des médicaments ou des pathologies<sup>431,434,435</sup>.

Les techniques expérimentales disponibles à ce jour ne permettent pas de quantifier de manière absolue les ARN dans la cellule. En revanche, elles permettent de comparer de manière quantitative le niveau d'expression des gènes dans des conditions physiologiques différentes. Si l'on cherche à quantifier ces niveaux d'expression, on peut choisir selon 3 types d'analyses quantitatives : une analyse de l'impact sur l'expression des gènes entre deux conditions physiologiques (sain vs malade par exemple) ou au cours du temps (suivi longitudinal d'une infection par exemple) et / ou une généralisation de l'analyse différentielle entre plusieurs conditions ou types cellulaires (Figure 23).

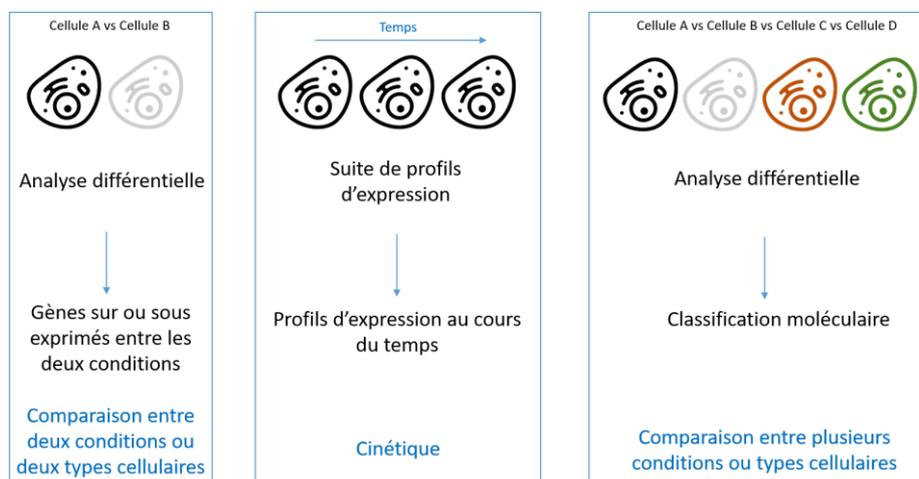


Figure 23 : Analyses quantitatives et transcriptome. De gauche à droite : (i) analyse différentielle qui permet d'identifier les gènes exprimés différemment entre 2 conditions (ou 2 types cellulaires) (ii) analyse de l'expression au cours du temps qui permet d'obtenir des cinétiques de profils d'expression (iii) généralisation de l'analyse différentielle ou classification moléculaire, où l'on compare l'expression des gènes de plusieurs types cellulaires à des fins de classification et d'explication de phénotype (identification de groupes de gènes qui pourraient être des marqueurs moléculaires)<sup>291</sup>.

Afin de toujours mieux appréhender la complexité du transcriptome, on assiste à une amélioration exponentielle des outils et équipements et une spécialisation selon le type d'ARN (ARN

messagers, ARN de transfert, ARN ribosomiques, ARN non codant) ou le nombre de transcrits à étudier (« *Polymerase Chain Reaction* » pour un nombre restreint de transcrits ou puces et séquençage à haut débit lorsque l'on change d'échelle).

## II . Techniques d'analyse du transcriptome

### II . 1 . *Isolation des ARN totaux*

Les protocoles varient selon le type de prélèvement biologique (prélèvements naso-pharyngés, lavages broncho-alvéolaires, biopsies avec microdissections, prélèvements de sang, etc.), mais le principe expérimental reste le même. Pour éviter la dégradation du matériel, il est conseillé de conserver les prélèvements dans une solution de stabilisation d'ARN de type RNeasy® (Qiagen) ou RNeasy Lysis Buffer (Qiagen) à -20°C ou moins jusqu'à l'étape d'extraction des ARN. Le RNeasy Lysis Buffer contient une forte concentration de césium sulfate et de sulfates d'ammonium quaternaires qui dénaturent les enzymes hydrolysant l'ARN (RNases). Il est donc utilisé pour protéger les ARN de l'hydrolyse.

Afin de récupérer l'ARN des cellules, il est nécessaire de procéder à une étape de lyse cellulaire. Cette lyse peut s'effectuer par choc osmotique, traitement mécanique (broyeur ou billes), chimique (avec des détergents comme le SDS par exemple), enzymatique (protéinase K) ou par une combinaison de ces méthodes. Les protéines du lysat sont ensuite dénaturées notamment pour inactiver les nucléases (par chélateurs et / ou agent chaotropiques). Les acides nucléiques doivent ensuite être isolés des débris cellulaires et impuretés (séparation en phase liquide, solide ou gradient). Un traitement à la DNase est généralement conseillé afin de diminuer le bruit de fond des échantillons étudiés. Les ARN purifiés peuvent ensuite être quantifiés par fluorescence, avec le Qubit® par exemple, grâce à des colorants fluorescents se liant spécifiquement à l'ADN simple ou double brin, à l'ARN, aux micro ARN ou aux protéines, pour une quantification précise de la molécule d'intérêt.

Dans l'optique de repositionnement de molécules pharmaceutiques par l'étude des signatures transcriptomiques cellulaires suite à une infection, nous avons eu accès à des échantillons cliniques et généré du matériel biologique à partir de modèles d'infection *in vitro*. Après extraction selon les étapes précisées ci-dessus, nous avons choisi de caractériser les signatures grâce à des technologies à moyen (biopuces) et haut débit (RNAseq).

## II. 2. Analyses à bas et moyen débit

La méthode de séparation par électrophorèse de fragments d'ARNm (dite de « Northern Blot », par analogie à celle spécifique de l'ADN inventée par Edwin Southern en 1976) a été développée par Alwine et collaborateurs en 1977. Parallèlement, plusieurs équipes co-développent la méthode d'hybridation *in situ*, qui ne sera pas utilisée avant 1986 pour l'étude des ARNm<sup>436</sup>. La première moitié des années 1980 marquent l'invention par Kary Mullis de la PCR (*polymerase chain reaction*) qui permet l'amplification exponentielle d'un ou plusieurs fragments d'ADN<sup>437</sup>. Cette technique fut adaptée à partir de 1992 par R. Higuchi et ses collaborateurs pour les études d'expression de gènes. On parle alors de qPCR pour « *quantitative polymerase chain reaction* » ou PCR en temps réel. La RT-PCR quantitative (RT-qPCR) permet donc de quantifier (de manière relative) un type d'ARN présent dans un échantillon. Elle se compose d'une étape de transcription inverse (synthèse d'un brin d'ADN à partir d'une matrice ARN grâce à une ADN polymérase ARN dépendante) suivie d'une PCR en temps réel. Si on s'intéresse au niveau d'expression d'un gène dans un échantillon, on sait que plus un gène est exprimé, plus le nombre de molécules d'ARN synthétisées sera grand. La RT-qPCR permet de visionner en temps réel la synthèse des fragments d'ADN grâce à la fixation de molécules fluorescentes sur l'ADN, la fluorescence mesurée dans l'échantillon augmentant proportionnellement avec le nombre de molécules d'ADN. Les technologies actuelles de détection et de quantification les plus utilisées sont Taqman, EvaGreen ou SYBR green et les équipements de mesure peuvent être le 7900 HT fast real time PCR (Applied biosystem) ou Biomark (Fluidigm) parmi d'autres.

Il est aussi intéressant de citer des technologies plus récentes à « moyen débit » comme les technologies digitales que sont le Nanostring® et le QX200 DropletDigital PCR system. La technologie nCounter de NanoString propose plusieurs panels pré-définis ou à façon afin d'étudier l'expression des gènes de l'Homme mais aussi de la souris ou des primates non-humains sans étape d'amplification. Selon les problématiques, des panels relatifs à l'oncologie, aux neurosciences, à l'immunologie ou autres sont disponibles. Sa technologie s'articule en 3 points principaux : (1) Mise en contact de l'échantillon cible avec des sondes de capture et des sondes « rapporteurs » afin de former des complexes puis (2) Purification de la solution par retrait des sondes non complexées et immobilisation sur la cartouche et enfin (3) Comptage des code-barres et annotation (Figure 24).





Figure 25 : Obtention d'EST. On commence par construire une banque d'ADNc à partir d'ARNm isolés. Puis, pour chaque clone, on séquence partiellement ces ADNc pour obtenir des marqueurs de séquence exprimée ou EST (expressed sequence tags). Source : <http://biochimej.univ-angers.fr>

D'autres méthodes ont utilisé les propriétés de complémentarité et d'hybridation des acides nucléiques afin de synthétiser de très nombreuses sondes spécifiques afin d'obtenir une vision plus globale de la modulation<sup>439,440</sup>. C'est le cas de la méthode SAGE (*serial analysis of gene expression*) ou des biopuces (puces à ADN ou *DNA microarrays* ou *DNA chip*)<sup>441</sup>.

### II . 3 . A . Les puces à ADN

Les biopuces permettent de mesurer simultanément le niveau d'expression de milliers de transcrits connus d'un échantillon, ce qui en fait un outil de choix pour l'étude du transcriptome cellulaire<sup>442</sup>. Le principe de la puce à ADN repose sur la propriété que possède l'ADN dénaturé (simple brin) de reformer spontanément sa double hélice lorsqu'il est en présence d'un brin complémentaire (réaction d'hybridation). La Figure 26 présente les étapes principales d'une expérience de puce à ADN, depuis l'échantillon d'intérêt à l'analyse des données.

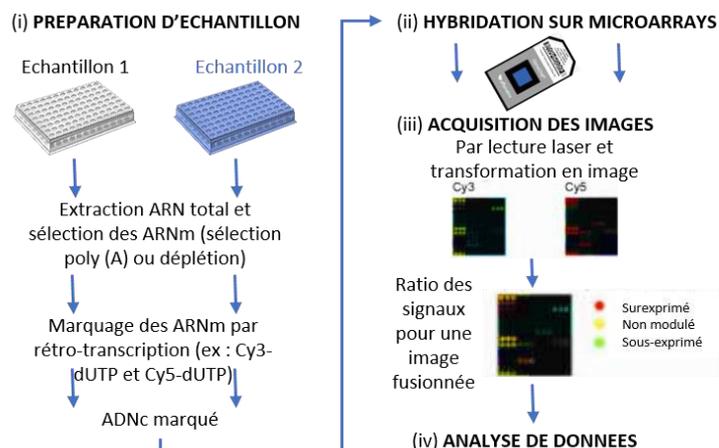


Figure 26 : Principe des puces à ADN<sup>174</sup>.

La puce à ADN consiste en un ensemble de molécules d'ADN fixées (complémentaires des acides nucléiques que l'on souhaite analyser, on parle de sondes) sur une membrane de verre, de silicium ou de plastique. Chaque sonde est synthétisée *in situ* de manière à être le plus spécifique possible d'un gène donné. Selon le dessein voulu, les sondes peuvent être soit des oligonucléotides (quelques dizaines de nucléotides), soit des ADNc (quelques centaines de nucléotides).

Les ARN extraits de l'échantillon étudié sont marqués pour être différenciés lors de l'étape d'hybridation (hybridation compétitive des ADNc marqués sur le support). Cette étape de marquage s'effectuait historiquement grâce à l'association d'une molécule radioactive aux nucléotides complémentaires au cours d'une étape de rétro-transcription. Aujourd'hui, des fluorochromes sont utilisés en alternative. Les ADNc ainsi marqués et issus de la rétro-transcription *in vitro* des ARN à étudier s'hybrident aux sondes complémentaires fixées sur le support. Une image de la puce est alors réalisée : l'intensité de fluorescence ou de radioactivité de chaque point de la puce est détectée et convertie en une intensité lumineuse par un scanner approprié, permettant ainsi que quantifier l'expression de chaque gène présent sur la puce puisque plus un gène est exprimé, plus le nombre de molécules d'ARN synthétisées sera grand.

On distingue différents formats et types de puces selon la densité des spots, la nature et le mode de fabrication des sondes (synthèse *in situ* par photolithographie ou impression «jet d'encre»), la nature des cibles, les méthodes d'hybridation et le champ d'application. Plusieurs sociétés commerciales ont ainsi développé des puces à ADN parmi lesquelles Agilent Technologies, Affymetrix, GE Healthcare, Life Technologies (Applied Biosystems) ou encore Illumina.

L'analyse des résultats de puces est une étape cruciale dans le processus d'acquisition d'information, nécessitant des outils et méthodes statistiques adaptés. Ce point sera développé plus en détail dans la partie Résultats de ce document.

La PCR quantitative (RT-qPCR) permet généralement de valider les résultats obtenus sur un panel de gènes choisis. Celle-ci reste un outil d'actualité grâce à sa fiabilité, rapidité d'exécution, sa précision et sa reproductibilité. Parfois cette méthode suffit même lorsque l'on s'intéresse au diagnostic ou pronostic de certaines maladies, par exemple dans les cas de leucémies<sup>443</sup>, mais aussi pour le suivi d'un patient ou la détection de pathogènes (cf. partie Diagnostic de ce manuscrit)<sup>444</sup>.

## II . 3 . B . Le séquençage à haut débit de 2<sup>ème</sup> génération

Le NGS (*Next Generation Sequencing*) est, par opposition à la méthode Sanger, une technologie de séquençage qualifiée de 2<sup>ème</sup> génération<sup>445,446</sup>. Le terme NGS se réfère à des technologies qui permettent le séquençage sans séparation physique des réactions individuelles dans des tubes différents. Au lieu de cela, les réactions de séquençage se produisent en parallèle sur une surface solide (comme le verre ou les billes) et sont analysées simultanément, améliorant considérablement le débit par rapport au séquençage Sanger. Au contraire des biopuces, ces technologies de séquençage peuvent identifier et quantifier de manière concomitante des transcrits rares sans connaissance préalable ou identifier des événements d'épissage alternatif ou encore de variation de séquence<sup>447,448</sup>. Les principaux termes techniques associés au NGS utilisés dans la suite du manuscrit sont répertoriés dans le Tableau 18.

| Terme  | Définition  |
|--|---|
| Adaptateurs  | Oligonucléotides simple ou double brin pouvant se lier aux extrémités de l'ADN cible  |
| Amplification par pont (« <i>bridge amplification</i> ») | Technique de PCR qui incorpore l'ADN sur une surface solide hérissée d'oligonucléotides fixés pour le clonage   |
| Couverture   | Proportion de la séquence génomique cible effectivement séquencée   |
| Fragmentation  | Etape de découpage de l'ADN en fragments utilisables par la plateforme. On distingue classiquement deux méthodes : (i) par sonication et (ii) par digestion enzymatique               |
| Génération d'amas (« <i>clusters</i> »)                  | Les <i>clusters</i> sont le produit du séquençage NGS et leur nature est plateforme-dépendante.   |
| Hybridation  | Processus de liaison d'ADN ou d'ARN simple brin pour former de l'ADN ou de l'ARN double brin  |
| Lecture (« <i>read</i> »)                                | Données issues des séquenceurs, c'est-à-dire des segments nucléotidiques de fragments d'ADN, dont la longueur et la fidélité sont fonction de la technologie de séquençage            |
| Librairie  | ADN / ARN prêt à être séquencé (compatible avec le système de séquençage utilisé). Le processus de préparation de librairie inclut la fragmentation de l'ADN et l'ajout d'adaptateurs |
| <i>Ligation</i>  | Etape de liaison des adaptateurs et / ou des code-barres à l'ADN  |
| Oligonucléotide  | Court segment d'acides nucléiques (ARN ou ADN) de quelques dizaines de nucléotides, généralement obtenu par synthèse chimique, simple ou double brin                                  |
| PCR en émulsion  | Technique de PCR sur bille au sein d'une émulsion (mélange eau-huile) qui encapsule cette bille et forme une gouttelette  |
| Profondeur de séquençage                                 | Nombre de fois où un nucléotide donné est lu lors du séquençage. Il est exprimé en X  |
| Pyroséquençage   | Procédé de détection lumineuse d'un pyrophosphate libéré lors de l'incorporation d'un nucléotide correct pendant le séquençage par synthèse   |
| <i>Run</i>   | Processus global de séquençage sur une plateforme dédiée  |
| Séquençage par synthèse (SBS)                            | Procédé de séquençage où l'on détecte le nucléotide incorporé par la polymérase   |
| Séquence de référence                                    | Séquence d'ADN consensus pour un organisme donné  |
| <i>Trimming</i>  | Etape de retrait des lectures de qualité médiocre et des adaptateurs  |

Tableau 18 : Glossaire des termes clefs associés aux technologies de NGS.

Les premiers séquenceurs NGS présents sur le marché portent le nom de 454 (Roche) ou Genome Analyzer (Illumina/Solexa), utilisant respectivement la technologie de PCR en émulsion et pyroséquençage ou amplification par pont (« *bridge amplification* ») et séquençage par synthèse<sup>449</sup> (Figure 27). Ces technologies se différencient selon les méthodes utilisées lors de la préparation de la molécule d'ADN recombinant (aussi appelé *template*, sur bille ou sur surface), l'étape de séquençage (pyroséquençage ou « *reversible terminator* » ou par ligation) et d'acquisition d'image et enfin d'analyse de données<sup>445</sup>. Différentes tailles d'amplicon peuvent donc être atteintes selon le séquenceur choisi (75-250 bases pour illumina alors que le séquenceur proposé par Pacific Biosciences dépasse les 960 bases). Le temps de séquençage varie aussi, tout comme le taux d'erreur, permettant à chaque laboratoire de choisir son outil de prédilection selon ses problématiques de recherche<sup>445,450</sup>.

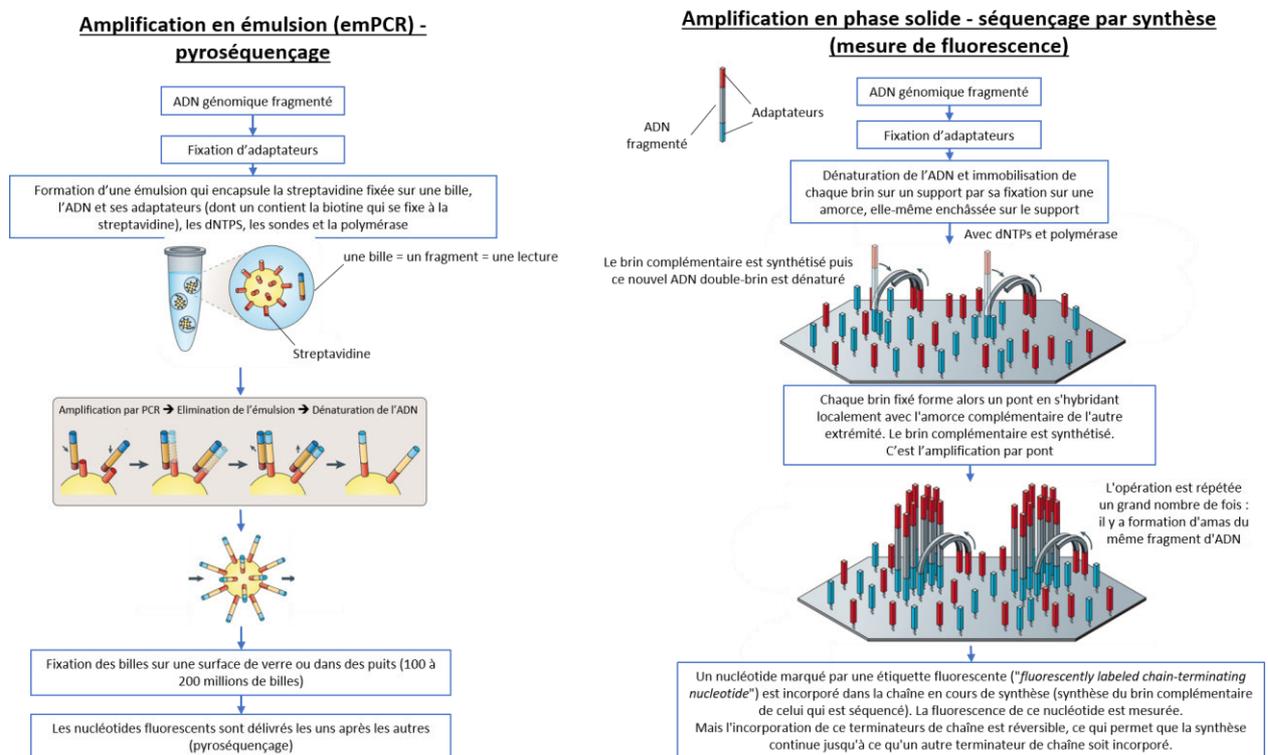


Figure 27 : Exemples de technologies de séquençage : 454 (Roche) vs Illumina (Adapté de Metzker 2010).

Ces technologies à haut débit ont rapidement été adoptées pour l'étude du transcriptome<sup>448,451,452</sup>. Si l'on s'intéresse aux ARNm et que la qualité des échantillons est suffisante, il est nécessaire de passer par une étape d'enrichissement par sélection polyA ou déplétion des ARN ribosomiques (95% des ARN des cellules) avant de passer à l'étape de préparation des bibliothèques (Figure 28). Ces préparations de bibliothèques consistent en la génération d'ADNc, leur fragmentation, la sélection de fragments dans un intervalle de taille précis ainsi que l'ajout d'index. Ces bibliothèques pourront ensuite être séquençées.

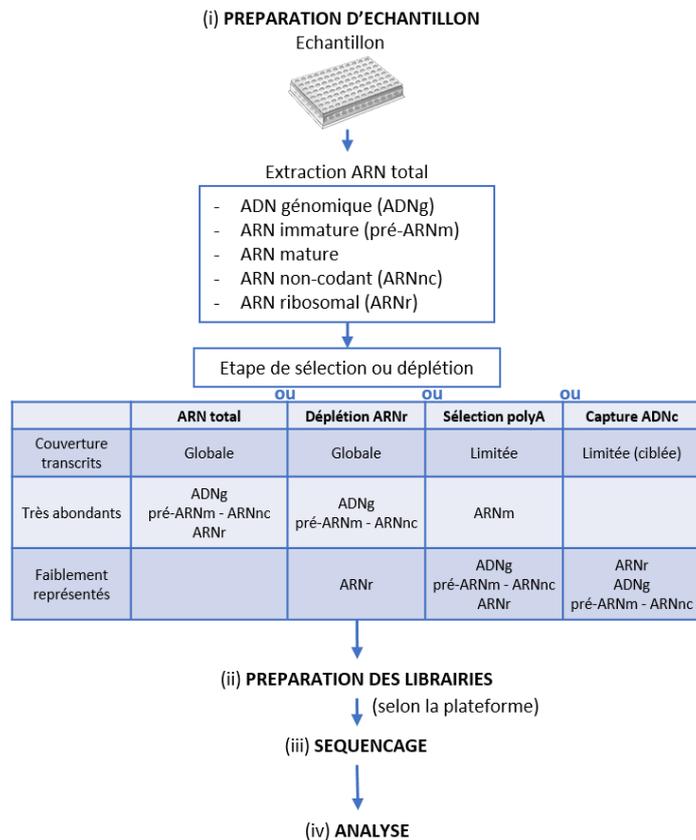


Figure 28 : Stratégies d'enrichissement couramment utilisées. Selon les besoins, ces stratégies permettent de moduler les proportions en ARN ribosomiaux, en ARN non codants ou ARN messagers. Si l'ARN total est séquencé sans enrichissement, la grande majorité des lectures correspondent à des ARN très fortement exprimés tels que les ARNr. Chez l'homme, environ 95% à 98% de toutes les molécules d'ARN peuvent être des ARNr. La cible du RNAseq étant rarement les ARNr, des stratégies d'enrichissement ont été développées. Un traitement à la DNase permet de se débarrasser d'une partie de l'ADNg. L'utilisation d'oligonucléotides complémentaires aux ARNr permet de réduire spécifiquement leur abondance (déplétion ARNr). La sélection Poly (A) permet un enrichissement en ARN polyadénylés matures. Enfin, la capture d'ADNc permet de cibler certains loci d'intérêt afin de les amplifier (ex : exome)<sup>174</sup>.

Comme toutes les technologies d'étude du vivant, chacune des étapes de la préparation des échantillons, de l'analyse et de l'interprétation des données de RNAseq doit s'adapter aux spécificités de chaque projet en termes de qualité et / ou type de données, modèle, ou problématique<sup>453,454</sup>. Par exemple, dans une étude avec de multiples variables, il est nécessaire de démultiplier le nombre d'échantillons pour obtenir des résultats fiables. Aujourd'hui, la technologie Illumina est la plus utilisée, parfois en complément d'autres technologies (RiboSeq, 3' RNASeq ...).

Comme résumé en Figure 29, l'analyse de données de RNAseq peut être découpée en 5 parties principales :

- (1) *Trimming* des données brutes et contrôles qualité
- (2) Alignement / Assemblage des lectures
- (3) Selon le but de l'analyse, choix d'un outil de comptage (cufflinks pour les analyses d'expression ou defuse pour la détection d'évènements de fusion par exemple)

(4) Analyse différentielle (normalisation et statistiques)

(5) Enrichissement ou autres analyses complémentaires (Ingenuity, R, cytoscape...) et visualisation (sous forme de tableau, cytoscape...)

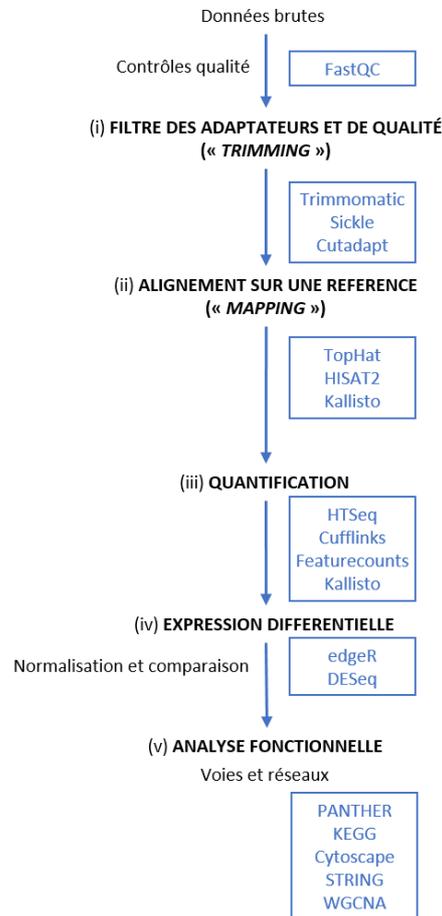


Figure 29 : Analyse différentielle sur des données issues de NGS. Exemple de pipeline et d'outils (en bleu) pour l'analyse de données de séquençage.

Hormis des études d'analyse différentielle, le RNAseq peut bien sûr mener à la découverte de nouveaux transcrits et de nouvelles annotations, la découverte d'évènements d'édition génomique, la détection d'évènements de fusion de gènes entre autres. La transcriptomique a su trouver sa place dans l'examen de maladies humaines à l'échelle moléculaire<sup>431</sup>. A travers ce type d'étude, des biomarqueurs de pronostic, diagnostic, mais aussi de nouvelles cibles thérapeutiques ont pu être dévoilées.

### III . L'approche transcriptomique dans le diagnostic médical

Pour les cas de sepsis par exemple, la transcriptomique pourrait permettre un diagnostic précoce et ainsi rendre possible une initiation des traitements dès les premiers stades de la maladie, pour diminuer le risque de mortalité associé à cette pathologie complexe. Dans cette perspective, Tang et collaborateurs ont établi, à partir d'une cohorte de 70 patients en état critique, une signature composée de 138 gènes permettant de discriminer les cas de sepsis des cas de syndrome de réponse inflammatoire systémique<sup>455</sup> (SIRS - 80% de précision). Par ailleurs, un panel de 42 gènes a été constitué dans le cas du sepsis équin et a été évalué sur des échantillons humains, et ajusté de fait avec une précision augmentée à 86-92%<sup>456</sup>. Ce panel (SeptiCyte Lab) reste aujourd'hui à valider sur des cohortes de patients de taille plus importante.

Outre cet exemple d'application au sepsis, ces nouvelles méthodes de diagnostic peuvent également être appliquées aux maladies infectieuses en alternative et / ou en complément des approches classiques qui s'appuient sur la recherche de l'agent pathogène par microscopie, par culture cellulaire ou de son génome/ses antigènes (techniques directes) ou par la recherche d'anticorps spécifiques (sérologie, comme détaillé pour chaque virus dans la partie Diagnostic).

Afin de toujours proposer de meilleurs outils de diagnostics et ainsi adapter au mieux les traitements proposés aux patients, il est nécessaire de mieux caractériser ces infections et leurs agents étiologiques<sup>197</sup>. Une des pistes de diagnostic est de caractériser la réponse spécifique de l'hôte à l'infection. En plus de la description des symptômes, la recherche de biomarqueurs spécifiques s'inscrit parfaitement dans cette démarche d'utilisation des technologies « omics » pour le diagnostic clinique<sup>457,458</sup>.

Une partie de la revue de Burel et collaborateurs s'intéresse aux potentielles méthodes de diagnostic de la tuberculose<sup>459</sup>, notamment *via* l'analyse du transcriptome des patients. Ils reportent une avancée majeure dans ce domaine en citant l'article de Berry et collaborateurs de 2010<sup>460</sup>, qui a établi la signature de 393 prélèvements sanguins correspondant à des cas de tuberculose (TB) active ou latente ou des cas infectieux ou d'inflammation chronique. En comparant ces signatures à celles de patients après traitement, les auteurs ont identifié 86 transcrits (associés notamment aux voies des interférons de type 1 et 2) permettant de discriminer un cas de TB active vis-à-vis d'autres infections bactériennes (Staphylocoque ou Streptocoque) ou de réactions inflammatoires (dues à la maladie de Still ou lupus érythémateux disséminé, par exemple). D'autres études cherchent à (i) distinguer les signatures transcriptomiques de patients atteints de TB de ceux atteints de sarcoïdoses

ou pneumonies ou de cancer des poumons par exemple, ou (ii) classifier les infections par TB<sup>461-464</sup>. Ces études ont des implications quant à l'identification et la validation éventuelle de biomarqueurs spécifiques potentiels de diagnostic, l'objectif étant de générer des kits PCR de diagnostic par exemple lors d'épidémies de TB mais aussi pour envisager et / ou adapter des stratégies vaccinales et thérapies<sup>465-467</sup>.

En ce qui concerne les virus respiratoires, il est intéressant de citer le travail de Zaas et collaborateurs, qui ont établi un panel de gènes cellulaires permettant de discriminer différentes infections virales à partir de signatures de patients infectés avec une précision de plus de 95%<sup>468</sup>. Leur étude s'intéresse aux signatures transcriptomiques induites par des infections par les rhinovirus, HRSV et IAV dans des prélèvements de sang périphérique (Figure 30). Ce type d'étude permet d'envisager une utilisation de la transcriptomique pour le développement de nouveaux outils diagnostics innovants qui permettraient à terme une identification rapide de pathogènes à partir d'échantillons sanguins de patients.

#### IV . L'approche transcriptomique dans le pronostic médical

Si l'on prend l'exemple d'enfants infectés par le HRSV, prédire de l'évolution de l'infection peut être crucial pour la survie des patients. Jong et collaborateurs ont établi une liste de marqueurs permettant un meilleur pronostic de telles infections<sup>469</sup>. Des échantillons sanguins et nasaux de patients présentant des bronchiolites virales ont été collectés pour cette étude ainsi qu'un ensemble de données concernant l'évolution de la maladie (hypoxie, nécessité de ventilation mécanique...). Après hybridation sur biopuce et analyse des données, ils ont établi une signature de 84 gènes cellulaires (correspondant à 95 transcrits) pouvant prédire l'absence de progression de l'infection vers des formes sévères (Figure 31). Cette étude n'est pas isolée puisque l'importance de la transcriptomique dans les pronostics d'évolution a aussi été établie en cancérologie<sup>470-473</sup> ou dans les pathologies inflammatoires comme le lupus érythémateux systémique<sup>474</sup>.

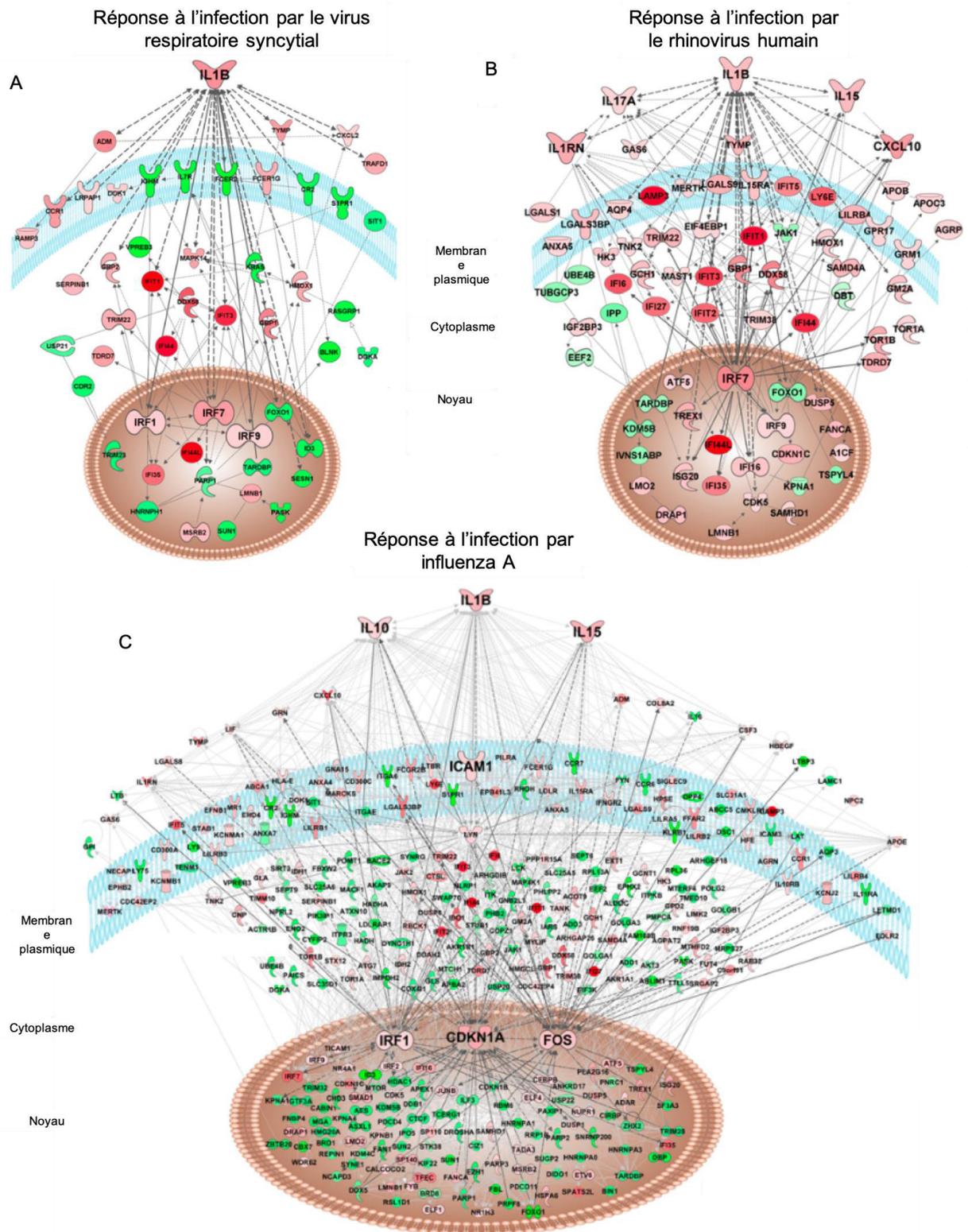


Figure 30 : Acteurs de la réponse de l'hôte à l'infection (Source : Troy et Bosco, 2016). Les données d'expression obtenues par Zaas et collaborateurs sont issues de prélèvements sanguins d'adultes volontairement infectés par HRSV (panel A), HRV (rhinovirus, panel B) ou IAV (panel C). Avec une  $p$  valeur ajustée  $< 0.05$ , ils ont obtenu 934 gènes modulés par l'infection par IAV, 173 gènes pour RV et 130 gènes pour HRSV ( $p$  valeur ajustée  $< 0.1$ ). Les gènes surexprimés sont représentés en rouge et les gènes sous-exprimés sont représentés en vert (Ingenuity Systems KnowledgeBase).



Un autre exemple est rapporté dans l'étude de Qu et collaborateurs sur le psoriasis<sup>477</sup>. A partir de données transcriptomiques cliniques publiques, ils ont généré un pipeline d'analyse leur ayant permis d'établir la signature de la maladie, ainsi que l'identification de potentielles cibles d'intérêt (Figure 32). Ils ont ainsi proposé d'évaluer des molécules ciblant les protéines codées par les gènes APOE, IL4R, PPARG, LEP, CFB, CFH, HMOX1, IL1B ou IL37 et ont identifié les gènes CCL2, IL8, PRKCQ et SOD2, déjà en cours d'étude pour le traitement du psoriasis. Alternativement, ils ont proposé 9 nouvelles cibles (IL36RN, GGH, IL19, IL36A, FUT2, NOD2, PTTG1, S100A2 et UBD) pouvant être valorisées par des programmes de développement de médicaments.

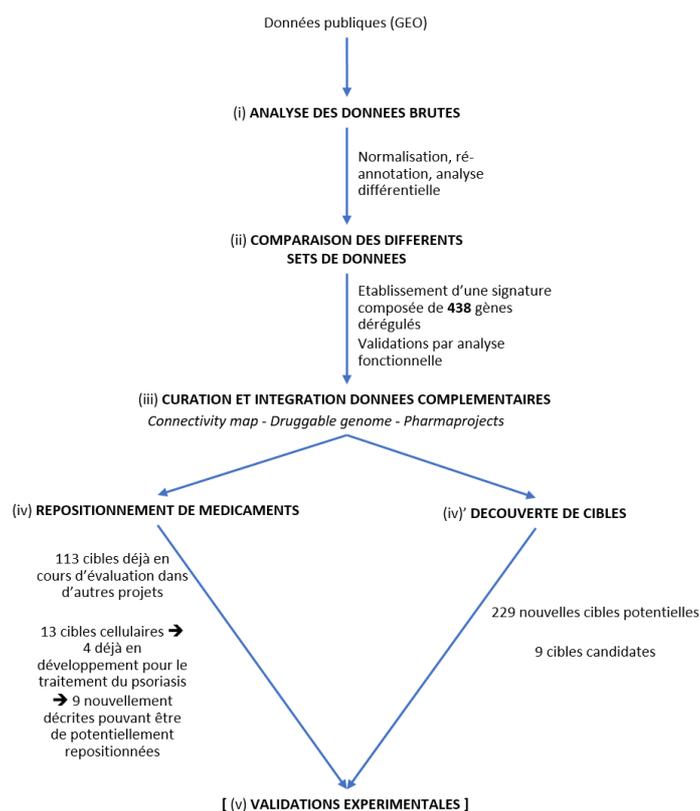


Figure 32 : Stratégie pour la découverte de nouveaux traitements et / ou cibles thérapeutiques du psoriasis. A partir de la compilation et ré-analyse des données brutes d'expression de 9 sets de données de GEO, les auteurs ont identifié une signature composée de 438 gènes. Parmi eux, 113 sont listés dans la base de données Pharmaprojects comme étant liés à des projets de développement de médicaments. 4 cibles sont déjà l'objet d'études en cours pour le traitement du psoriasis et 9 pourraient l'être (GWAS). Les autres gènes non décrits dans Pharmaprojects sont alternativement évalués comme cibles potentielles.

La berbérine, médicament issu de la médecine traditionnelle chinoise ayant une activité anticancéreuse a été étudiée par Lee et collaborateurs. La comparaison des gènes modulés par cette molécule avec ceux modulés par des composés de la base de données publique Connectivity Map a été effectuée<sup>478,479</sup>. En complétant l'analyse avec les informations contenues dans la base de données STITCH (interactions protéine-protéine), les auteurs en ont déduit le potentiel inhibiteur de la molécule sur la synthèse protéique globale et en particulier sur l'histone désacétylase (HDAC) ou encore la voie AKT (mTOR). Leurs résultats ont ainsi permis de mettre en lumière le(s) mécanisme(s) d'action jusqu'alors inconnu(s) de la berbérine lié(s) à son efficacité dans le traitement du cancer.

Dans cette approche, l'observation d'une corrélation négative entre la signature transcriptomique d'une molécule et celle d'une pathologie permet de supposer un potentiel effet inhibiteur de cette molécule sur la pathologie en question. Cette approche innovante de réversion de signature transcriptomique pour l'identification et le repositionnement de médicaments pour de nouvelles indications thérapeutiques constitue la stratégie développée et validée dans le domaine des infections respiratoires par le laboratoire VirPath. Notre équipe, en collaboration avec le laboratoire du Dr Guy Boivin (Université Laval, CHU Québec), a ainsi repositionné comme antiviral, sur la base de sa signature transcriptomique cellulaire, le diltiazem, un inhibiteur calcique usuellement utilisé comme antihypertenseur<sup>480</sup>. Comme indiqué précédemment, mes travaux de thèse se sont inscrits dans ce programme et seront détaillés dans la partie Résultats.

Dans le domaine des infections respiratoires, Smith et collaborateurs ont exploité les données disponibles dans la littérature afin de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Celles-ci ont été établies par l'étude systématique des voies cellulaires et cibles d'IAV, HRSV, HRV, SARS-CoV, HMPV, coxsackievirus et cytomegalovirus<sup>366</sup>. Ils ont identifié 53 gènes modulés significativement dans les cas d'infection par au moins 5 des 7 virus étudiés. Ces auteurs ont ainsi proposé 5 candidats médicaments au repositionnement, qui ciblent les protéines codées par les gènes F3, IL1B, TNF, CASP1 ou MMP9.

Cette stratégie d'exploitation de signatures chemogénomiques et pathogénomiques a également été exploitée avec succès dans d'autres domaines thérapeutiques que celui des infections respiratoires virales, avec entre autres l'identification et le repositionnement du topiramate (antiépileptique) pour le traitement de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (même si une étude rétrospective n'a pas permis de conclure à son efficacité significative chez l'Homme), ou d'autres pathologies comme la dyslipidémie, contre la douleur ou certains cancer<sup>352,480-487</sup>. Une étude de 2014 a également identifié et repositionné la pentamidine pour le traitement de carcinomes à cellules claires du rein (ccRCC)<sup>484</sup>. Après l'établissement de l'ensemble des gènes différentiellement exprimés dans la condition ccRCC (vs rein normal) et une analyse comparative avec la base de données Connectivity map, huit médicaments déjà sur le marché ont été testés pour leur efficacité contre le RCC *in vitro* et *in vivo*. Parmi ces molécules, la pentamidine, a été rapportée comme ralentissant significativement la croissance tumorale dans le modèle murin de xénogreffe de ccRCC humain 786-0.

Ces exemples montrent bien l'importance grandissante de la transcriptomique dans les domaines médical et pharmaceutique, en particulier dans la dynamique actuelle du repositionnement croissant de molécules par les laboratoires pharmaceutiques. L'exploitation

d'outils adaptés (aussi bien RT-qPCR et Nanostring que de biopuces ou plus récemment RNAseq), le développement de méthodologies spécifiques d'analyse bioinformatique, ainsi que l'utilisation à notre avantage de ressources issues de bases de données publiques (analyse fonctionnelle ou connective) nous permettront de poursuivre et optimiser notre stratégie de repositionnement de médicaments comme antiviraux de nouvelle génération pour le traitement d'IRAs, tel qu'illustré dans la partie suivante de ce manuscrit.

## Postulats et hypothèses

Compte tenu des enjeux sanitaires et économiques majeurs que représentent les IRAs et de l'absence ou des importantes limites des traitements prophylactiques ou thérapeutiques disponibles, un programme de recherche translationnelle biomédicale a été initié en 2010 au sein du laboratoire VirPath avec l'objectif de proposer de nouvelles solutions pour répondre à ces besoins médicaux.

Ce projet avait pour objectif initial d'exploiter des données transcriptomiques cellulaires d'infections par les virus influenza dans le but d'identifier de nouvelles molécules antivirales, dont les cibles fonctionnelles seraient cellulaires plutôt que virales, afin de minimiser les risques de résistance des virus à ces nouveaux traitements à plus large spectre<sup>488-491</sup>. Cette stratégie de ciblage cellulaire avait en effet déjà fait ses preuves dans le cadre des thérapies antirétrovirales avec le développement notamment d'antagoniste du co-récepteur cellulaire du VIH (CCR5), tel que le TAK (Takeda Chemical Industries, Ltd) ou le maraviroc (anciennement UK-427857, Pfizer)<sup>492,493</sup>.

Le choix du laboratoire de mener une approche transcriptomique s'est fondé sur plusieurs études suggérant que le mode d'action des médicaments est davantage dépendant de leur(s) effet(s) transcriptionnel(s) sur la cellule hôte que de leur(s) interaction(s) directe(s) avec des facteurs cellulaires<sup>494,495</sup>. D'un autre côté, plusieurs études ont aussi rapporté la modulation forte de l'expression de certains gènes de l'hôte infecté par les virus respiratoires, telle que la surexpression de CXCL10 chez le furet lors d'une infection par une souche de grippe hautement pathogène, ou de PDL1 chez l'homme dans le cas d'infections par les IAV ou HRSV<sup>376,496</sup>. Comme détaillé précédemment, Zaas et collaborateurs ont également décrit une forte modulation des gènes liés aux voies de l'interféron et de l'immunité en général lors de l'infection de patients par le HRSV (IFNL1, IFNG, IFNA2, STAT3), les HRV (IFNA2, IFNL1, MAPK1...) ou les IAV (IFNG, TNF, IFNA2...)<sup>468</sup>.

Ainsi, à partir de ce principe et en se basant également sur le nouveau paradigme de polypharmacologie (détaillé dans l'introduction de ce document), notre équipe a émis deux postulats, tels que schématisés en Figure 33 :

- les signatures transcriptomiques des cellules infectées reflètent un état cellulaire globalement favorable aux virus lorsque les infections sont efficaces
- des molécules induisant une signature cellulaire transcriptomique inverse de celle de l'infection, peuvent induire un état cellulaire globalement défavorable à la réplication virale.

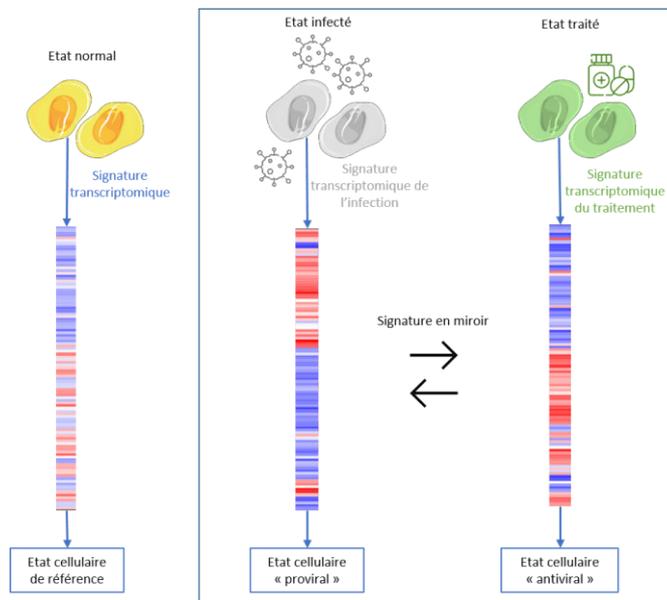


Figure 33 : Le profil global d'expression des gènes comme une signature de l'état global d'activité cellulaire. Des molécules associées à une signature transcriptomique anti-corrélée à celle de l'infection peuvent être considérées comme de potentiels antiviraux<sup>174,291</sup>.

Afin d'obtenir une preuve de concept pour cette stratégie de rupture, une étude initiale (FLUMED) a été mise en place en collaboration avec l'équipe du Dr Jean-Jacques Diaz (UMR5534, CGMC, Lyon) et la plateforme TAGC (ERM206, Marseille), dirigée par le Dr Catherine Nguyen. Des signatures transcriptomiques *in vitro* communes à des infections par différents virus influenza humains et aviaires (type A humains : H1N1 A/New Caledonia/20/99 et H3N2 A/Moscow/10/99 ; type A aviaires : H5N1 A/Vietnam/1194/2004, H5N2 A/Finch/England/2051/94 et H7N7 A/Chicken/Belgium/2003) ont été établies dans un modèle de culture cellulaire A549 (lignée cellulaire épithéliale alvéolaire humaine). Cette signature transcriptomique cellulaire commune de 300 gènes modulés a été obtenue par une technologie de biopuces sur nylon, réalisées à façon par la plateforme TAGC. La signature d'infection a ainsi été exploitée comme support pour le crible de la base de données publique Connectivity Map<sup>497</sup> (Broad Institute, MIT) et a permis la sélection de 8 molécules candidates (harmol, rilmenidine, brinzolamide, ribavirine, folinate de calcium, 2-aminobenzenesulfonamide, merbromine et midodrine) associées à un profil transcriptomique cellulaire anti-corrélé à celui de l'infection. L'identification par cette démarche de la ribavirine, déjà connue pour ces propriétés antivirales<sup>498</sup>, constituait ainsi une première preuve de concept de la stratégie.

A l'issue de leur évaluation par différents tests cellulaires d'infection *in vitro* (viabilité cellulaire et réplication virale), sept des huit molécules candidates démontrèrent une activité antivirale significative *in vitro*, non seulement contre les souches IAV H1N1, H3N2, H5N2, H7N7 et H5N1 utilisées pour la caractérisation de la signature transcriptomique initiale d'infection, mais également contre une souche d'IAV H1N1 pandémique (pdm09). Les sept molécules antivirales identifiées étaient :

- la midodrine, la prodrogue de la desglymidodrine, agoniste des récepteurs alpha adrénergiques, prescrite dans la prise en charge d'hypotensions orthostatiques;
- le harmol, un alkaloïde bêta-carboline issu de la plante médicinale *Perganum harmala L.*;
- la merbromine, un antiseptique topique;
- la brinzolamide, un inhibiteur de l'anhydrase carbonique, prescrit en tant que collyre antiglaucomateux;
- la ribavirine, un médicament antiviral utilisé pour le traitement d'infections par HRSV, hépatite C et certaines fièvres hémorragiques;
- la rilmenidine, un antihypertenseur ;
- le 2-aminobenzènesulfonamide, un antibiotique.

Les résultats obtenus contre la souche IAV H1N1pdm09 validèrent ainsi la stratégie de repositionnement basée sur l'analyse comparée de signatures virogénomiques et chémogénomiques, c'est à dire les modulations transcriptomiques induites soit par un virus soit par une molécule, soulignant son potentiel à identifier des antiviraux de nouvelle génération à large spectre. Cette nouvelle indication thérapeutique des médicaments repositionnés est protégée par un brevet international d'invention (brevet délivré FR n°0958810- PCT/EP2010/069023- WO 2011069990, US n°61/279 997) et les résultats décrits ici font l'objet d'une publication dans la revue internationale à comité de lecture Plos one<sup>499</sup>.

Sur la base de cette première preuve de concept, un essai clinique de phase II a été mené en médecine générale, visant à l'évaluation du chlorhydrate de midodrine<sup>500</sup>. Cette molécule présentait la meilleure activité antivirale à des doses non cytotoxiques contre tous les virus testés *in vitro*<sup>499</sup>. Cet essai clinique a été mené chez les patients souffrant de grippe banale (FLUMED TRIAL, EUDRACT n°011-004552-19). Une réduction de l'incidence et de la durée des symptômes de l'infection grippale a été observée dans le bras de patient traité par le chlorhydrate de midodrine (données non publiées), mais faute d'avoir inclus un nombre suffisant de patients, et donc par manque de puissance statistique, les résultats de l'essai clinique n'ont pas pu conclure sur l'efficacité de la midodrine.

Ces preuves de concept établies *in vitro* validèrent la faisabilité de la stratégie de repositionnement s'appuyant sur une approche globale de la cellule hôte infectée et l'analyse croisée de signatures virogénomiques et chémogénomiques, y compris d'un point de vue opérationnel clinique. Cette stratégie a ainsi été poursuivie au sein de notre laboratoire, avec l'exploitation d'échantillons cliniques plus pertinents d'un point de vue physiologique et l'optimisation significative de la méthodologie et des outils bioinformatiques dans le cadre de mon travail doctoral. Nous avons notamment cherché à évaluer l'intérêt potentiel d'un modèle d'épithélium humain reconstitué, pour des études de transcriptomique, pour l'établissement de signatures viro- et chémogénomiques, en complément des données issues de patients. La Figure 34

résume ces améliorations et l'extension de la stratégie d'analyse de signatures transcriptomiques à d'autres virus respiratoires, détaillées dans la partie résultat de ce manuscrit de thèse.

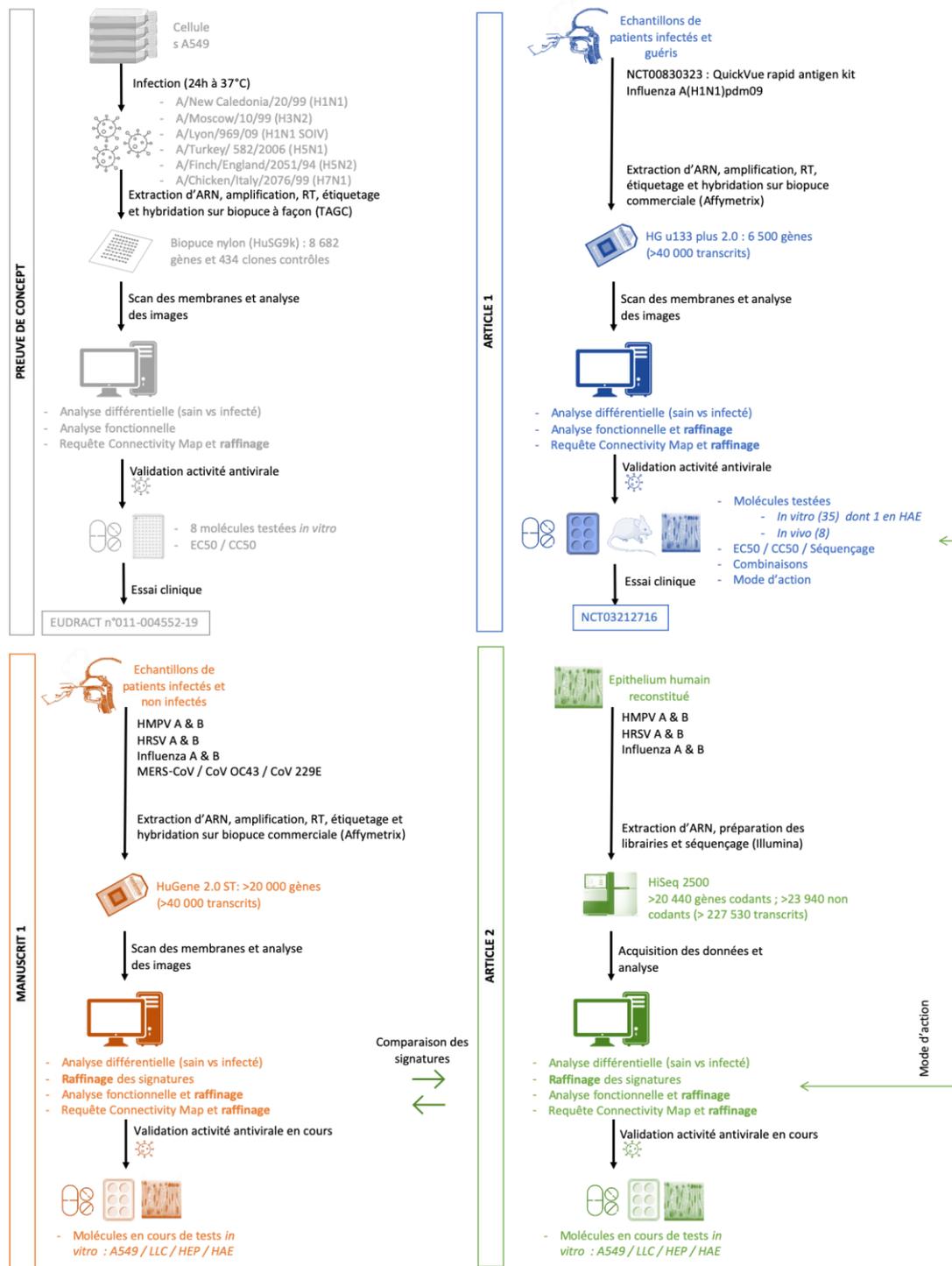


Figure 34 : Optimisation de la stratégie de repositionnement. Le projet FLUMED (en gris) constitue la preuve de concept initiale de notre stratégie de repositionnement. Nous avons ensuite valorisé en ensemble d'échantillons prélevés lors de l'essai clinique NCT00830323 et affiné la stratégie de repositionnement en incorporant de nouvelles technologies et un ensemble de méthodologies et d'outils d'analyse plus performants dans le cadre du projet FLUNEXT (en bleu) qui a permis l'identification et la validation du diltiazem. L'approche a ensuite été étendue à d'autres virus respiratoires dans le cadre du projet RESPIROMIX (en orange et en vert) : échantillons de patients (en orange) mais aussi évaluation et validation d'un nouveau modèle physiologique d'épithélium respiratoire humain *in vitro* pour compléter notre panoplie d'outils (en vert)<sup>174,291</sup>.

## Résultats



## Résultats - Avancées technologiques et optimisation de notre approche valorisant la transcriptomique pour le repositionnement de médicaments antiviraux

### I. Signatures transcriptomiques de patients pour le repositionnement de molécules anti-grippe (Programme FLUNEXT)

Comme décrit précédemment (Figure 34), la stratégie de repositionnement a été optimisée avec l'ambition de caractériser et exploiter des signatures *in vivo* d'infection par les virus influenza A. Ce projet (FLUNEXT) a été financé par la DGOS et l'Inserm «AAP Recherche clinique translationnelle» (investigateur principal : Dr Manuel Rosa-Calatrava) et mené en collaboration étroite avec les Hospices Civils de Lyon, l'Université Laval/CHU de Québec, la plateforme de génomique ProfileXpert de l'UCBL et la société ViroScan3D. Ce programme a donné lieu à l'identification et à la validation *in vitro* et *in vivo* du diltiazem pour son repositionnement comme inhibiteur de virus influenza. Deux brevets d'invention ont été déposés (FR1552284A<sup>501</sup> - WO2016/146836 ; FR1854307<sup>502</sup> - PCT/FR2019/051186) et un article scientifique a été publié en 2019 dans le journal international à comité de lecture en langue anglaise *Frontiers in Immunology*, dans la section *Vaccines and Molecular Therapeutics* (DOI=10.3389/fimmu.2019.00060).

Ce chapitre est ainsi consacré à la présentation de cette publication intitulée « **Repurposing of Drugs as Novel Influenza Inhibitors From Clinical Gene Expression Infection Signatures** », dont les auteurs sont Andrés Pizzorno, Olivier Terrier, Claire Nicolas de Lamballerie, Thomas Julien, Blandine Padey, Aurélien Traversier, Magali Roche, Marie-Eve Hamelin, Chantal Rhéaume, Séverine Croze, Vanessa Escuret, Julien Poissy, Bruno Lina, Catherine Legras-Lachuer, Julien Textoris, Guy Boivin et Manuel Rosa-Calatrava.

Ma contribution à cet article a consisté en l'analyse des signatures chémogénomiques et virogénomiques, principalement dans l'optique d'établir un mode d'action potentiel du diltiazem repositionné.

## 1.1. Résumé

L'optimisation de la stratégie nécessitait l'exploitation d'échantillons cliniques plus pertinents d'un point de vue physiologique, et donc plus complexes par nature, plutôt que d'échantillons issus d'expérimentations *in vitro*. Nous avons donc caractérisé les signatures transcriptomiques *in vivo* d'infection d'une cohorte de neuf patients infectés par le virus influenza A/H1N1pdm09 puis guéris (échantillons issus de l'essai clinique NCT00830323 mené par Escuret et collaborateurs<sup>503</sup>). Ces signatures ont ensuite été exploitées dans le but de sélectionner une liste de molécules candidates pour leur repositionnement grâce à la base de données Connectivity Map (CMap).

Nous nous sommes intéressés à la modulation des 47 000 transcrits représentés sur la biopuce Human Genome U133 plus 2.0, commercialisée par la compagnie Affymetrix, permettant d'analyser l'expression d'un nombre de gènes bien supérieur à l'étude précédente de Josset et collaborateurs.

Grâce à une analyse sur mesure (notamment par l'application de l'algorithme MAXRS<sup>504</sup> sur les données brutes), nous avons pu obtenir une signature d'infection de ces patients. Cette signature composée de 1 117 sondes modulées a été utilisée pour interroger la base de données CMap et calculer des scores de connectivité avec l'ensemble des 1 309 molécules qui la composent (correspondant à 7 000 profils d'expression). Pour enrichir les résultats obtenus, nous avons complété cette signature principale avec deux sous-listes de gènes correspondant à des termes d'ontologie choisis soit parmi les processus biologiques : GO:0009615-réponse au virus, GO:0006955-réponse immunitaire, GO:0042981-régulation de l'apoptose, GO:0006952-mécanisme de défense, GO:0009611-réponse aux blessures, GO:0042127- régulation de la prolifération cellulaire ou parmi les composants cellulaires : GO:0031225-ancré à la membrane, GO:0005829-cytosol, GO:0005654-nucléoplasme (Figure 35). Le contenu des 3 listes de molécules issues du criblage (160 molécules) a ensuite été comparé et nous avons identifié la monensine comme la seule molécule commune à ces listes de molécules candidates. La monensine est un antibiotique largement utilisé dans les industries d'élevage bovin pour prévenir de parasitoses (coccidioses), déjà connue pour ses propriétés antivirales contre un panel de virus et, notamment, contre certaines souches de grippe (crible empirique), y compris en modèle murin<sup>480,483,505-507</sup>. Ce résultat constitue une nouvelle validation de notre stratégie.

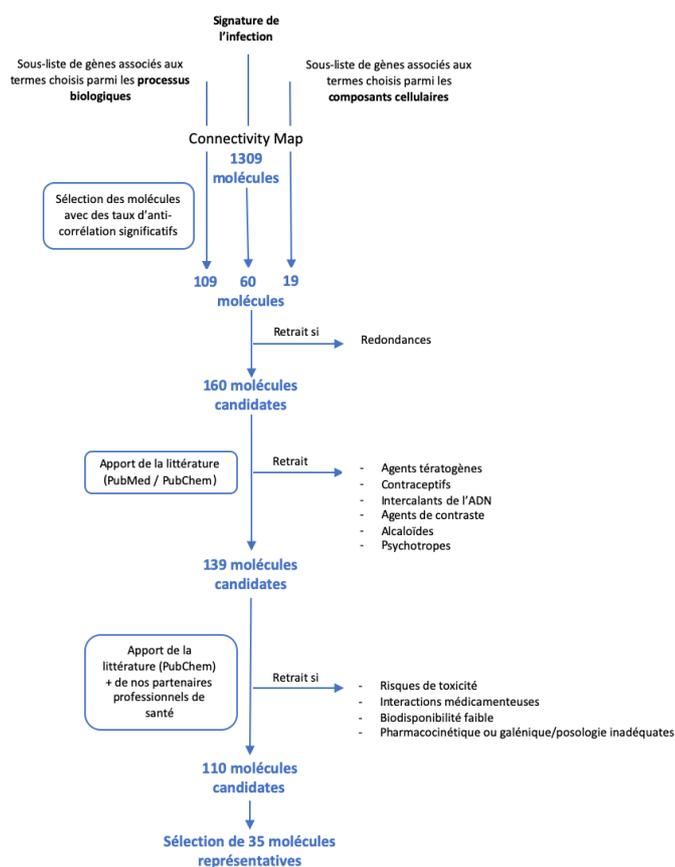


Figure 35 : Arbre de décision ayant mené à la sélection des 35 molécules qui ont été évaluées pour leur potentiel effet antiviral (Adapté de Pizzorno et al. 2019).

Afin de ne pas démultiplier les expérimentations, une étape supplémentaire de raffinement de ces listes a été effectuée, pour éliminer les composés incompatibles avec un repositionnement comme antiviral respiratoire (composés tératogènes et / ou présentant une faible biodisponibilité pour le tractus respiratoire, par exemple). Les principales étapes de raffinement de cette étude sont présentées en Figure 35. Dans cette démarche, 35 molécules à fort potentiel ont finalement été sélectionnées pour leur évaluation fonctionnelle *in vitro* dans le modèle de cellules épithéliales A549 infectées par le virus influenza A(H1N1)pdm09. Une mesure des titres viraux dans les surnageants (TCID50) et une évaluation de la toxicité (MTS assay et viabilité cellulaire) constituèrent les critères de validation de ces molécules candidates. Sur les 35 sélectionnées, 31 molécules se sont avérées antivirales. Parmi ces 31 molécules, certaines, comme le diltiazem, ont obtenu des IC50 (de l'ordre du nanomolaire) bien inférieures à celles obtenues avec les molécules sélectionnées lors de l'étude initiale de preuve de concept *in vitro*, à l'instar de la midodrine<sup>499</sup>.

Sur la base de leur efficacité antivirale démontrée *in vitro*, nous avons ensuite sélectionné les 8 meilleurs composés pour une évaluation *in vivo* en modèle murin C57BL/6 en comparaison avec le traitement de référence à l'oseltamivir. Ces composés sont les suivants :

- le lanatoside C, un agent anti-arythmique ;
- le prednisolone, un anti-inflammatoire, antinéoplasique, glucocorticoïde ;

- la flucytosine, un antifongique, antimétabolite ;
- le felbinac, un anti-inflammatoire non stéroïdien ;
- le timolol, un bêta-antagoniste adrénergique, anti-arythmie, antihypertenseur ;
- le diltiazem, un antihypertenseur, bloqueurs des canaux calciques, vasodilatateur ;
- l'étiléfrine, un alpha-agoniste adrénergique, agoniste des récepteurs bêta-1 adrénergiques, cardiotonique, sympathomimétiques, vasoconstricteur ;
- la monensine, un antifongique, antiprotozoaire, coccidiostatique, ionophore de protons, ionophore de sodium.

Dans des conditions de prétraitement *per os* (6h avant l'infection), le diltiazem et l'étiléfrine ont été les deux molécules démontrant des propriétés antivirales manifestes, en permettant une survie augmentée, une perte de poids significativement moindre et une réduction d'au moins 1 log des titres viraux pulmonaires des souris ayant été infectées par le virus influenza A/Quebec/144147/09 (H1N1)pdm09. Enfin, dans des conditions de traitement post-infection *per os* (premier traitement 24h après l'infection et poursuivi de manière journalière pendant 5 jours), le diltiazem a permis une protection totale et l'étiléfrine une protection à 50% des animaux infectés, validant ainsi le potentiel de repositionnement de ces deux composés.

Parallèlement, les propriétés antivirales de ces deux molécules furent également évaluées dans le modèle expérimental Mucilair™, un modèle *in vitro* complémentaire innovant d'épithélium respiratoire humain reconstitué et cultivé en interface air/liquide, physiologiquement très pertinent dans le contexte d'étude d'infections virales respiratoires. Ce modèle Mucilair™, distribué par la société Epithelix, est décrit plus en détail dans la deuxième partie des résultats de ce manuscrit. Après l'infection par le pôle apical des épithéliums par le virus A (H1N1)pdm09, des traitements à leurs pôles basolatéraux par l'oseltamivir, la monensine, le diltiazem ou l'étiléfrine ont été effectués de manière journalière pendant 5 jours. Un suivi sur 7 jours post-infection a été mené avec des prélèvements aux pôles apicaux des épithéliums pour titration infectieuse. Des mesures physiologiques de résistance transmembranaire et de viabilité des épithéliums ont également été effectuées comme marqueurs de l'infection. Dans ces conditions, les traitements par l'oseltamivir (1µM) et par le diltiazem (90µM) démontrèrent un effet antiviral, notamment associé à un retard de 24h de l'apparition du pic de production viral et une diminution de plus de 3 log des titres viraux à 48h post-infection, par comparaison avec la condition expérimentale sans traitement.

De manière très intéressante, dans les mêmes conditions expérimentales, la combinaison diltiazem + oseltamivir a permis une diminution encore plus importante des titres viraux 48h après l'infection (réduction > 3 logs), y compris avec des doses plus faibles de molécules, respectivement 9µM de diltiazem et 0.1µM d'oseltamivir, suggérant un effet antiviral synergique du traitement combiné.

A l'issue de ces expérimentations, nous nous sommes focalisés sur le diltiazem et nous en avons établi par RNAseq la signature transcriptomique dans le modèle d'épithélium respiratoire humain (HAE), dans le but de caractériser son ou ses mode(s) d'action pour ses propriétés antivirales. Des épithéliums ont ainsi été traités par le diltiazem (avec les doses antivirales efficaces) et une signature composée de 194 transcrits surexprimés et 110 transcrits gènes sous exprimés (*fold change* absolu  $>2$ , p valeur corrigée  $< 0.05$ ) a été établie par comparaison aux conditions sans traitement. A partir de cette signature, nous avons identifié et validé expérimentalement par RT-PCR quantitative des propriétés du diltiazem jusqu'ici non décrites, telle que la capacité à moduler l'expression endogène de gènes spécifiquement liés à la réponse antivirale de l'hôte, en particulier la réponse liée aux Interférons de type III, ainsi que de gènes associés au métabolisme du cholestérol (Figure 36). La caractérisation fine du mode d'action du diltiazem est actuellement poursuivie au sein du laboratoire, au regard notamment des résultats de Fujioka et collaborateurs, qui rapportent que les propriétés connues du diltiazem sur les canaux calciques peuvent également contribuer à l'effet antiviral de cette molécule<sup>508,509</sup>.

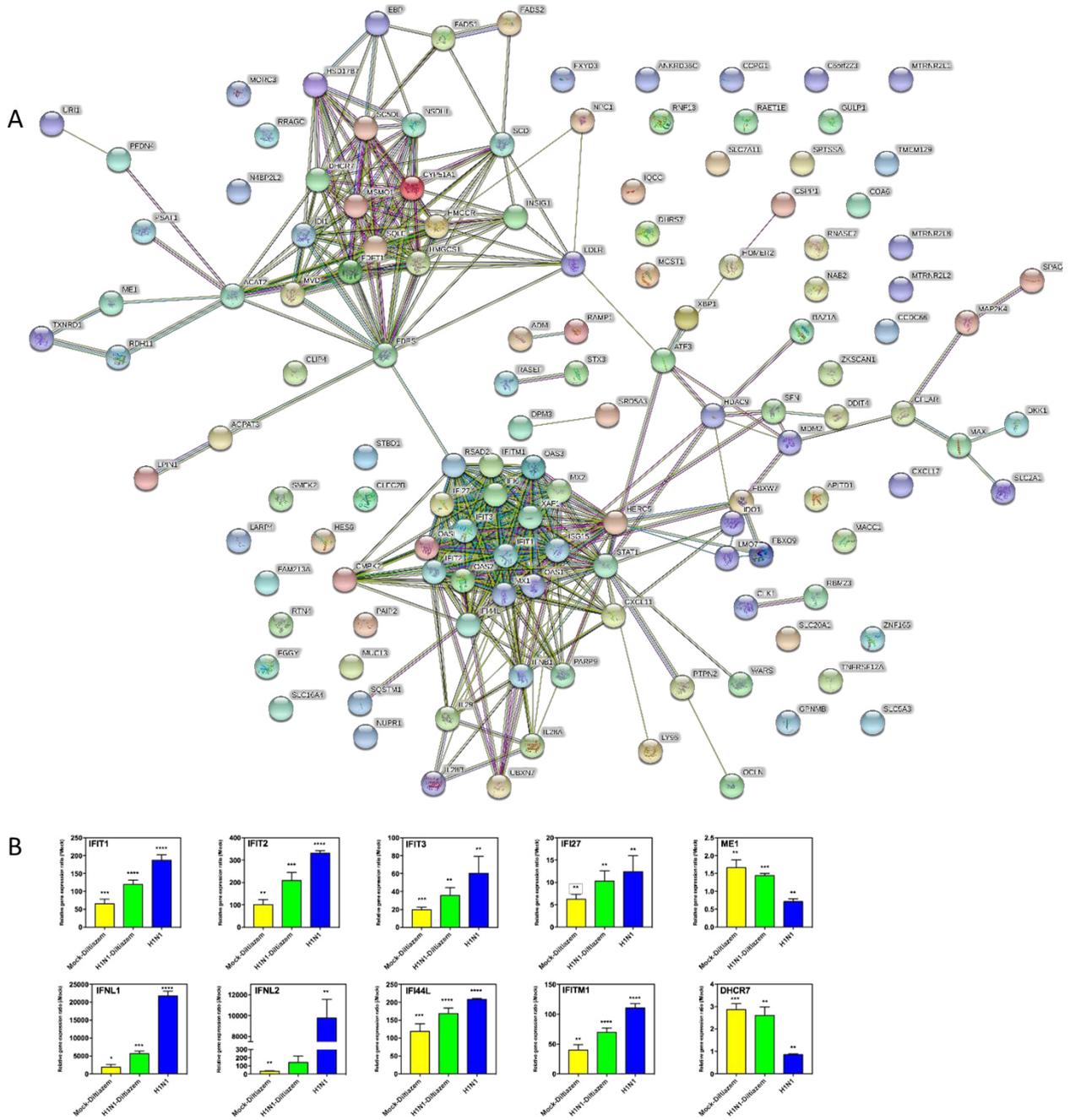


Figure 36: Visualisation de l'ensemble des gènes et de leurs protéines modulées lors d'un traitement au diltiazem. Panel A : Réseau des protéines dont les gènes associés sont surexprimés dans la condition traitée. Panel B : Résultats des RTqPCR de validation sur une sélection de gènes associés à la réponse immunitaire ou le métabolisme du cholestérol. Les résultats sont exprimés en fold change moyen ( $\pm$ écart type), par comparaison avec la condition non-infectée. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  et \*\*\*\* $p < 0.0001$  établies par t-test non paillé. (Source : Pizzorno et al. 2019).



# Repurposing of Drugs as Novel Influenza Inhibitors From Clinical Gene Expression Infection Signatures

Andrés Pizzorno<sup>1,2†</sup>, Olivier Terrier<sup>1\*†</sup>, Claire Nicolas de Lamballerie<sup>1,3</sup>, Thomas Julien<sup>1,4</sup>, Blandine Padey<sup>1,4</sup>, Aurélien Traversier<sup>1</sup>, Magali Roche<sup>3</sup>, Marie-Eve Hamelin<sup>2</sup>, Chantal Rhéaume<sup>2</sup>, Séverine Croze<sup>5</sup>, Vanessa Escuret<sup>1,6</sup>, Julien Poissy<sup>7</sup>, Bruno Lina<sup>1,6</sup>, Catherine Legras-Lachuer<sup>3,8</sup>, Julien Textoris<sup>9,10</sup>, Guy Boivin<sup>2</sup> and Manuel Rosa-Calatrava<sup>1,4\*</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Delphine Descamps,  
INRA Centre Jouy-en-Josas, France

### Reviewed by:

Rong Hai,  
University of California, Riverside,  
United States  
Sascha Trapp,  
INRA Centre Val de Loire, France

### \*Correspondence:

Olivier Terrier  
olivier.terrier@univ-lyon1.fr  
Manuel Rosa-Calatrava  
manuel.rosa-calatrava@univ-lyon1.fr

<sup>†</sup> These authors have contributed  
equally to this work

### Specialty section:

This article was submitted to  
Vaccines and Molecular Therapeutics,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 18 September 2018

**Accepted:** 10 January 2019

**Published:** 29 January 2019

### Citation:

Pizzorno A, Terrier O, Nicolas de Lamballerie C, Julien T, Padey B, Traversier A, Roche M, Hamelin M-E, Rhéaume C, Croze S, Escuret V, Poissy J, Lina B, Legras-Lachuer C, Textoris J, Boivin G and Rosa-Calatrava M (2019) Repurposing of Drugs as Novel Influenza Inhibitors From Clinical Gene Expression Infection Signatures. *Front. Immunol.* 10:60. doi: 10.3389/fimmu.2019.00060

<sup>1</sup> Virologie et Pathologie Humaine—VirPath Team, Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France, <sup>2</sup> Research Center in Infectious Diseases of the CHU de Quebec and Laval University, Quebec City, QC, Canada, <sup>3</sup> Viroscan3D SAS, Lyon, France, <sup>4</sup> VirNext, Faculté de Médecine RTH Laennec, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France, <sup>5</sup> ProfileXpert, SFR-Est, CNRS UMR-S3453, INSERM U57, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France, <sup>6</sup> Laboratoire de Virologie, Centre National de Référence des virus Influenza Sud, Institut des Agents Infectieux, Groupement Hospitalier Nord, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France, <sup>7</sup> Pôle de Réanimation, Hôpital Roger Salengro, Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, Université de Lille 2, Lille, France, <sup>8</sup> Ecologie Microbienne, UMR CNRS 5557, USC INRA 1364, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Villeurbanne, France, <sup>9</sup> Service d'Anesthésie et de Réanimation, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France, <sup>10</sup> Pathophysiology of Injury-Induced Immunosuppression (PI3), EA 7426 Hospices Civils de Lyon, bioMérieux, Université Claude Bernard Lyon 1, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France

Influenza virus infections remain a major and recurrent public health burden. The intrinsic ever-evolving nature of this virus, the suboptimal efficacy of current influenza inactivated vaccines, as well as the emergence of resistance against a limited antiviral arsenal, highlight the critical need for novel therapeutic approaches. In this context, the aim of this study was to develop and validate an innovative strategy for drug repurposing as host-targeted inhibitors of influenza viruses and the rapid evaluation of the most promising candidates in Phase II clinical trials. We exploited *in vivo* global transcriptomic signatures of infection directly obtained from a patient cohort to determine a shortlist of already marketed drugs with newly identified, host-targeted inhibitory properties against influenza virus. The antiviral potential of selected repurposing candidates was further evaluated *in vitro*, *in vivo*, and *ex vivo*. Our strategy allowed the selection of a shortlist of 35 high potential candidates out of a rationalized computational screening of 1,309 FDA-approved bioactive molecules, 31 of which were validated for their significant *in vitro* antiviral activity. Our *in vivo* and *ex vivo* results highlight diltiazem, a calcium channel blocker currently used in the treatment of hypertension, as a promising option for the treatment of influenza infections. Additionally, transcriptomic signature analysis further revealed the so far undescribed capacity of diltiazem to modulate the expression of specific genes related to the host antiviral response and cholesterol metabolism. Finally, combination treatment with diltiazem and virus-targeted oseltamivir neuraminidase inhibitor further increased antiviral efficacy, prompting rapid authorization for the initiation of a Phase II clinical trial. This original, host-targeted, drug repurposing strategy constitutes an effective and highly reactive process for the rapid identification

of novel anti-infectious drugs, with potential major implications for the management of antimicrobial resistance and the rapid response to future epidemic or pandemic (re)emerging diseases for which we are still disarmed.

**Keywords: influenza viruses, antivirals, inhibitors of viral infection, transcriptome, host targeting, drug repurposing**

## INTRODUCTION

Besides their well-known pandemic potential, annual outbreaks caused by influenza viruses account for several million respiratory infections and 250,000 to 500,000 deaths worldwide (1). This global high morbidity and mortality of influenza infections represents a major and recurrent public health threat with high economic burden. In this context, the suboptimal vaccine coverage and efficacy, coupled with recurrent events of viral resistance against a very limited antiviral portfolio, emphasize an urgent need for innovative treatment strategies presenting fewer obstacles for their clinical use (2).

For decades, the strategy for antiviral development was mostly based on serial screenings of hundreds of thousands of molecules to identify “hits” and “leads” that target specific viral determinants, a quite costly and time-consuming process. However, the dramatic reduction in successful candidate identification over time (3), along with a concomitant increase of regulatory complexity to implement clinical trials, have fostered rising interest in novel strategies. Indeed, new approaches, focused on targeting the host instead of the virus, as well as on marketed drug repurposing for new antiviral indications (3–5) have been recently proposed in the context of global health emergencies posed by Ebola (6) and Zika (7) viruses. Such innovative strategies are strongly supported by a shift of paradigms in drug discovery, from “one-drug-one-target” to “one-drug-multiple-targets” (8). In that sense, different *in silico* approaches based on structural bioinformatic studies (9, 10), systems biology approaches (11), and host gene expression analyses (12) have been applied to decipher multi-purpose effects of many US Food and Drug Administration (FDA)-approved drugs. Additionally, as successfully demonstrated in antiretroviral therapy (13), targeting host instead of viral determinants may confer a broad-spectrum antiviral efficacy, and also reduce the risk of emergence of drug resistance against influenza viruses (14). As a result, the last decade has witnessed several host-directed experimental approaches against influenza infections, notably nitazoxanide, DAS181 or acetylsalicylic acid (15–17).

In line with this emerging trend, we previously postulated that host global gene expression profiling can be considered as a “fingerprint” or signature of any specific cell state, including during infection or drug treatment, and hypothesized that the screening of databases for compounds that counteract virogenomic signatures could enable rapid identification of effective antivirals (18). Based on this previous proof-of-concept obtained from *in vitro* gene expression profiles, we further improved our strategy by analyzing paired upper respiratory tract clinical samples collected during the acute infection and

after recovery from a cohort of influenza A(H1N1)pdm09-infected patients and determined their respective transcriptomic signatures. We then performed an *in silico* drug screening using Connectivity Map (CMAP), the Broad Institute’s publicly available database of more than 7,000 drug-associated gene expression profiles (19, 20), and identified a list of candidate bioactive molecules with signatures anti-correlated with those of the patient’s acute infection state (Figure 1A). The potential antiviral properties of selected FDA-approved molecules were firstly validated *in vitro*, and the most effective compounds were further compared to oseltamivir for the treatment of influenza A(H1N1)pdm09 virus infections in both C57BL/6 mice and 3D reconstituted human airway epithelia. Altogether, our results highlight diltiazem, a calcium channel blocker with so far undescribed capacity to stimulate the epithelial antiviral defense, as a promising repurposed host-targeted inhibitor of influenza infection. Moreover, our results plead in favor of the combination of diltiazem with the virus-targeted antiviral oseltamivir for the improvement of current anti-influenza therapy, and possibly decreasing the risk of antiviral resistance. This study confirms the feasibility and interest of integrating clinical virogenomic and chemogenomic inputs as part of a drug repurposing strategy to accelerate bedside-to-bench and bench-to-bedside drug development.

## MATERIALS AND METHODS

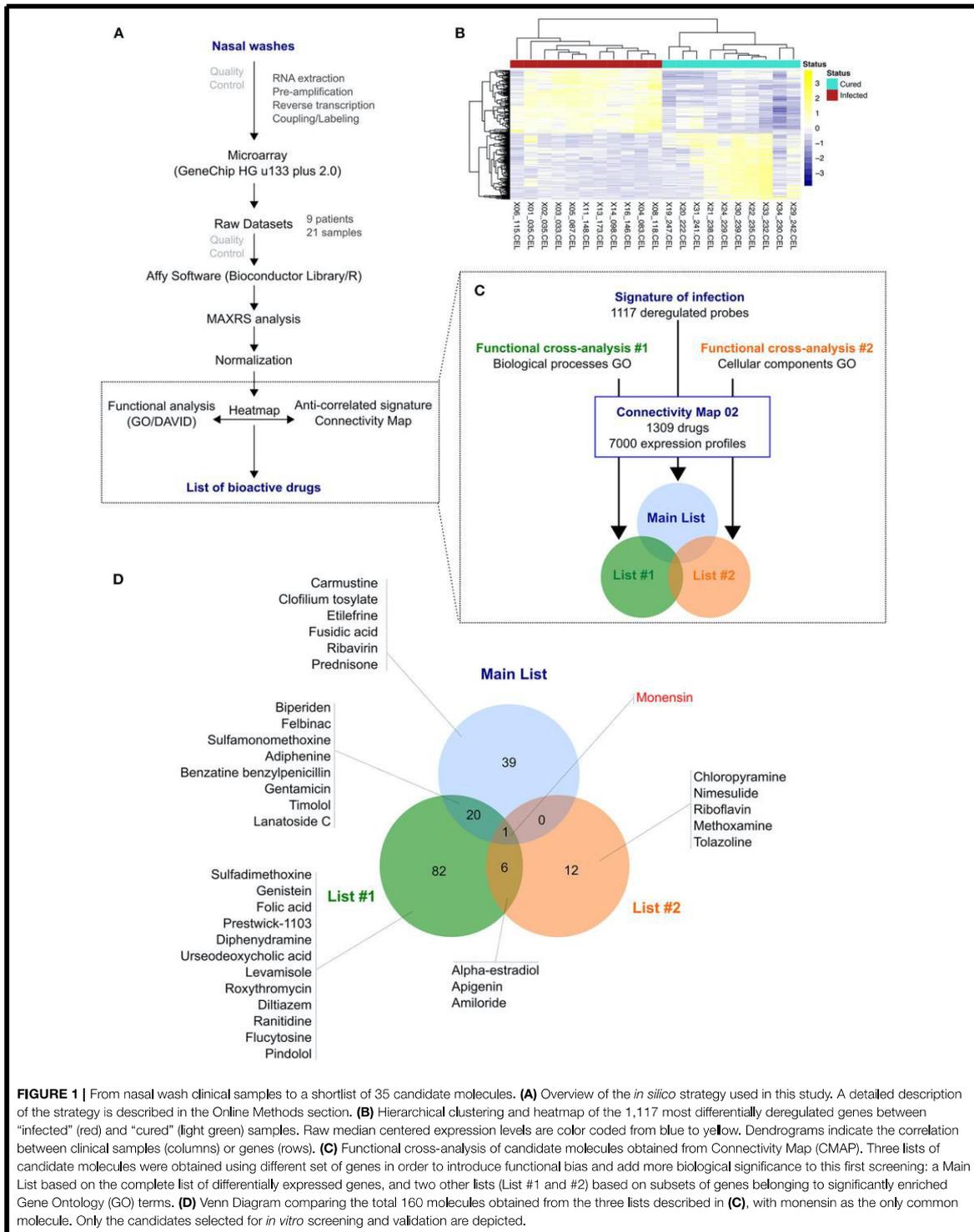
### Ethics Approval and Consent to Participate

Adult patients were recruited by general practitioners in the context of a previously published randomized clinical trial Escuret et al. (21) (ClinicalTrials.gov identifier NCT00830323) and all of them provided written informed consent. The study protocol was approved by the Lyon Ethics Committee (Comité de Protection des Personnes Lyon B) on September 9th, 2009 and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

All animal procedures were approved by the Institutional Animal Care Committee of the Center Hospitalier Universitaire de Québec (CPAC protocol authorization #2012-068-3) according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

### Clinical Samples

A previously published randomized clinical trial (ClinicalTrials.gov identifier NCT00830323) was conducted in Lyon and Paris (France) during the peak circulation of the influenza A(H1N1)pdm09 virus, with the aim to assess the efficacy of oseltamivir-zanamivir combination therapy compared with oseltamivir monotherapy (21). Briefly, patients tested positive for influenza A infection by the QuickVue rapid antigen kit (Quidel) were randomized in one of the two treatment



**FIGURE 1 |** From nasal wash clinical samples to a shortlist of 35 candidate molecules. **(A)** Overview of the *in silico* strategy used in this study. A detailed description of the strategy is described in the Online Methods section. **(B)** Hierarchical clustering and heatmap of the 1,117 most differentially deregulated genes between "infected" (red) and "cured" (light green) samples. Raw median centered expression levels are color coded from blue to yellow. Dendrograms indicate the correlation between clinical samples (columns) or genes (rows). **(C)** Functional cross-analysis of candidate molecules obtained from Connectivity Map (CMAP). Three lists of candidate molecules were obtained using different set of genes in order to introduce functional bias and add more biological significance to this first screening: a Main List based on the complete list of differentially expressed genes, and two other lists (List #1 and #2) based on subsets of genes belonging to significantly enriched Gene Ontology (GO) terms. **(D)** Venn Diagram comparing the total 160 molecules obtained from the three lists described in **(C)**, with monensin as the only common molecule. Only the candidates selected for *in vitro* screening and validation are depicted.

groups and nasal wash specimens were collected within 2 h of the first visit and every 24 h until 96 h after treatment initiation. Nasal swabs were also performed on days 5 and 7. In voluntary patients, an optional supplementary nasal wash was performed at least 3 months after influenza infection (recovery phase). H1N1 subtype was further confirmed by PCR. For nine of these patients, transcriptomic data were obtained from paired samples collected during influenza infection without treatment and in the recovery phase.

### Sample Processing, RNA Preparation and Hybridization

Nasal wash samples were collected in RNeasy<sup>®</sup> Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific). Total RNA was extracted using RNeasy Micro kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. RNA quality was assessed using a Bioanalyzer2100 (Agilent technologies, Inc, Palo Alto, CA, USA). To account for samples having low amount and/or partially degraded RNA (RNA Integrity Numbers between 1 and 8), we applied two types of corrections: (i) cRNA labeling was performed after a linear amplification protocol, as previously described (22) and (ii) raw signals obtained after hybridization of labeled cRNA on microarray and data acquisition were processed using the MAXRS algorithm (23). Labeled cRNA were hybridized on Affymetrix HG-U133plus2 microarrays according to manufacturer's instructions in a GeneChip<sup>®</sup> Hybridization Oven 640 (Affymetrix) and microarrays were subsequently scanned in an Affymetrix 3000 7G scanner.

### Data Normalization and MAXRS Computational Analysis

The MAXRS algorithm (23) is particularly suited to gene expression analysis under low hybridization conditions. Briefly, this method takes advantage of the specific design of Affymetrix probe sets, which are composed of an average of 11 different probes that target the same locus, and is based on the observation that for most of the probe sets the same probe shows the highest fluorescence intensity in almost all arrays. For each microarray ( $m = 1..M$ ) and for each probeset ( $t = 1..T$ ), fluorescence intensity values on microarray  $m$  of all probes ( $p = 1..P_t$ ) belonging to the probeset  $t$  are sorted in increasing order. These ranks are denoted as  $r_{mtp}$ . Then, we calculated across all microarrays the rank sum ( $RS_{tp}$ ) for each probeset  $t$  for each probe  $p$  belonging to the probeset  $t$ . Finally, for each probeset  $t$ , we kept the three probes  $p$  with the highest  $RS_{tp}$ . The mean intensity of these three probes is attributed to the probeset  $t$ . As it is common practice with many modern pre-processing algorithms, and because of the low global fluorescence signal intensity, mismatched probes were excluded from MAXRS analysis.

After pre-processing the raw dataset with the MAXRS algorithm, a normalization step was performed using Tukey median-polish algorithm (24). Differential expression was assessed by applying a Student  $t$ -test for each probeset, and multiple testing was corrected using the Benjamini-Hochberg algorithm in the  $q$ value library (25). For further downstream

analysis, genes were selected according to two criteria: (i) absolute fold change  $>2$ , and (ii) corrected  $p$ -value  $< 0.05$ . Data were generated according to the Minimum Information About a Microarray Experiment guidelines and deposited in the National Center for Biotechnology Information's Gene Expression Omnibus (GEO) (26) under accession number GSE93731.

### Functional Analysis

Functional enrichment analysis was performed on a selection of differentially-expressed genes with DAVID tools (27), using the Gene Ontology (GO) (28). To further select genes for the CMAP query, we selected 6 Biological Process (BP) terms (GO\_BP: GO:0009615-response to virus; GO:0006955-immune response; GO:0042981-regulation of apoptosis; GO:0006952-defense response; GO:0009611-response to wounding; GO:0042127-regulation of cell proliferation) that shared  $>90\%$  of genes with all significantly enriched GO\_BP terms, and 3 relevant Cellular Component terms (GO\_CC: GO:0031225-anchored to membrane; GO:0005829-cytosol; GO:0005654-nucleoplasm). To visualize and compare the different lists of compounds, Venn diagrams were obtained using the webtool developed by Dr. Van de Peer's Lab at Ghent University (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

### Cells and Viruses

Human lung epithelial A549 cells (ATCC CCL-185) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% foetal calf serum and supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma Aldrich), penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100  $\mu$ g/mL) (Lonza), maintained at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. MucilAir<sup>®</sup> human airway epithelia (HAE) were obtained from Epithelix SARL (Geneva, Switzerland) and maintained in air-liquid interphase with specific MucilAir<sup>®</sup> Culture Medium in Costar Transwell inserts (Corning, NY, USA) according to the manufacturer's instructions.

Influenza viruses A/Lyon/969/09 and A/Quebec/144147/09 were produced in MDCK (ATCC CCL-34) cells in EMEM supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma Aldrich), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100  $\mu$ g/mL) (Lonza) and 1  $\mu$ g/mL trypsin. Viral titers in plaque forming units (PFU/ml) and tissue culture infectious dose 50% (TCID50/mL) were determined in MDCK cells as previously described (29, 30).

### Viral Growth Assays

For viral growth assays in the presence of molecules, A549 cells were seeded 24 h in advance in multi-well 6 plates at  $1.8 \times 10^5$  cells/well. Three treatment protocols were evaluated. (1) In pre-treatment protocol, cells were washed with DMEM and then incubated with different concentrations of candidate molecules diluted in DMEM supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma Aldrich), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100  $\mu$ g/mL) (Lonza) and 0.5  $\mu$ g/mL trypsin. Six hours after treatment, cells were washed and then infected with A/Lyon/969/09 (H1N1)pdm09 virus at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1. (2) In pre-treatment plus post-treatment protocol, cells were initially treated and infected in the same conditions as explained

above. One hour after viral infection, a second identical dose of candidate molecules in supplemented DMEM was added. (3) In post-treatment protocol, cells without pre-treatment were infected in the conditions described and treatments with candidate molecules at the indicated concentrations were initiated 24 h p.i. In all cases, supernatants were collected at 48 h p.i. and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for TCID<sub>50</sub>/ml viral titration.

### Viability and Cytotoxicity Assays

Cell viability was measured using the CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS, Promega). A549 cells were seeded into 96-well plates and treated with different concentrations of molecules or solvents. Cells were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  and 5% CO<sub>2</sub> and then harvested at different time-points, following the same scheme as in viral growth assays. Results were presented as a ratio of control values obtained with solvents. Treatment-related toxicity in HAE was measured using the Cytotoxicity Detection Kit<sup>PLUS</sup> (LDH, Roche) according to the manufacturer's instructions. Briefly, duplicate 100  $\mu\text{L}$ -aliquots of basolateral medium from treated and control HAEs were incubated in the dark (room temperature, 30 min) with 100  $\mu\text{L}$  of lactate dehydrogenase (LDH) reagent in 96-well plates. After incubation, "stop solution" was added and the absorbance was measured in a conventional microplate ELISA reader. The photometer was set up for dual readings to determine non-specific background at 750 nm, and absorbance was measured at 490 nm. Percent cytotoxicity was calculated as indicated by the manufacturer, using mock-treated and 1% triton-treated epithelia as "low" and "high" controls, respectively. Percent viability is presented as 100-percent cytotoxicity.

### Mouse Model of Viral Infection

All protocols were carried out in seven to 9-weeks old female C57BL/6N mice (Charles River, QC, Canada). Animals were randomized in groups of 15 according to their weight to ensure comparable median values on each group, and then housed in micro-isolator cages (5 animals per cage) in a biosafety 2 controlled environment ( $22^{\circ}\text{C}$ , 40% humidity, 12:12 h photoperiods), with *ad libitum* access to food and water.

On day 0, mice were lightly anesthetized with inhaled 3% isoflurane/oxygen, and then infected by intranasal (i.n.) instillation of influenza A/Quebec/144147/09 (H1N1)pdm09 virus in 30  $\mu\text{l}$  of saline, as specified in each case. Control animals were mock-infected with 30  $\mu\text{l}$  of saline. Candidate molecules were evaluated in two different treatment protocols: (i) treatments were started on the same day of infection (day 0, 6 h prior to infection), or (ii) treatments were started 24 h after infection (day 1). Regardless of treatment initiation time, all treatments were performed *per os* (150- $\mu\text{l}$  gavage) once daily for 5 consecutive days (5 drug administrations in total). Mortality, body weight and clinical signs such as lethargy and ruffled fur were daily monitored on 10 animals/group for a total of 14 days. Animals were euthanized if they reached the humane endpoint of >20% weight loss. The remaining 5 animals/group were euthanized on day 5 p.i. to measure lung viral titers (LVTs).

Vehicle (saline) or oseltamivir were used as placebo and positive treatment control, respectively. The oseltamivir dose

(10 mg/kg/day) was adjusted to confer  $\sim 50\%$  protection in the selected experimental conditions and is considered a good correlate of half the normal dose of 150 mg/day given to humans (31). The doses of repurposed candidate molecules were selected to be in the non-toxic range for mouse studies, according to published preclinical data for their first therapeutic indication. To validate this choice in our specific model, potential drug toxicity was evaluated in mock-infected animals treated with the same regimens as virus-infected mice.

### Pulmonary Viral Titers

In order to evaluate the effect of different treatments on viral replication, 5 animals per group were euthanized on day 5 p.i. and lungs were removed aseptically. Mice were randomly selected from the 3 cages of each group to minimize cage-related bias. Lungs were homogenized in 1 ml of PBS using a bead mill homogenizer (Tissue Lyser, Qiagen) and debris was pelleted by centrifugation (2,000 g, 5 min). Triplicate 10-fold serial dilutions of each supernatant were plated on ST6GalIMDCK cells (kindly provided by Dr. Y. Kawaoka, University of Wisconsin, Madison, WI) and titrated by plaque assays (29). The investigator was blinded to group allocation.

### Viral Infection in Reconstituted Human Airway Epithelium (HAE)

For HAE infection experiments, apical poles were gently washed with warm PBS and then infected with a 100- $\mu\text{L}$  dilution of influenza A/Lyon/969/09 (H1N1)pdm09 virus in OptiMEM medium (Gibco, ThermoFisher Scientific) at a MOI of 0.1. Basolateral pole sampling as well as 150- $\mu\text{L}$  OptiMEM apical washes were performed at the indicated time points, and then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for PFU/mL and TCID<sub>50</sub>/mL viral titration. Treatments with specific dilutions of candidate molecules alone or combined with oseltamivir in MucilAir<sup>®</sup> Culture Medium were applied through basolateral poles. Control HAE were mock-treated in the same conditions with MucilAir<sup>®</sup> Culture Medium without molecules. All treatments were initiated on day 0 (5 h after viral infection) and continued once daily for 5 consecutive days (5 drug administrations in total). Variations in transepithelial electrical resistance ( $\Delta$  TEER) were measured using a dedicated volt-ohm meter (EVOM2, Epithelial Volt/Ohm Meter for TEER) and expressed as Ohm/cm<sup>2</sup>.

### High Throughput Sequencing and Bioinformatics Analysis

cDNA libraries were prepared from 200 ng of total RNA using the Scriptseq<sup>™</sup> complete Gold kit-Low Input (SCL6EP, Epicenter), according to manufacturer's instructions. Each cDNA library was amplified and indexed with primers provided in the ScriptSeq<sup>™</sup> Index PCR Primers kit (RSBC10948, Epicenter) and then sequenced as 100 bp paired-end reads. Prior to sequencing, libraries were quantified with QuBit and Bioanalyzer2100, and indexed libraries were pooled in equimolar concentrations. Sequencing was performed on an Illumina HiSeq 2500 system (Illumina, Carlsbad, CA), with a required minimum of 40 million reads sequenced per sample. Conversion and demultiplexing of reads was performed using bcl2fastq 1.8.4

(Illumina). The FastQC software (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) was used for quality controls of the raw data. Reads were trimmed using the Trimmomatic (32) software, with a minimum quality threshold of Q30. Trimmed reads were pseudo-aligned to the *Homo sapiens* genome (GRCh38.p11) using the Kallisto software (33). Statistical analysis was performed in R3.3.1 with the package EdgeR 3.14.0 (34). Differential expression was calculated by comparing each condition to the mock using a linear model. The Benjamini-Hochberg procedure was used to control the false discovery rate (FDR). Transcripts with an absolute fold change >2 and a corrected *p*-value < 0.05 were considered to be differentially expressed. Enriched pathways and GO terms were assessed with DAVID 6.8 (27). For visualization purposes, a heatmap and stacked barplots were constructed in R3.3.1 on mean-weighted fold changes and association between conditions were assessed by Spearman correlation analysis.

### Statistical Analysis

All experimental assays were performed in duplicate at a minimum, and representative results are shown unless indicated otherwise. No statistical methods were used to predetermine sample size in animal studies, which were estimated according to previous studies and the known variability of the assays. No mice were excluded from post-protocol analyses, the experimental unit was an individual animal and equal variance was assumed. Kaplan-Meier survival plots were compared by Log-Rank (Mantel-Cox) test and hazard ratios (HR) were computed by the Mantel-Haenszel method. Weight loss and viral titers of all groups were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparison post-test. The testing level ( $\alpha$ ) was 0.05. Statistical analyses were performed on all available data, using GraphPad, Prism 7.

## RESULTS

### Generation of Clinical Virogenomic Profiles

We determined *in vivo* transcriptional signatures of infection from paired nasal wash samples of nine untreated patients, collected during acute A(H1N1)pdm09 pandemic influenza infection ("infected") and at least 3 months later to ensure a recovery non-infected state ("cured") (21). The nine patients from whom transcriptomic data could be obtained constitute a representative sample of the whole studied cohort, except for the male sex ratio (Table S1). We combined two strategies to tackle the characteristic low RNA amount/quality of this type of clinical samples. Firstly, cRNA labeling was performed after a linear amplification of initial RNA, as previously described (35). Secondly, raw signals obtained after hybridization of labeled cRNA on microarray and data acquisition were processed using the MAXRS algorithm (23) to overcome low hybridization conditions. This approach, initially developed for the analysis of heterologous hybridizations, takes advantage of the specific design of the Affymetrix<sup>®</sup> microarray used in our study, with several probes targeting the same locus (23).

After normalization, differentially expressed genes were selected based on two criteria: (i) an absolute fold change

>2, and (ii) a Benjamini-Hochberg corrected *p*-value < 0.05. We therefore identified a total of 1,117 commonly deregulated probes, with almost equal proportion of up-regulated (48.4%; *n* = 541) and down-regulated probes (51.7%; *n* = 576). Remarkably, despite considerable inter-patient variability among recovery state samples, a substantial homogenization of transcriptional profiles was observed in the context of infection, as shown in the heatmap presented in Figure 1B and by the median Spearman's  $\rho$  correlation values for both groups (0.60 "cured" vs. 0.90 "infected"). These virogenomic signatures of infection constituted the input for the subsequent *in silico* query for the identification of candidate compounds.

### *In silico* Cross-Analysis of Chemogenomic vs. Virogenomic Clinical Profiles

We then performed an *in-silico* search for molecules that reverse the virogenomic signature of infection, using the CMAP database (Build 02) as previously described (18). CMAP is a collection of genome-wide transcriptional expression data from cultured human cells treated with bioactive small molecules. HG-U133plus2 probesets were mapped to the U133A probesets using the Ensembl BioMarts online tool (36, 37), and connectivity scores and *p*-values were obtained using the CMAP algorithm (19, 20). With the global set of 1,000 most differentially expressed genes as input (Figure 1C, Main List), we obtained a preliminary list of 60 candidate compounds. In parallel, we used two other subsets of genes belonging to significantly enriched Gene Ontology (GO) terms obtained from microarray analyses to introduce functional bias and add more biological significance to our first screening. Hence, by using 6 Biological Process terms (GO\_BP) that shared more than 90% of genes (Figure 1C, Functional cross-analysis #1), a second list of 109 compound candidates was obtained. A third list of 19 compounds was obtained using 3 relevant Cellular Component terms (GO\_CC) (Figure 1C, Functional cross-analysis #2). The comparison of the 160 compounds from the three distinct lists (12.2% of compounds of CMAP, Table S2) highlighted monensin as the only common compound (Figure 1D).

To rationally reduce the number of drug candidates, bioactive drugs were excluded if not compatible with a final use as antiviral, mostly for safety (e.g., teratogens, intercalating agents), and/or pharmacological (e.g., documented low bioavailability) reasons, based on clinical data and the PubMed/PubChem databases. Thus, the number of candidates was initially decreased to 139 and then to 110 (Figure S1). We subsequently determined a shortlist of 35 bioactive molecules (<3% of CMAP, Table 1) for *in vitro* screening, based on two main criteria: (i) molecules representative of the different pharmacological classes identified, and (ii) molecules evenly distributed in the three lists obtained after *in silico* screening (Main List, List #1 and List #2, Figure 1D), which comprise a panoply of documented pharmacological classes, including anti-fungal agents (e.g., monensin, flucytosine), anti-inflammatory agents (e.g., felbinac, apigenin, prednisone) and adrenergic agonists/antagonists (timolol, methoxamine,

**TABLE 1** | Shortlist of the 35 selected molecules and their documented pharmacological classes.

| Name                                     | Pharmacological class  |
|--|--|
| Adiphenine                               | Parasympatholytics/Anticholinergics/Antispasmodics   |
| Alpha-estradiol*                         | 5 alpha-reductase inhibitors/Androgenic alopecia treatment   |
| Amiloride <sup>#</sup>                   | Epithelial Sodium Channel Blockers/Diuretics/Acid Sensing Ion Channel Blockers                       |
| Apigenin <sup>#</sup>                    | Anti-Inflammatory Agents, Non-steroidal/?  |
| Benzathine benzylpenicillin <sup>#</sup> | Anti-Bacterial Agents  |
| Biperiden*                               | Antiparkinson Agents/Muscarinic Antagonists/Parasympatholytics                                       |
| Carmustine                               | Antineoplastic Agents, Alkylating  |
| Chloropyramine                           | Histamine H1 Antagonists   |
| Clofilium tosylate                       | Anti-Arrhythmia Agents   |
| Diltiazem                                | Antihypertensive Agents/Calcium Channel Blockers/Cardiovascular Agents/Vasodilator Agents            |
| Diphenhydramine                          | Anesthetics, Local/Anti-Allergic Agents/Antiemetics/Histamine H1 Antagonists/Hypnotics and Sedatives |
| Etilefrine                               | Adrenergic beta-1 and alpha agonist/Cardiotonic/antihypertensive agent.                              |
| Felbinac <sup>#</sup>                    | Anti-Inflammatory Agents, Non-steroidal  |
| Flucytosine <sup>#</sup>                 | Antifungal Agents/Antimetabolites  |
| Folic acid                               | Hematinics/Vitamin B Complex   |
| Fusidic acid <sup>#</sup>                | Anti-Bacterial Agents/Protein Synthesis Inhibitors   |
| Genistein                                | Anticarcinogenic Agents/Phytoestrogens/Protein Kinase Inhibitors                                     |
| Gentamicin <sup>#</sup>                  | Anti-Bacterial Agents/Protein Synthesis Inhibitors   |
| Lanatoside C                             | Anti-Arrhythmia Agents   |
| Levamisole*                              | Adjuvants, Immunologic/Antinematodal Agents/Antirheumatic Agents                                     |
| Methoxamine                              | Adrenergic alpha-1 Receptor Agonists/Sympathomimetics/Vasoconstrictor Agents                         |
| Monensin <sup>#</sup>                    | Antifungal Agents/Antiprotozoal Agents/Coccidiostats/Proton Ionophores/Sodium Ionophores             |
| Nimesulide <sup>#</sup>                  | Anti-Inflammatory Agents, Non-steroidal/Cyclooxygenase Inhibitors                                    |
| Pindolol                                 | Adrenergic beta-Antagonists/Antihypertensive Agents/Serotonin Antagonists/Vasodilator Agents         |
| Prednisone <sup>#</sup>                  | Anti-Inflammatory Agents/Antineoplastic Agents, Hormonal/Glucocorticoids                             |
| Prestwick-1103 <sup>#</sup>              | Anti-Inflammatory Agents, Non-steroidal/Cyclooxygenase Inhibitors                                    |
| Ranitidine                               | Anti-Ulcer Agents/Histamine H2 Antagonists   |
| Ribavirin*                               | Antimetabolites/Antiviral Agents   |
| Riboflavin*                              | Photosensitizing Agents/Vitamin B Complex  |
| Roxithromycin <sup>#</sup>               | Anti-Bacterial Agents  |
| Sulfadimethoxine <sup>#</sup>            | Anti-Infective Agents  |
| Sulfamonomethoxine <sup>#</sup>          | Anti-Infective Agents  |
| Timolol*                                 | Adrenergic beta-Antagonists/Anti-Arrhythmia Agents/Antihypertensive Agents                           |
| Tolazoline                               | Adrenergic alpha-Antagonists/Antihypertensive Agents/Vasodilator Agents                              |
| Ursodeoxycholic acid                     | Cholagogues and Choloretics  |

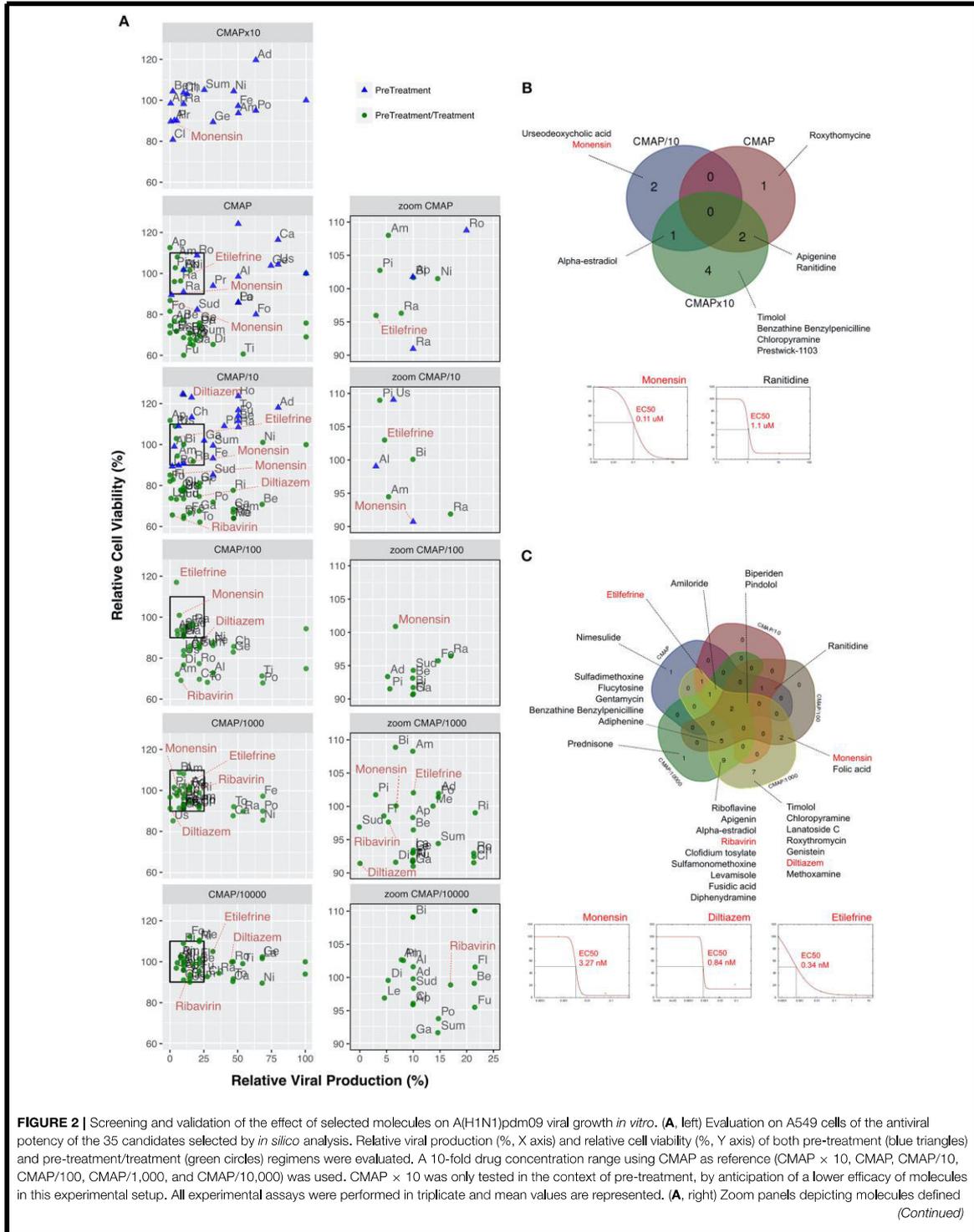
Shortlist of the 35 selected candidates representative of the 110 molecules obtained from the *in silico* screening (Figure 1 and Figure S1). Documented pharmacological classes were obtained from PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). (\*) indicate molecules previously evaluated for their antiviral properties according to the literature, and numerals (#) those belonging to anti-microbial or anti-inflammatory related pharmacological classes.

tolazoline), as represented in the Venn diagram (Figure 1D, Table 1). Interestingly, at least 14 (40%) molecules from our short-list belong to a pharmacological class related with anti-microbial or anti-inflammatory activities (Table 1, #), and 11 (31.4%) have already been reported in the literature for their antiviral properties against influenza or other viruses (Table 1, \*), notably the nucleoside inhibitor ribavirin (38, 39) and the ionophore monensin (40).

### Inhibitory Effect of the Selected Molecules on A(H1N1)pdm09 Viral Growth *in vitro*

*In vitro* screening of the antiviral potency of the 35 selected molecules was performed in A549 human lung epithelial cells

seeded in 6-well plates. Firstly, we evaluated the impact of 6 h pre-treatment with a 10-fold drug concentration range, using the original CMAP concentration as reference. Six hours after treatment, cells were washed and infected with influenza A(H1N1)pdm09 virus at a MOI of 0.1. Viral titers in supernatants collected from treated samples at 48 h post infection (p.i.) were normalized with those measured in mock-treated controls ( $> 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL). Potential treatment-induced cell toxicity was evaluated in the same experimental conditions using the MTS assay and expressed also as the percentage of cell viability compared to non-infected controls (Figure 2). Based on antiviral activity and cell viability profiles obtained (Figure 2A, blue triangles), we defined as “inhibitors”



**FIGURE 2** | as “inhibitors” according to the following two criteria: (i) induce a 75% or higher reduction on viral production, and (ii) have minor impact on cell viability, with relative values in the 90–110% range. For clarity purposes, with the exception of diltiazem, etilefrine, monensin, and ribavirin. Ad, Adiphenine; Al, Alpha-estradiol; Am, Amiloride; Ap, Apigenin; Be, Benzathine Benzylpenicilline; Bi, Biperiden; Ca, Carmustine; Ch, Chloropyramine; Cl, Clofidium tosylate; Di, Diphenhydramine; Fe, Felbinac; Fl, Flucytosine; Fo, Folic acid; Fu, Fusidic acid; Ge, Genistein; Ga, Gentamycin; La, Lanatoside C; Le, Levamisole; Me, Methoxamine; Ni, Nimesulide; Pi, Pindolol; Po, Prednisone; Pr, Prestwick-1103; Ra, Ranitidine; Ri, Riboflavine; Ro, Roxythromycin; Sud, Sulfadimethoxine; Sum, Sulfamonomethoxine; Ti, Timolol; To, Tolazoline; Us, Urseodeoxycholic acid. Dose-response curves for all the 35 molecules are presented in **Table S3**. **(B)** Venn diagram of the 10 molecules identified in pre-treatment (10/35; 28.57%) and matching the “inhibitor” criteria, mainly when used at 10-fold CMAP concentration. EC50 curves for monensin and ranitidine are represented. **(C)** Venn diagram of the 30 “inhibitor” molecules identified in pre-treatment/treatment (30/35; 85.7%). EC50 curves for monensin, diltiazem, and etilefrine are represented.

compounds that fulfilled the following two criteria: (i) induce >75% reduction on viral production, and (ii) have minor impact on cell viability, with relative values in the 90–110% range (**Figure 2A**, squares in left panels and zooms in right panels). A total of 10 compounds (28.6%) matched both criteria, mainly when used at a 10-fold CMAP concentration (**Figure 2B**), yet only a limited number of them exhibited classic dose-dependent inhibition. Whenever possible, as in the case of monensin or ranitidine for example, EC50 values were calculated, which were mostly in the micromolar range (**Figure 2B**).

In a second round of screening, we tested the same 6 h pre-treatment but with serial 10-fold dilutions from the initial CMAP concentration to CMAP/10,000, followed by one additional treatment immediately after infection (**Figure 2A**, green circles in left and right panels). In these conditions, 30 compounds (85.7%) met our criteria to be considered as inhibitors of viral production (**Figure 2C**), with half of them showing a classic dose-dependent inhibition effect. Calculated EC50 values were in the nanomolar range and hence significantly lower than those calculated in the context of pre-treatment only. Dose response curves and calculated EC50 for all the 35 compounds are presented in **Figure S2** and **Table S3**, respectively.

### Efficacy of Selected Molecules for the Treatment of Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Infection in Mice

Based on EC50 and cytotoxicity data from the *in vitro* screening, we selected 8 molecules to investigate their potential as inhibitors of influenza A(H1N1)pdm09 in C57BL/6 mice. Oseltamivir, the standard antiviral for the treatment of influenza infections was used as control. All treatments were performed *per os*, starting 6 h before infection and being continued once daily for 5 consecutive days (5 drug administrations in total) (**Figure 3**). While animals treated with oseltamivir or monensin showed clinical improvement compared to the saline (placebo) group in terms of survival and weight loss (oseltamivir only), treatment with Lanatoside C, prednisolone, flucytosine, felbinac, and timolol showed no clinical benefit at the selected concentrations (**Figure S3A**). In contrast, diltiazem and etilefrine not only significantly improved survival and maximum mean weight losses (**Figures 3A,B**), but also showed at least 1-log reductions in LVTs on day 5 p.i. (**Figure 3C**). Importantly, no signs of toxicity were

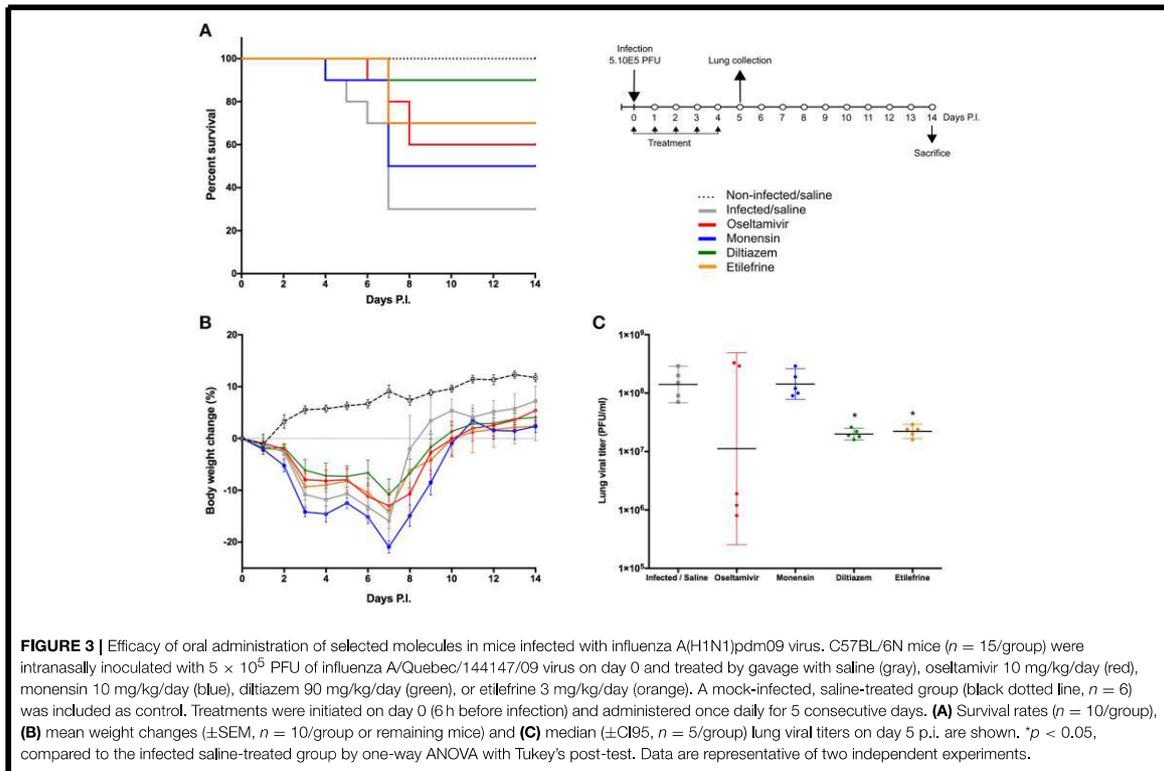
observed for any of the drugs at the regimens tested (**Figure S3B**).

### Diltiazem Retains Its *in vivo* Efficacy When Administered 24 h After Viral Infection

To best mimic the therapeutic setting, we next evaluated the efficacy of the same 5-day oral regimen with diltiazem or etilefrine but when initiated 24 h after viral infection (**Figure 4**). As with oseltamivir and monensin, diltiazem treatment completely prevented mortality and reduced weight loss in influenza A(H1N1)pdm09 infected mice, which otherwise showed only 50% (5/10) survival for the etilefrine and saline groups (**Figures 4A,B**). Interestingly, 1- to 1.5-log reductions in LVTs compared to the saline group were observed at day 5 in groups of mice treated with diltiazem or etilefrine (**Figure 4C**). We then used a more stringent approach by increasing the viral inoculum to evaluate the same delayed (24 h post infection) 5-day diltiazem regimen in the context of a 100% lethal A(H1N1)pdm09 infection (**Figures 4D–F**). Whereas, treatment with oseltamivir and diltiazem successfully rescued 40% (4/10) and 20% (2/10) of mice, respectively, half-dose treatment with diltiazem (45 mg/kg) rescued 30% (3/10) of mice from death, also showing significant improvement in mean weight loss (**Figures 4D,E**). Calculated hazard ratios (HR) for the saline group compared to these three treatment groups were 8.41 (CI95: 1.65–43.02), 2.85 (0.56–14.47), and 7.62 (1.49–38.96), respectively. Noteworthy, LVTs at day 5 p.i. were comparable among all treated and untreated groups (**Figure 4F**), suggesting mainly a protective effect of diltiazem toward severe influenza infection rather than a direct role in decreasing viral production.

### Diltiazem Significantly Reduces Viral Replication in Infected Reconstituted Human Airway Epithelia (HAE)

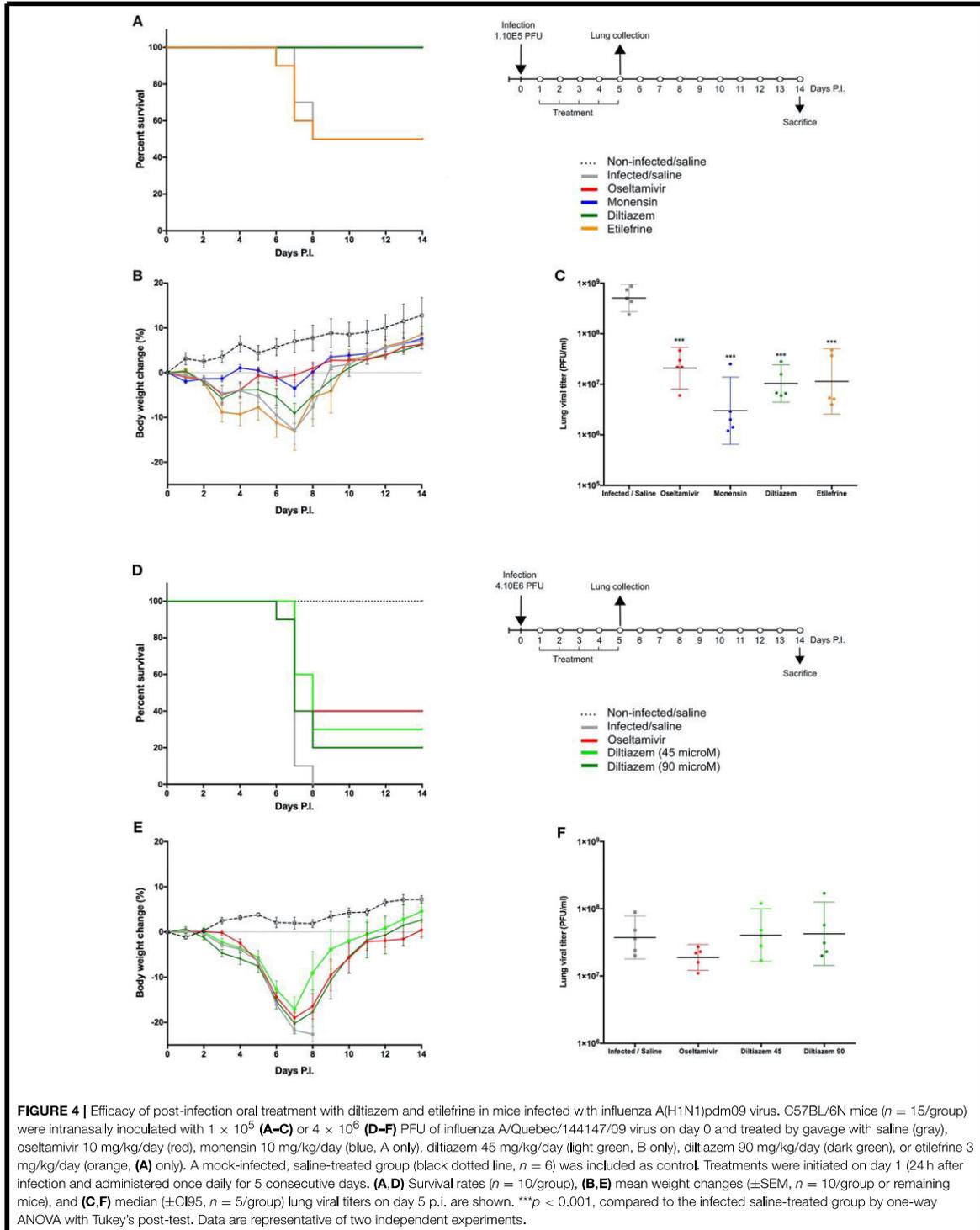
To further complement *in vivo* data, we characterized the inhibitory properties of diltiazem using a biologically relevant reconstituted airway epithelium model, derived from human primary bronchial cells (MucilAir<sup>®</sup>, Epithelix). HAE were infected with influenza A(H1N1)pdm09 at a MOI of 0.1, and treatments on the basolateral medium were initiated 5 h p.i. and continued once daily for 5 consecutive days. Viral replication at the apical surface of mock-treated (MucilAir<sup>®</sup> Culture Medium without molecules) HAE peaked at 48 h p.i. ( $\sim 1 \times 10^8$  PFU/ml) and was detectable at important levels for at least 7 days. As expected, trans-epithelial electrical resistance (TEER) values, measuring tight junction and cell

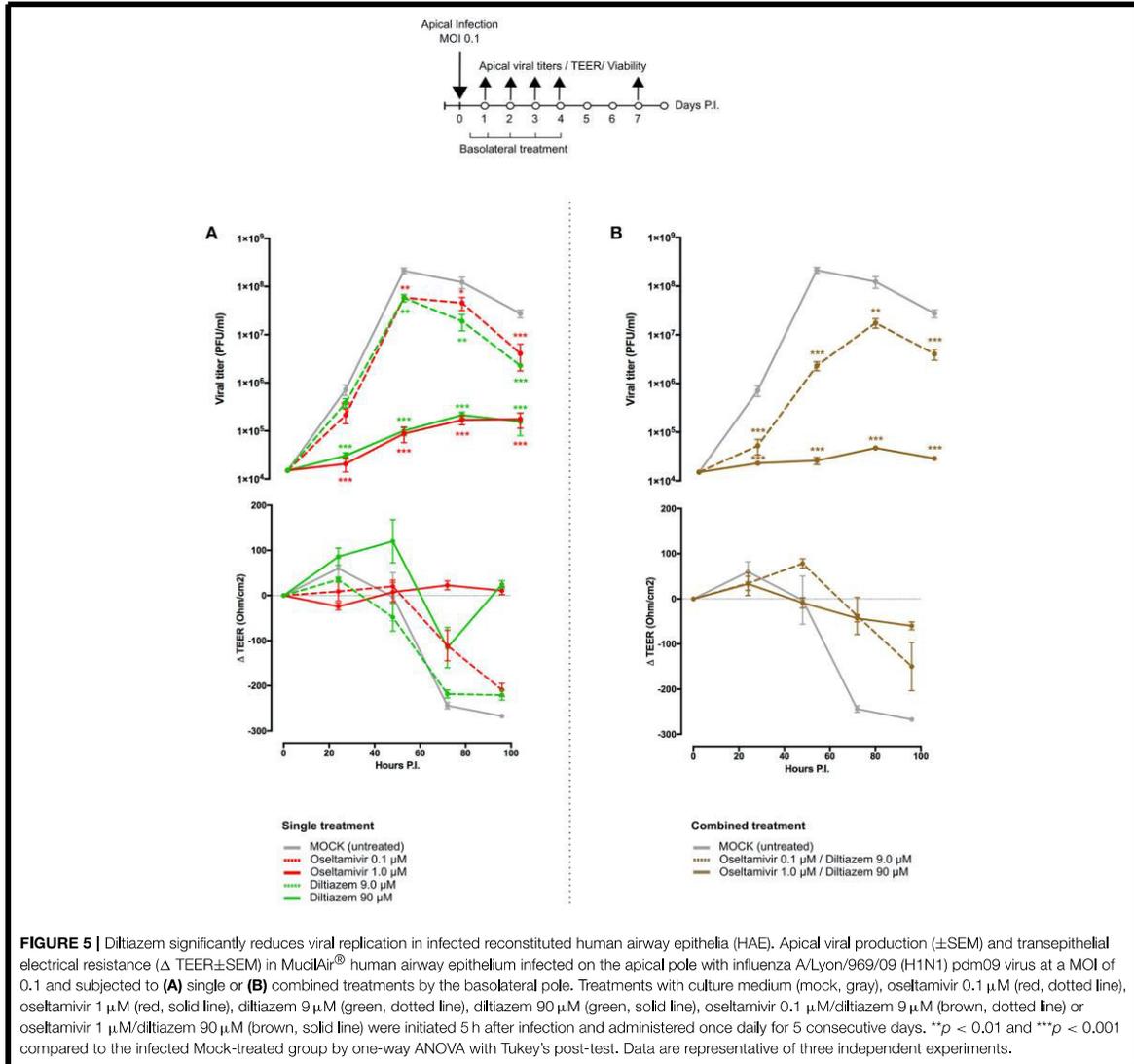


layer integrity, sharply decreased and bottomed out at 72 h p.i. in the untreated control, correlating with the first virus detection on the basolateral medium (Figure 5A and Table S6). A similar pattern was observed in infected HAE treated with oseltamivir 0.1  $\mu\text{M}$  or diltiazem 9  $\mu\text{M}$  (CMAP), which conferred no significant advantage over the untreated control. Conversely, oseltamivir 1  $\mu\text{M}$  and diltiazem 90  $\mu\text{M}$  treatments (10-fold CMAP) strongly inhibited viral replication, delaying the peak of viral production by 24 h. Both treatments induced  $>3$ -log reductions in apical viral titers at 48 h p.i. compared to the untreated control, and  $>2$ -log reductions when comparing peak titers (48 h p.i. untreated vs. 72 h p.i. treated). Moreover, whereas oseltamivir treatment stabilized TEER during the time-course of infection, diltiazem treatment partially buffered the TEER decrease observed in the untreated control (Figure 5A and Table S6). No virus was detected on the basolateral medium for these two treated groups, and absence of treatment-induced toxicity was confirmed by measuring the release of intracellular lactate dehydrogenase (LDH). Interestingly, we observed that inhibitory and protective properties demonstrated by diltiazem were progressively reversible when basolateral medium was replaced with fresh medium without drugs. Overall, these results are in accordance and strongly support the inhibitory and protective effects of diltiazem observed *in vitro* and in mice, respectively.

### Diltiazem-Oseltamivir Combination Confers Improved Efficacy When Compared to Monotherapy in Infected HAE

We anticipated that the combination of two antiviral compounds that target different viral/cellular determinants could induce better virological and physiological responses when compared to antiviral monotherapy. We therefore evaluated the diltiazem-oseltamivir combination in the same conditions described above, notably a 5-day treatment course with treatment initiation at 5 h p.i. The diltiazem 90  $\mu\text{M}$ /oseltamivir 1  $\mu\text{M}$  combination conferred  $>3$ -log reduction in apical peak viral titers when compared to the untreated control, even greater than that observed with same dose monotherapy. TEER values remained stable during combined treatment, comparable to those observed with oseltamivir 1  $\mu\text{M}$  monotherapy (Figure 5B and Table S6). Remarkably, although not effective as monotherapy in the low concentrations tested above, the diltiazem 9  $\mu\text{M}$ /oseltamivir 0.1  $\mu\text{M}$  combination contrariwise delayed the peak of viral production, significantly reduced apical viral titers, and slightly buffered TEER values compared to the untreated control (Figure 5B and Table S6). Once again, no treatment-related toxicity was observed for any of the combinations tested. These results plead in favor of the potential of diltiazem for the improvement of current anti-influenza therapy with neuraminidase inhibitors.

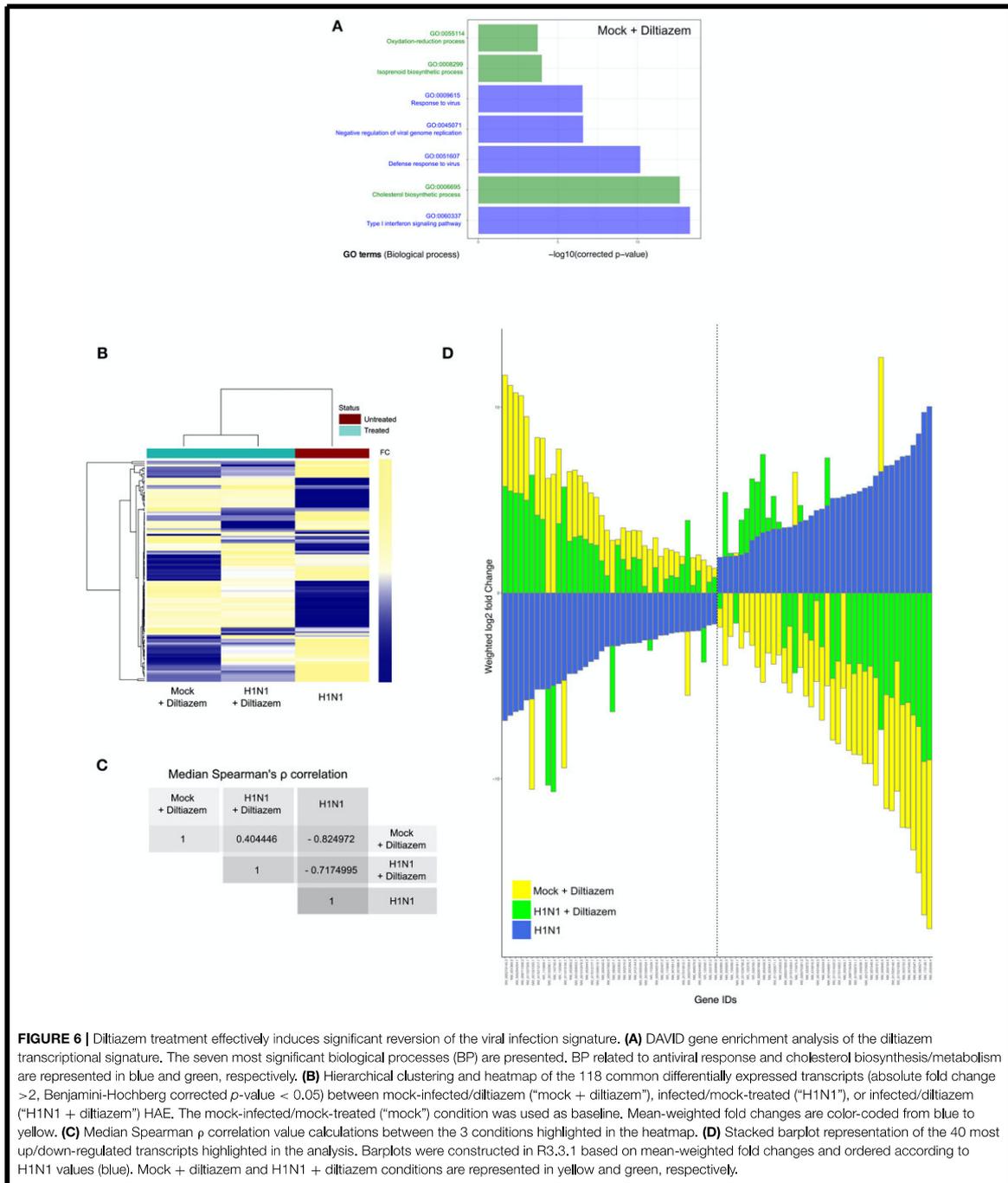




### Diltiazem Treatment Induces a Significant Reversion of the Viral Infection Signature

Since the rationale behind our approach relies on attaining antiviral activity through a drug-induced global and multi-level inversion of the infection signature, we advantageously used the MucilAir<sup>®</sup> HAE model coupled with high-throughput sequencing in order to characterize and compare the specific transcriptional signatures induced by infection and/or diltiazem treatment (Figure 6 and Figure S4). HAE were mock-infected or infected with influenza A(H1N1)pdm09 virus and then mock-treated or treated in the same experimental conditions in which the antiviral effect of diltiazem has been previously validated (MOI of 0.1, 90  $\mu$ M diltiazem). At 72 h p.i., cells

were lysed and total RNA was extracted. cDNA libraries were then produced, amplified, and subjected to high-throughput sequencing. Taking the mock-infected / mock-treated ("mock") as baseline, we initially performed DAVID functional gene enrichment (absolute fold change  $> 2$ , Benjamini-Hochberg corrected  $p < 0.05$ ) on the specific transcriptional signature of diltiazem with the objective of gaining insight on the putative host pathways involved in its antiviral effect. The lists of up-regulated ( $n = 194$ ) and down-regulated ( $n = 110$ ) transcripts in the mock-infected/diltiazem ("mock + diltiazem") condition were analyzed using DAVID 6.8 to highlight associations with specific GO terms. Although no enriched BP was identified among down-regulated transcripts, the list of up-regulated



**FIGURE 6 |** Diltiazem treatment effectively induces significant reversion of the viral infection signature. **(A)** DAVID gene enrichment analysis of the diltiazem transcriptional signature. The seven most significant biological processes (BP) are presented. BP related to antiviral response and cholesterol biosynthesis/metabolism are represented in blue and green, respectively. **(B)** Hierarchical clustering and heatmap of the 118 common differentially expressed transcripts (absolute fold change  $>2$ , Benjamini-Hochberg corrected  $p$ -value  $< 0.05$ ) between mock-infected/diltiazem ("mock + diltiazem"), infected/mock-treated ("H1N1"), or infected/diltiazem ("H1N1 + diltiazem") HAE. The mock-infected/mock-treated ("mock") condition was used as baseline. Mean-weighted fold changes are color-coded from blue to yellow. **(C)** Median Spearman  $\rho$  correlation value calculations between the 3 conditions highlighted in the heatmap. **(D)** Stacked barplot representation of the 40 most up/down-regulated transcripts highlighted in the analysis. Barplots were constructed in R3.3.1 based on mean-weighted fold changes and ordered according to H1N1 values (blue). Mock + diltiazem and H1N1 + diltiazem conditions are represented in yellow and green, respectively.

transcripts associated with diltiazem treatment highlighted 7 particularly enriched BP. While 4 of these BP (GO:0009615; GO:0045071; GO:0051607; GO:0060337) are directly linked

to antiviral response/cellular response to virus, the remaining 3 (GO:005114; GO:0008299; GO:000695) are involved in cholesterol biosynthesis/metabolism (Figure 6A). We then

compared the common differentially expressed transcript levels between the three infection/treatment conditions. These transcriptional signatures revealed a marked anti-correlated profile between the “mock + diltiazem” and the infected / mock-treated (“H1N1”) conditions (**Figure 6B**), supported by a median Spearman’s  $\rho$  correlation value of  $-0.82$  (**Figure 6C**). Most important, the infected/diltiazem (“H1N1 + diltiazem”) condition yielded  $\rho$  correlation values of  $0.40$  and  $-0.72$  when compared to either “mock + diltiazem” or “H1N1,” respectively, therefore confirming a partial reversion of the infection virogenomic signature during effective antiviral treatment with diltiazem (**Figure 6D** and **Figure S4**), as expected.

## DISCUSSION

The existing urge for alternative strategies to cope with the limited efficacy of currently approved antivirals for the prevention and treatment of influenza infections (2, 41, 42), mostly in the case of patients with severe influenza and acute respiratory distress syndrome (ARDS) (43, 44), represented the central driving force of this study. Here, we developed and validated for the first time an innovative approach based on clinical genomic signatures of respiratory viral infections for the rapid discovery, *in vitro*, *in vivo*, and *ex-vivo* evaluation, as well as the repurposing of FDA-approved drugs for their newly identified host-targeted inhibitory and protective properties against influenza infections.

Targeting host components on which viral replication depends instead of viral determinants represents a real change of paradigm in antiviral development, with pioneering results mainly observed in the context of antiretroviral therapy (13, 45). Nevertheless, and despite strong putative advantages such as the achievement of broad-spectrum antiviral efficacy and the minimization of viral drug resistance, this approach usually fails to overcome two major limiting factors of classic compound screening. Firstly, it remains target-centered *per se*, therefore leading to the identification of drugs with limited efficacy due to the complex network and high redundancy of the host cellular pathways. Secondly, the need of high-throughput screenings often entails the measurement of a very limited number of viral parameters, usually in non-physiologically and hence poorly relevant conditions and/or cellular models.

Based on our initial proof-of-concept study on the *in silico* screening of the CMAP database (19, 20) with no initial *a priori* on specific host targets (18), we moved our approach up to the clinical trial setting, by determining exploitable and more relevant virogenomic profiles directly from standard clinical samples of influenza-infected patients. Since the low amount of often degraded RNA obtained from these samples represented a major challenge, we implemented an original combination of sample preparation techniques for low input but high quality samples with data processing initially designed for expression analysis of non-model species (22, 23).

Another substantial development was the integration of several lists of candidate molecules issued from different transcriptomic signatures with enriched relevant DAVID Gene

Ontology terms, and their final selection based on their pharmacological classes and potential compatibility as antivirals. Our refined strategy allowed the selection of a shortlist of 35 high potential candidates out of a rationalized computational screening of a total of 1,309 FDA-approved bioactive molecules. This drastic positive selection step constituted a major advantage, since it enabled the implementation of relevant and integrated *in vitro*, *in vivo* and *ex-vivo* evaluations in a time- and cost-effective manner. Most important, the use of patient (*in vivo*) virogenomic profiles led to the identification of molecules with highly improved *in vitro* activity and significant *in vivo* antiviral efficacy as compared with compounds previously obtained from our initial study based on cell culture (*in vitro*) virogenomic profiles (18). These results truly highlight the added value of using relevant clinical virogenomic signatures to optimize the computational screening for active drugs.

Two of the molecules identified in this study with transcriptomic profiles that counteract clinical virogenomic signatures (e.g., ribavirin and monensin) have already been validated for their anti-influenza properties (38, 40), and then supported the relevance of our compound selection strategy. Nevertheless, although different modes of action have been postulated for the anti-influenza activity of the synthetic guanosine analog ribavirin (39), the exact mechanisms remain uncharacterized so far. Similarly, it has been postulated that monensin, an antibiotic isolated from *Streptomyces* spp, may have a role as a ionophore that interferes with intracellular transport of several enveloped viruses, including influenza (40). In that sense, even if we cannot rule out that some of the molecules identified *in silico* exert a direct effect on a specific pathway or cellular target, the fact that these molecules have been identified with a high anti-correlation rate in CMAP strongly supports a potential multi-target inhibitory effect, probably resulting in deep modifications of host gene expression. In fact, both monensin and ribavirin were previously reported to modulate the host cellular gene expression profile, notably through the up-regulation of the cholesterol and lipid biosynthesis genes (46) or the virus-induced ISRE signaling and antiviral ISGs genes (47), respectively.

The two most promising molecules highlighted in this study are etilefrine, an alpha and beta- adrenergic receptor agonist, currently indicated as a cardiostimulant and anti-hypotensive agent (48) and mainly diltiazem, a voltage-gated Ca<sup>2+</sup>-channel antagonist that is currently used to control angina pectoris and cardiac arrhythmia (49). In addition to their strong inhibitory effect on the viral growth of circulating A(H1N1)pdm09 viruses, with *in vitro* EC<sub>50</sub> values in the nanomolar range (**Figure 2**), both molecules also demonstrated antiviral properties against oseltamivir-resistant A(H1N1)pdm09 and prototype H3N2 and B influenza strains (**Table S4**). Interestingly, virus pre-incubation with diltiazem or etilefrine before infection did not affect final viral titers compared to PBS-incubated controls, hence suggesting that the observed antiviral effect of these molecules is not mediated by direct drug-virus interactions at early stages of viral entry (**Table S5**). Our *in vivo* results (**Figures 3, 4**), obtained without previous treatment optimization in terms of dosage or administration

route, also suggest that these drugs harbor a protective role toward influenza infection, particularly in the case of diltiazem, which conferred increased survival in mice even in a model of severe influenza infection (Figures 4D–F). Moreover, the inhibitory and protective properties of diltiazem were validated in the reconstituted human airway epithelium model, also showing enhanced efficacy when combined with oseltamivir (Figure 5).

Finally, a very recent study by Fujioka and colleagues (50) confirmed the antiviral activity of diltiazem anticipated by our approach. In that study, based on the role of Ca<sup>2+</sup> channels on the attachment of influenza viruses to the host cell, the authors discuss whether the diltiazem induced modulation of Ca<sup>2+</sup> channel activity might not fully explain such observed antiviral activity, consistent with a multi-level (off-target) effect of diltiazem. In this context, in which not all Ca<sup>2+</sup> channel inhibitors confer significant antiviral activity, the newly described capacity of diltiazem to partially reverse the global virogenomic signature of infection and modulate specific genes related to the host antiviral response and cholesterol metabolism (Figures 6 and Figure S4) suggests a putative explanation for its inhibitory effect observed *in vitro*, *ex vivo* and in mice. Nevertheless, although RT-qPCR mRNA quantification performed on a set of genes representative of the two hubs further validated these observations (Figure S5), further investigations are underscored to shed light on the specific mechanisms underlying such potential multi-level mode of action of diltiazem.

Overall, the results presented here set a solid baseline for our drug repurposing strategy and for the use of diltiazem as a host-targeted antiviral in clinical practice. Moreover, the increased antiviral efficacy observed in reconstituted human airway epithelium (Figure 5B and Table S6) plead in favor of the combination of diltiazem with the virus-targeted antiviral oseltamivir for the improvement of current anti-influenza therapy, and possibly decreasing the risk of development of viral resistance. In that regard, our results prompted a French multicenter randomized clinical trial aimed at assessing the effect of diltiazem-oseltamivir bitherapy compared with standard oseltamivir monotherapy for the treatment of severe influenza infections in intensive care units, hence completing the bedside-to-bench and bench-to-bedside cycle of our innovative approach. Additionally, retrospective signature analysis of sequential respiratory samples from patients included in both study arms and stratified according to their clinical response to treatment will provide valuable data to pursue the investigations on the specific mediators of the diltiazem-related antiviral response.

## REFERENCES

1. *Influenza Facts Sheet n°211* (2014) Available online at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/> (Accessed January 20, 2016).
2. Loregian A, Mercorelli B, Nannetti G, Compagnin C, Palù G. Antiviral strategies against influenza virus: towards new therapeutic approaches. *Cell Mol Life Sci CMLS* (2014) 71:3659–83. doi: 10.1007/s00018-014-1615-2

This trial (FLUNEXT TRIAL PHRC #15-0442, ClinicalTrials.gov identifier NCT03212716) is currently ongoing.

Finally, our study underscores the high value of clinical specimens and the advantages of exploiting virogenomic and chemogenomic data for the successful systematic repurposing of drugs already available in our modern pharmacopeia as new effective antivirals. We propose that our approach targeting respiratory epithelial cells, the principal influenza infected cell type in the lung, could be extended to other respiratory viruses and eventually to other pathogens involved in acute infections. Importantly, drug repurposing presents several financial and regulatory advantages compared to the development of *de novo* molecules (5), which are of particular interest not only in the context of antimicrobial resistance but also against both emerging or recurrent pathogens for which we are still disarmed.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AP, OT, JT, GB, and MR-C designed and coordinated the study. VE, JP, and BL acquired clinical data from the cohort. AP, OT, TJ, BP, AT, MR, M-EH, CR, CN, SC, CL-L, and JT performed experiments and provided technical support. AP, OT, MR, JP, JT, GB, and MR-C interpreted data. AP, OT, and MR-C wrote the manuscript. JT, GB, and MR-C revised the manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors want to thank Jacques Corbeil and Frederic Raymond (Research Center in Infectious Diseases of the CHU de Quebec and Laval University, Quebec) for their help and useful advice. This work was funded by grants from the French Ministry of Social Affairs and Health (DGOS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Université Claude Bernard Lyon 1, the Région Auvergne Rhône-Alpes (CMIRA N° 14007029 and AccueilPro COOPERA N°15458 grants), and Canadian Institutes of Health Research (N° 229733 and 230187). GB is the holder of the Canada Research Chair on influenza and other respiratory viruses. Funding institutions had no participation in the design of the study, collection, analysis and interpretation of data, or in the writing of the manuscript.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00060/full#supplementary-material>

3. Booth B, Zimmel R. Prospects for productivity. *Nat Rev Drug Discov.* (2004) 3:451–6. doi: 10.1038/nrd1384
4. Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov.* (2004) 3:673–83. doi: 10.1038/nrd1468
5. Law GL, Tisoncik-Go J, Korth MJ, Katze MG. Drug repurposing: a better approach for infectious disease drug discovery? *Curr Opin Immunol.* (2013) 25:588–92. doi: 10.1016/j.coi.2013.08.004

6. Johansen LM, DeWald LE, Shoemaker CJ, Hoffstrom BG, Lear-Rooney CM, Stossel A, et al. A screen of approved drugs and molecular probes identifies therapeutics with anti-Ebola virus activity. *Sci Transl Med.* (2015) 7:290ra89. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa5597
7. Xu M, Lee EM, Wen Z, Cheng Y, Huang W-K, Qian X, et al. Identification of small-molecule inhibitors of Zika virus infection and induced neural cell death via a drug repurposing screen. *Nat Med.* (2016) 22:1101–7. doi: 10.1038/nm.4184
8. Naylor S, Schonfeld JM. Therapeutic drug repurposing, repositioning and rescue - Part I: Overview. *Drug Discov World* (2014) 16:49–62. Available online at: <https://www.ddw-online.com/drug-discovery/p274232-therapeutic-drug-repurposing-repositioning-and-rescue-winter-14.html>
9. Keiser MJ, Setola V, Irwin JJ, Laggner C, Abbas AI, Hufeisen SJ, et al. Predicting new molecular targets for known drugs. *Nature* (2009) 462:175–81. doi: 10.1038/nature08506
10. Haupt VJ, Schroeder M. Old friends in new guise: repositioning of known drugs with structural bioinformatics. *Brief Bioinform.* (2011) 12:312–26. doi: 10.1093/bib/bbr011
11. Li Y, Agarwal P. A pathway-based view of human diseases and disease relationships. *PLoS ONE* (2009) 4:e4346. doi: 10.1371/journal.pone.0004346
12. Lussier YA, Chen JL. The emergence of genome-based drug repositioning. *Sci Transl Med.* (2011) 3:96ps35. doi: 10.1126/scitranslmed.3001512
13. Hütter G, Bodor J, Ledger S, Boyd M, Millington M, Tsie M, et al. CCR5 targeted cell therapy for HIV and prevention of viral escape. *Viruses* (2015) 7:4186–203. doi: 10.3390/v7082816
14. Ludwig S. Disruption of virus-host cell interactions and cell signaling pathways as an anti-viral approach against influenza virus infections. *Biol Chem.* (2011) 392:837–47. doi: 10.1515/BC.2011.121
15. Rossignol JF, La Frazia S, Chiappa L, Ciucci A, Santoro MG. Thiazolidines, a new class of anti-influenza molecules targeting viral hemagglutinin at the post-translational level. *J Biol Chem.* (2009) 284:29798–808. doi: 10.1074/jbc.M109.029470
16. Belsler JA, Lu X, Szretter KJ, Jin X, Aschenbrenner LM, Lee A, et al. DAS181, a novel sialidase fusion protein, protects mice from lethal avian influenza H5N1 virus infection. *J Infect Dis.* (2007) 196:1493–9. doi: 10.1086/522609
17. Mazur I, Wurzer WJ, Ehrhardt C, Pleschka S, Puthavathana P, Silberzahn T, et al. Acetylsalicylic acid (ASA) blocks influenza virus propagation via its NF-kappaB-inhibiting activity. *Cell Microbiol.* (2007) 9:1683–94. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.00902.x
18. Josset L, Textoris J, Loriod B, Ferraris O, Moules V, Lina B, et al. Gene expression signature-based screening identifies new broadly effective influenza A antivirals. *PLoS ONE* (2010) 5:e13169. doi: 10.1371/journal.pone.0013169
19. Lamb J, Crawford ED, Peck D, Modell JW, Blat IC, Wrobel MJ, et al. The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science* (2006) 313:1929–35. doi: 10.1126/science.1132939
20. Lamb J. The Connectivity Map: a new tool for biomedical research. *Nat Rev Cancer* (2007) 7:54–60. doi: 10.1038/nrc2044
21. Escuret V, Cornu C, Boutitie F, Enouf V, Mosnier A, Bouscambert-Duchamp M, et al. Oseltamivir-zanamivir bitherapy compared to oseltamivir monotherapy in the treatment of pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus infections. *Antiviral Res.* (2012) 96:130–7. doi: 10.1016/j.antiviral.2012.08.002
22. Khaznadar Z, Boissel N, Agaogué S, Henry G, Cheok M, Vignon M, et al. Defective NK cells in acute myeloid leukemia patients at diagnosis are associated with blast transcriptional signatures of immune evasion. *J Immunol.* (2015) 195:2580–90. doi: 10.4049/jimmunol.1500262
23. Degletagne C, Keime C, Rey B, de Dinechin M, Forcheron F, Chuchana P, et al. Transcriptome analysis in non-model species: a new method for the analysis of heterologous hybridization on microarrays. *BMC Genomics* (2010) 11:344. doi: 10.1186/1471-2164-11-344
24. Tukey J, Wilder J. *Exploratory Data Analysis*. Reading, PA: Addison-Wesley (1977).
25. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol.* (1995) 57:289–300.
26. Barrett T, Edgar R. Gene expression omnibus: microarray data storage, submission, retrieval, and analysis. *Methods Enzymol.* (2006) 411:352–69. doi: 10.1016/S0076-6879(06)11019-8
27. Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, et al. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biol.* (2003) 4:P3.
28. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The gene ontology consortium. *Nat Genet.* (2000) 25:25–9. doi: 10.1038/75556
29. Hatakeyama S, Sakai-Tagawa Y, Kiso M, Goto H, Kawakami C, Mitamura K, et al. Enhanced expression of an alpha2,6-linked sialic acid on MDCK cells improves isolation of human influenza viruses and evaluation of their sensitivity to a neuraminidase inhibitor. *J Clin Microbiol.* (2005) 43:4139–46. doi: 10.1128/JCM.43.8.4139-4146.2005
30. Moules V, Ferraris O, Terrier O, Giudice E, Yver M, Rolland JP, et al. In vitro characterization of naturally occurring influenza H3NA-viruses lacking the NA gene segment: toward a new mechanism of viral resistance? *Virology* (2010) 404:215–24. doi: 10.1016/j.virol.2010.04.030
31. Tsai AW, McNeil CF, Leeman JR, Bennett HB, Nti-Addae K, Huang C, et al. Novel ranking system for identifying efficacious anti-influenza virus PB2 inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* (2015) 59:6007–16. doi: 10.1128/AAC.00781-15
32. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinform Oxf Engl.* (2014) 30:2114–20. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
33. Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol.* (2016) 34:525–7. doi: 10.1038/nbt.3519
34. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinform Oxf Engl.* (2010) 26:139–40. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616
35. Dupinay T, Nguyen A, Croze S, Barbet F, Rey C, Mavingui P, et al. Next-generation sequencing of ultra-low copy samples: from clinical FFPE samples to single-cell sequencing. *Curr Top Virol.* (2013) 10:63–83.
36. Kinsella RJ, Kähäri A, Haider S, Zamora J, Proctor G, Spudich G, et al. Ensemble BioMarts: a hub for data retrieval across taxonomic space. *Database J Biol Databases Curation* (2011) 2011:bar030. doi: 10.1093/database/bar030
37. Flicek P, Amode MR, Barrell D, Beal K, Billis K, Brent S, et al. Ensembl 2014. *Nucleic Acids Res.* (2014) 42:D749–755. doi: 10.1093/nar/gkt1196
38. Durr FE, Lindh HF. Efficacy of ribavirin against influenza virus in tissue culture and in mice. *Ann N Y Acad Sci.* (1975) 255:366–71.
39. Leyssen P, De Clercq E, Neyts J. Molecular strategies to inhibit the replication of RNA viruses. *Antiviral Res.* (2008) 78:9–25. doi: 10.1016/j.antiviral.2008.01.004
40. Alonso FV, Compans RW. Differential effect of monensin on enveloped viruses that form at distinct plasma membrane domains. *J Cell Biol.* (1981) 89:700–5.
41. Hayden F. Developing new antiviral agents for influenza treatment: what does the future hold? *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* (2009) 48 (Suppl. 1):S3–13. doi: 10.1086/591851
42. Lee SM-Y, Yen H-L. Targeting the host or the virus: current and novel concepts for antiviral approaches against influenza virus infection. *Antiviral Res.* (2012) 96:391–404. doi: 10.1016/j.antiviral.2012.09.013
43. Koh Y. Update in acute respiratory distress syndrome. *J Intensive Care* (2014) 2:2. doi: 10.1186/2052-0492-2-2
44. Poissy J, Terrier O, Lina B, Textoris J, Rosa-Calatrava M. La modulation de la signature transcriptomique de l'hôte infecté : une nouvelle stratégie thérapeutique dans les viroses graves ? Exemple de la grippe. *Réanimation* (2016) 25:53–61. doi: 10.1007/s13546-016-1188-1
45. Lou Z, Sun Y, Rao Z. Current progress in antiviral strategies. *Trends Pharmacol Sci.* (2014) 35:86–102. doi: 10.1016/j.tips.2013.11.006
46. Dayekh K, Johnson-Obaseki S, Corsten M, Villeneuve PJ, Sekhon HS, Weberpals JJ, et al. Monensin inhibits epidermal growth factor receptor trafficking and activation: synergistic cytotoxicity in

- combination with EGFR inhibitors. *Mol Cancer Ther.* (2014) 13:2559–71. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-1086
47. Zhang Y, Jamaluddin M, Wang S, Tian B, Garofalo RP, Casola A, et al. Ribavirin treatment up-regulates antiviral gene expression via the interferon-stimulated response element in respiratory syncytial virus-infected epithelial cells. *J Virol.* (2003) 77:5933–47. doi: 10.1128/JVI.77.10.5933-5947.2003
48. Pubchem C10H15NO2. *Etilefrine*[C10H15NO2 - *PubChem*. Available online at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Etilefrine> (Accessed February 3, 2017).
49. Pubchem C22H26N2O4S. *diltiazem*[C22H26N2O4S - *PubChem*. Available online at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/diltiazem> (Accessed February 3, 2017).
50. Fujioka Y, Nishide S, Ose T, Suzuki T, Kato I, Fukuhara H, et al. A sialylated voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel binds hemagglutinin and mediates influenza A virus entry into mammalian cells. *Cell Host Microbe* (2018) 23:809–18.e5. doi: 10.1016/j.chom.2018.04.015

**Conflict of Interest Statement:** AP, OT, JT, GB, and MR-C are co-inventors of a patent application filed by INSERM, Université Claude Bernard Lyon 1, Laval University and Hospices Civils de Lyon for the repurposing of diltiazem and etilefrine as anti-influenza agents (FR15/52284 - PCT/ep2016/056036-WO2016146836).

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Pizzorno, Terrier, Nicolas de Lamballerie, Julien, Padey, Traversier, Roche, Hamelin, Rhéaume, Croze, Escuret, Poissy, Lina, Legras-Lachuier, Textoris, Boivin and Rosa-Calatrava. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



### 1.3. Discussion et perspectives de ce travail

D'un point de vue technologique, l'exploitation d'échantillons cliniques est difficile. Bien que les échantillons de lavages nasaux aient été collectés en RNAlater®, une dégradation forte a été observée, avec des *RNA Integrity Numbers* (RIN) très faibles, compris entre 1 et 8, et des quantités d'ARN inégales. Afin d'optimiser la quantité et qualité du matériel obtenu, un ensemble de bonnes pratiques ont depuis été développées et mise en place par notre laboratoire. Ces bonnes pratiques de collection d'échantillons conseillent par exemple une congélation instantanée (*snap freeze*) dans un délai inférieur à 20 minutes, suivie d'un stockage à -80°C ou -150°C<sup>510</sup>. Bien que l'ensemble de ces bonnes pratiques soit difficile à mettre en place dans un contexte hospitalier, elles sont nécessaires afin d'appréhender au mieux le transcriptome des patients. Malgré ces écueils et grâce à l'adaptation du protocole d'amplification et de celui de l'analyse de données (algorithme MAXRS), des profils transcriptomiques pertinents ont cependant pu être établis<sup>511,512</sup>.

Notre méthodologie de repositionnement a permis la sélection parmi 1 309 composés de la base de données CMap, de 35 molécules candidates, dont 31 ont démontré une activité antivirale significative *in vitro*. Parmi ces molécules, la ribavirine et la monensine avaient notamment déjà été décrites pour leurs effets antiviraux<sup>479,513,514</sup>. Ces résultats ont ainsi constitué une première validation de notre approche et de son optimisation basée sur l'exploitation d'échantillons de patients. La validation supplémentaire *in vivo* et *in vitro* sur un modèle alternatif du diltiazem et dans une moindre mesure, de l'étiléfrine parmi les 31 molécules candidates validées *in vitro*, permet de valider notre stratégie dont l'avantage est de sélectionner un nombre très restreint de molécules candidates à fort potentiels afin de pouvoir les évaluer fonctionnellement dans différents modèles complémentaires et pertinents d'infection, à la différence d'approches plus classiques de criblage à haut débit et dont le ratio de succès est aujourd'hui aux alentours de 0.01%<sup>300,515,516</sup>.

Nos résultats précliniques très prometteurs avec le traitement combinant le diltiazem (Tildiem®) à l'oseltamivir (Tamiflu®) ont permis l'obtention d'un financement PHRC (PHRC #15-0442) et la mise en place d'un essai clinique de phase II multicentrique (FLUNEXT TRIAL NCT03212716, promoteur : CHRU Lille, investigateur : Pr Julien Poissy, co-investigateur : Dr Manuel Rosa-Calatrava). Cet essai national a débuté en janvier 2018 et vise à évaluer l'effet du diltiazem en association avec l'oseltamivir pour le traitement des infections grippales graves. L'essai, dont les résultats sont attendus en 2021, vise à recruter 176 patients souffrant de grippe sévère dans 26 unités de soins intensifs selon deux bras, un traitement à l'oseltamivir seul *versus* un traitement par combinaison. Les critères principaux d'évaluation de l'essai sont la survie des patients, la durée de leur résidence en service de réanimation et / ou sous ventilation mécanique, ainsi que la clairance virale.

Cet essai clinique prévoit également des prélèvements respiratoires, au moment de l'inclusion dans l'essai et pendant le traitement, afin d'établir la signature transcriptomique des patients et son évolution au cours du temps. L'objectif de cette analyse rétrospective est d'appréhender une possible évolution de la signature des patients due au traitement par le diltiazem, avec un gain clinique le cas échéant. Les données récoltées permettront également d'affiner davantage notre stratégie. Par exemple, l'information délivrée par les signatures de patients obtenues initialement par hybridation sur puce Affymetrix pourra être complétée par ces nouvelles données issues de séquençage NGS, plus exhaustives notamment en ce qui concerne les transcrits interrogés.

Cet essai valide la faisabilité clinique de notre stratégie de repositionnement de médicaments, suggérant ainsi, dans le cas de résultats positifs et donc d'une validation finale de notre stratégie, la possibilité de pouvoir répondre aux futures épidémies, pandémies ou maladies infectieuses (ré)émergentes, contre lesquelles notre arsenal prophylactique et thérapeutique est très limité, voire inexistant dans le cas de la pandémie actuelle au SARS-CoV-2.

Enfin, l'utilisation du modèle HAE pour examiner les signatures chémogénomiques et valider l'effet de molécules antivirales constitue une véritable avancée technologique au sein du laboratoire. En effet, cela nous a permis de nous détacher davantage des modèles de lignées cellulaires précédemment employés pour gagner en pertinence biologique. Dans le cadre du programme RESPIROMIX, ces modèles *in vitro* physiologiques ont été exploités pour l'étude d'autres virus respiratoires que les IAV et ont fait l'objet de la publication présentée ci-après.

## II . Signatures transcriptomiques d'infections virales par séquençage en modèle d'épithélium respiratoire humain reconstitué (Programme RESPIROMIX)

Les difficultés d'exploitation des échantillons cliniques, du fait de leur hétérogénéité en termes de quantité et de qualité des acides nucléiques, car extrêmement dégradés, nous ont amenés à étoffer notre stratégie en nous appuyant de manière complémentaire sur le modèle *in vitro* physiologique d'épithélium respiratoire humain reconstitué et cultivé en interface air/liquide (HAE Mucilair®, Epithelix<sup>517</sup>), que nous avons mis à profit dans l'évaluation du diltiazem, comme présenté ci-dessus.

Nous avons ainsi entrepris une étude descriptive de plusieurs infections virales (influenza A/B, HRSV, HMPV) dans ce modèle HAE dans le but de constituer par RNAseq des signatures transcriptomiques cellulaires associées à ces infections et de les jumeler à des paramètres physiologiques mesurés, tels que le potentiel transmembranaire, la dynamique des mouvements ciliaires et le profil de sécrétion de cytokines et chimiokines associées à ces infections *in vitro*.

Ce chapitre est consacré à la présentation de la publication intitulée « ***Characterization of cellular transcriptomic signatures induced by different respiratory viruses in human reconstituted airway epithelia*** », dont les auteurs sont Claire Nicolas de Lamballerie, Mario Andres Pizzorno, Thomas Julien, Blandine Padey, Mendy Bouveret, Aurélien Traversier, Catherine Legras-Lachuer, Bruno Lina, Guy Boivin et Manuel Rosa-Calatrava. Cet article a été publié dans le journal international à comité de lecture en langue anglaise *Scientific Reports* (DOI=10.1038/s41598-019-48013-7).

### II. 1 . Résumé

Cette étude descriptive s'est intéressée à l'impact de différents virus respiratoires (IAV, IBV, HRSV, HMPV) sur le modèle *in vitro* physiologique Mucilair™ (Figure 37).

*In vivo*, le tractus respiratoire est recouvert d'un épithélium cilié produisant un mucus des fosses nasales jusqu'aux bronchioles. La cellule épithéliale est à la fois une barrière (mécanique ou de protection par le mouvement ciliaire) et un lieu d'échanges (absorption, échanges air/sang...). Parmi les fonctions importantes de l'épithélium, le mouvement ciliaire est décrit depuis longtemps comme un moyen efficace de protection des voies respiratoires. Depuis leur point d'attache dans la cuticule, les cils baignent dans un liquide biphasé : une couche fluide au fond (où battent les cils) et une couche plus visqueuse au-dessus, qui est déplacée par le mouvement des cils. Cette couche de mucus déplacée emporte avec elle virus, bactéries ou particules, d'où ses capacités de protection de la muqueuse (et d'excrétion bronchique).

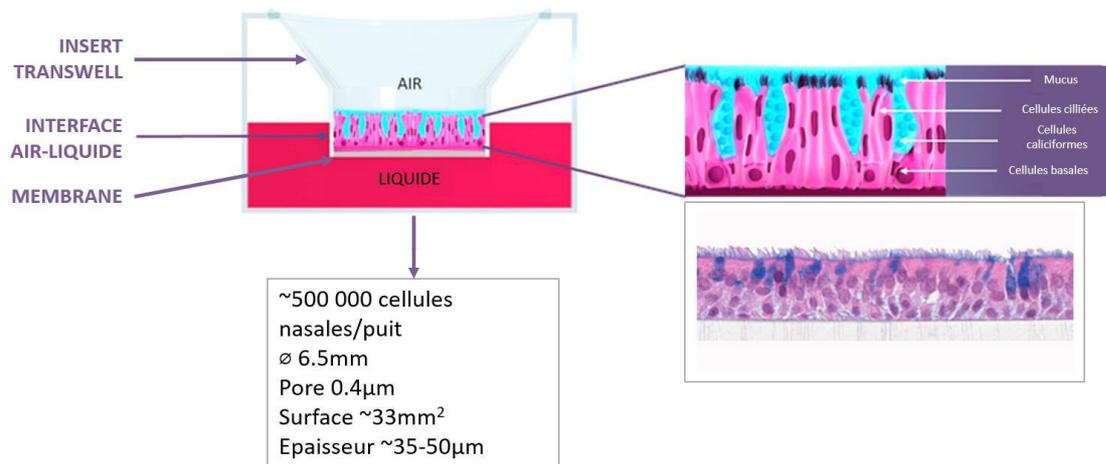


Figure 37 : Modèle MucilAir™ (Source : Epithelix).

Dans le cadre de l'étude d'infections virales expérimentales, le modèle d'épithélium Mucilair™ est donc très pertinent d'un point physiologique. Il s'agit en effet de cellules primaires (cellules basales, caliciformes et ciliées) issues de nécropsies nasales de patients sains au niveau de leur tractus respiratoire, qui ont été différenciées en un épithélium stratifié et fonctionnel, reproduisant en partie l'environnement des muqueuses respiratoires *in vivo*. Grâce à ce modèle, un certain nombre de caractéristiques biologiques peuvent être mesurées selon les conditions expérimentées telles que l'intégrité de l'épithélium et des jonctions serrées, la motilité ciliaire, la sécrétion de cytokines, de chimiokines et de métalloprotéinases, la production de mucus, le transport ionique et l'activité métabolique. En effet, ce modèle permet de monitorer l'ensemble de ces caractères physiologiques en (i) observant par exemple la morphologie de l'épithélium et l'apparition d'effets cytopathiques traduisant l'impact du virus sur les voies métaboliques, biochimiques et morphologiques de la cellule infectée, (ii) mesurant également l'évolution du potentiel électrochimique entre les pôles apical et basal des épithéliums grâce à un multimètre dédié, on parle de TEER pour « *TransEpithelial Electrical Resistance* » qui est représentative de l'intégrité de l'épithélium et notamment des jonctions serrées, (iii) mesurant la fréquence des battements ciliaires *via* l'évaluation du déplacement de microbilles de polystyrène à la surface de l'épithélium, et (iv) dosant aux pôles apical et basal les cytokines/chimiokines sécrétées par des kits d'immunodétection de type Luminex, utilisés habituellement pour la caractérisation d'échantillons cliniques humains. Pour compléter ces paramètres physiologiques, s'ajoutent les quantifications virales par titrage infectieux (TCID<sub>50</sub> en cellules MDCK) et par mesure de copies de génomes viraux (par RT-qPCR) des particules virales produites au pôle apical et / ou à l'intérieur des cellules infectées au fur et à mesure de la réplication virale dans les épithéliums.

La première étape de l'étude a consisté en la prise en main du modèle d'épithélium Mucilair™ et la détermination des paramètres d'infection adaptés à chaque virus (MOI, protocoles d'infection,

fréquence des prélèvements et des mesures physiologiques) afin de dresser les spécificités des différents modèles d'infection influenza A/B, HRSV et HMPV. Dans notre étude, nous observons une modulation significative des gènes associés à l'assemblage des cils, leur morphogenèse et au transport intra-ciliaire. En corrélation avec ce résultat, nous avons mesuré un impact fort des différentes infections virales sur le mouvement des cils, ce qui suggère une clairance muco-ciliaire diminuée. Si l'on ajoute à ceci la chute de la résistance trans-épithéliale, nous obtenons une image générale des dommages majeurs que subit l'épithélium respiratoire lors de ces infections virales<sup>518</sup>.

Nous avons également établi les profils de sécrétion de 27 cytokines et chimiokines humaines (test multiplex qui détecte : FGF basique, éotaxine, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17A, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , PDGF-BB, RANTES, TNF- $\alpha$  et VEGF) dans les différents modèles d'infection en HAE. Ces cytokines sont des biomarqueurs clés des réponses immunitaires pro- et anti-inflammatoires de l'hôte en cas d'infection. Les résultats obtenus ont permis de souligner un profil global de sécrétion similaire entre tous les virus testés, avec notamment l'induction très forte de l'interleukine 2 (IL-2), de la chimiokine IP-10 et dans une moindre mesure de l'interleukine 15 (IL-15). De nombreuses études ont montré que des infections par divers virus respiratoires ont la capacité d'induire la production d'un certain nombre de cytokines *in vitro* et *in vivo*<sup>519</sup>. Il a par exemple précédemment été montré que la chimiokine pro-inflammatoire IP-10 subit une forte induction en modèle *in vitro* de co-infection par influenza et pneumocoque<sup>520</sup>. Parallèlement, nous avons aussi mis en lumière des inductions de cytokines/chimiokines plus spécifiques de chaque modèle d'infection, illustrant de potentiels biomarqueurs, telles qu'une forte sécrétion de VEGF ou une induction significativement plus faible de RANTES et IL-8 dans le cas des infections par HMPV. Concernant HRSV, nous avons observé une sécrétion particulièrement faible de GM-CSF, contrairement aux autres modèles d'infection étudiés. Il est intéressant de noter qu'une concentration augmentée en cytokines Th1 (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-12p70, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), cytokines Th2 (IL-13, IL-4, IL-6, IL-10), chimiokines (IP-10, IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ ), facteurs de croissance (FGF basique, PDGF-BB, G-CSF) et IL-1ra, IL-17 avait déjà été décrite par Bermejo-Martin et collaborateurs chez de jeunes enfants infectés sévèrement par HRSV<sup>521</sup>.

Après avoir caractérisé et calibré ces modèles d'infection en épithélium Mucilair™, nous avons entrepris d'en établir la signature transcriptomique spécifique par RNAseq. En fonction des cinétiques d'infections propres à chaque virus, nous avons donc choisi de nous placer autour du pic de l'infection pour étudier un état d'infection aigu. Les ARN totaux ont alors été extraits puis les bibliothèques de séquençage ont été préparées après déplétion ribosomique. Une première analyse en composantes principales des résultats du séquençage nous a permis de séparer de manière distincte les épithéliums sains des épithéliums infectés par des Pneumovirus ou des Orthomyxovirus. Ce

premier résultat confirme donc bien que les virus étudiés entraînent un bouleversement profond et spécifique au niveau du transcriptome de la cellule hôte. Par ailleurs, bien que l'on distingue nettement les infections HRSV de celles aux HMPV, les différences entre infections par les virus influenza sont plus ténues. Nous nous sommes ensuite intéressés aux résultats obtenus par analyse différentielle des conditions infectées *versus* non-infectées. Comme attendu, celle-ci a mis en lumière la modulation commune aux différentes infections des gènes associés aux mécanismes de la réponse immunitaire (GO:0045087 ; GO:0006955). Nous avons d'ailleurs observé une corrélation remarquable des profils d'expression des gènes et des inductions de cytokines, en particulier en ce qui concerne CXCL10 et IP-10. Nous avons aussi choisi de valider 4 gènes clefs de cette réponse immunitaire par RTqPCR : IFNL1, IFNL2, IFIT2, IFI44L. La surexpression de ces gènes dans tous les modèles d'infection a été validée par cette méthode. De manière intéressante, nous avons également identifié la sous-expression induite par ces infections d'un ensemble de gènes associés à l'assemblage, la morphogénèse ou le mouvement des cils (GO:0042384 ; GO:0060271 ; GO:0003341). Dans le cas de l'infection par H1N1, cette signature transcriptomique a été associée à une vitesse de mouvement des cils de l'épithélium diminuée et donc à une clairance muco-ciliaire réduite.

Le modèle HAE permet donc d'observer les effets de multiples infections tout en traduisant de manière physiologique et pertinente les bouleversements induits. Ce modèle fait appel à de nombreuses spécificités de l'épithélium respiratoire et permet ainsi un suivi intégré et reproductible des réponses de l'hôte à l'infection. Nous avons donc pu établir un ensemble de marqueurs physiologiques du modèle Mucilair™ en situation d'infection en accord avec des observations *in vivo* déjà publiées, y compris au niveau de la modulation du transcriptome de l'hôte infecté. Ce modèle nous a aussi permis d'appréhender avec une précision accrue les interactions entre les virus respiratoires et leurs cibles cellulaires, témoignant du bien-fondé de l'utilisation de tels modèles d'étude, très complémentaire aux modèles *in vivo*.

OPEN

# Characterization of cellular transcriptomic signatures induced by different respiratory viruses in human reconstituted airway epithelia

Claire Nicolas de Lamballerie<sup>1,2</sup>, Andrés Pizzorno<sup>1</sup>, Julia Dubois<sup>1</sup>, Thomas Julien<sup>1,3</sup>, Blandine Padey<sup>1,3</sup>, Mendy Bouveret<sup>1</sup>, Aurélien Traversier<sup>1</sup>, Catherine Legras-Lachuer<sup>2</sup>, Bruno Lina<sup>1</sup>, Guy Boivin<sup>4</sup>, Olivier Terrier<sup>1</sup> & Manuel Rosa-Calatrava<sup>1,3</sup>

Acute respiratory infections, a large part being of viral origin, constitute a major public health issue. To propose alternative and/or new therapeutic approaches, it is necessary to increase our knowledge about the interactions between respiratory viruses and their primary cellular targets using the most biologically relevant experimental models. In this study, we used RNAseq to characterize and compare the transcriptomic signature of infection induced by different major respiratory viruses (Influenza viruses, hRSV and hMPV) in a model of reconstituted human airway epithelia. Our results confirm the importance of several cellular pathways commonly or specifically induced by these respiratory viruses, such as the innate immune response or antiviral defense. A very interesting common feature revealed by the global virogenomic signature shared between hRSV, hMPV and influenza viruses is the global downregulation of cilium-related gene expression, in good agreement with experimental evaluation of mucociliary clearance. Beyond providing new information about respiratory virus/host interactions, our study also underlines the interest of using biologically relevant experimental models to study human respiratory viruses.

Acute respiratory infections (ARI) constitute a leading cause of acute illness worldwide and a major cause of death among young children, with nearly 2 million deaths per year<sup>1-3</sup>. Among a panoply of different viral and bacterial pathogens, respiratory viruses, such as influenza A and B viruses (IAV and IBV), respiratory syncytial virus (hRSV-A and hRSV-B), human metapneumovirus (hMPV-A and hMPV-B) or rhinoviruses (RV), represent the main etiologic agents of these infections<sup>2,4,5</sup>. In that regard, the limited or non-existent prophylactic and therapeutic arsenal available, coupled with the emergence of antiviral resistance, highlight the public health burden imposed by these respiratory pathogens. It appears therefore urgent to develop alternative and/or new therapeutic approaches, for which it is a necessary condition to increase our knowledge of the interactions between respiratory viruses and their primary cellular targets, namely respiratory epithelial cells.

The last decade has witnessed the development of high-throughput “omics” approaches that have contributed to deepen our understanding of the multiple levels of interplay between respiratory viruses and the host cell. Numerous studies have described the impact of infection on host gene expression *in vitro* or *in vivo*, mainly in the context of influenza viruses or hRSV and to a lesser extent for other respiratory viruses such hMPV<sup>6-10</sup>. For example, several mRNA profiling studies, including ours, have highlighted the role of NF-κB, p53, or MAPK cellular

<sup>1</sup>Virologie et Pathologie Humaine - VirPath team, Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, 69008, France.

<sup>2</sup>Viroscan3D SAS, Lyon, 69008, France. <sup>3</sup>VirNext, Faculté de Médecine RTH Laennec, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, 69008, France. <sup>4</sup>Research Center in Infectious Diseases of the CHU de Québec and Laval University, Québec City, QC, G1V 4G2, Canada. Olivier Terrier and Manuel Rosa-Calatrava contributed equally. Correspondence and requests for materials should be addressed to O.T. (email: [olivier.terrier@univ-lyon1.fr](mailto:olivier.terrier@univ-lyon1.fr)) or M.R.-C. (email: [manuel.rosa-calatrava@univ-lyon1.fr](mailto:manuel.rosa-calatrava@univ-lyon1.fr))

pathways in the context of influenza virus infection<sup>11–13</sup>. Nevertheless, only few comparative studies between different respiratory viruses have been so far described in the literature, although such approaches would be very informative to determine common and/or specific viral “fingerprints” that could provide valuable insight on potential antiviral immune response countermeasures and other pathogenesis mechanisms. Moreover, we still face the challenge of achieving increased physiologic relevance by coupling transcriptomic analyses with measurable physiological, immunological and/or virological data.

In a context of limited access to large panels of high-quality clinical samples, human reconstituted airway epithelial (HAE) models appear as biologically relevant and useful tools for studying infection at the level of primary target cells for respiratory viruses. For example, both in-house and commercially available (i.e. Mucilair™) HAE models, composed of human primary ciliated columnar cells, mucus-secreting goblet and basal cells cultivated at the air-liquid interface, have been successfully used to study viral infections and evaluate antivirals<sup>14–17</sup>. In that regard, the aim of the present study was to perform a comparative analysis of transcriptomic signatures of infection among different major respiratory viruses (Influenza, hRSV and hMPV) in HAE, in order to identify and experimentally validate both common and specific key cellular pathways. Altogether, our results confirmed the importance of several cellular pathways, such as the interferon signaling and cilium-related pathways, specifically or commonly deregulated upon infection by different respiratory viruses, which were further validated through transversal analyses such as quantification of secreted cytokines/chemokines. Beyond providing new data highlighting the interplay between respiratory viruses and the host cells, this study also underlines the interest of using biologically relevant models such as reconstituted HAE as a good compromise between *in vitro* immortalized cell lines and *ex-vivo/in-vivo* experimental models for the functional study of respiratory pathogens.

## Results

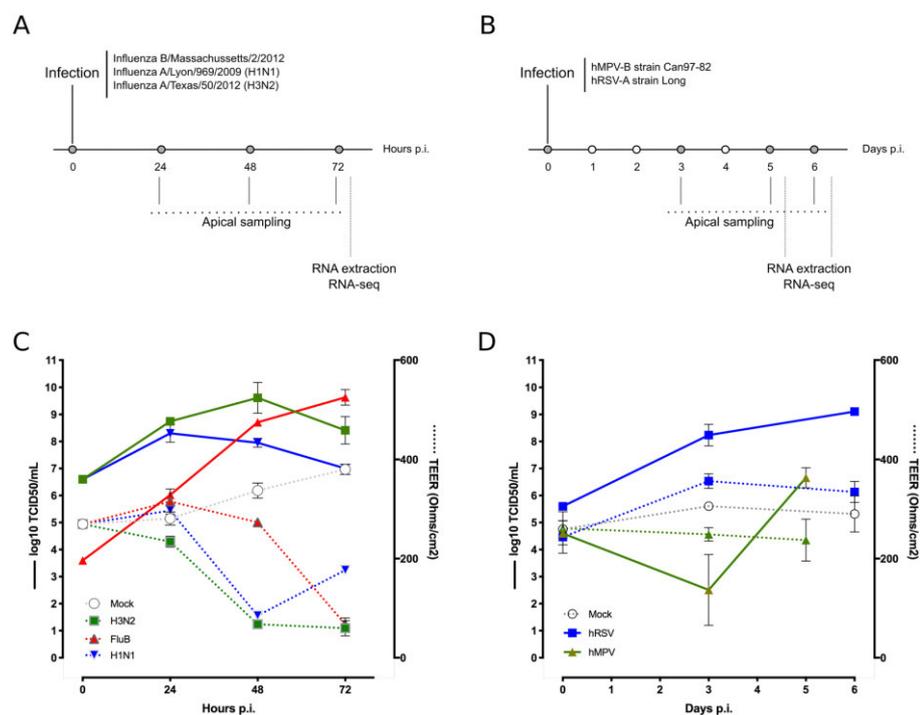
**Experimental setup and monitoring of viral infection in HAE.** The initial step of our study was to produce high quality, reproducible, and physiologically relevant material in order to transversely analyze the common and distinct features of infection with major respiratory viruses. To that end, we performed a series of experimental infections in HAE using specific parameters (infection protocol, MOI, time-points) previously optimized according to both the literature and in-house pilot studies, notably to take into account the inherent differences in viral kinetics among strains/viruses<sup>17,18</sup>. A summary of the two experimental setups performed, for influenza and hRSV/hMPV, respectively, is given in Fig. 1A,B. For the monitoring of viral production and cytokine/chemokine secretion, serial sampling at the apical surface of HAE was performed throughout the time-course of infection. The trans-epithelial electrical resistance (TEER), considered as an indirect marker of the epithelium integrity, was also measured at different time points (gray dots, Fig. 1A,B). Finally, HAE were harvested at 72 hpi (Fig. 1A) or 5 and 6 dpi (Fig. 2A) for RNA extraction and subsequent RTqPCR or high-throughput RNA sequencing.

Influenza viral production was observed at the HAE apical surface as early as 24 hpi, ranging between a minimum of 5.97 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml for influenza B and a maximum of 8.8 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml for H3N2. Depending on the strain, the viral replication peak was observed between 24 and 72 hpi (Fig. 1C). In the case of hRSV and hMPV infections, significant viral production was measured at the apical surface from 3 dpi, with the viral replication peak being attained between 5 and 6 dpi (Fig. 1D). As a result of these observations of peak viral replication, we selected 72 hpi, 5dpi and 6 dpi as the study end-point for influenza, hMPV and hRSV infections, respectively. Of note, hMPV-B viral titers at the apical surface remained limited even at 5 days post-infection (Fig. 1D). hMPV and hRSV titers at 6 dpi reached 6.42 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml and 9.13 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml, respectively (Fig. 1D). Trans-epithelial electrical resistance (TEER) values decreased drastically over time in the context of influenza infection (Fig. 1C) but remained stable, similar to that was observed for mock-infected HAE, in the case of hRSV and hMPV (Fig. 1D).

**Differential impact of infection on cytokine/chemokine secretion patterns.** To obtain a large overview of the inflammatory and non-inflammatory immune response following HAE infections, we quantified a panel of 27 different cytokines and chemokines using a bead-based multiplex immunoassay (Bio-Plex, Bio-Rad, USA). To facilitate the comparison between experimental conditions, results for each cytokine/chemokine were expressed as the log-transformed ratio compared to mock condition and presented in a radar chart (Fig. 2). All raw data are presented in Supplementary Table 1.

First, the general pattern of cytokine/chemokine secretion compared to mock was relatively similar between the different viruses tested. Indeed, this pattern was notably characterized by the high induction of interleukin 2 (IL-2) and interferon gamma-induced protein 10 (IP-10) in the context of all viral infections studied. These two cytokines, known to be a central part of the pro-inflammatory T helper (Th) 1 response, showed mean relative secretion log-transformed ratios above 2.25 (Fig. 2). This was also the case, though to a slightly lesser extent, for IL-15, with mean secretion log-transformed ratios around 2.25. In addition, the relative level of several cytokines such as IL-5, IL-10, IL-7, IL-13 and Basic-FGF was not as impacted by the infection as the other chemokines/cytokines (Fig. 2). On the other side, we also observed some specificities in the case of hRSV and hMPV. For example, the relative levels of IL-8 and RANTES were increased in all the infections studied, with the notable exception of hMPV. A similar pattern was observed for GM-CSF and hRSV (Fig. 2). In addition, hMPV infection was the only experimental condition tested with a marked increase of VEGF relative level (Fig. 2). Altogether, these results highlight the consistency and reproducibility of the HAE model regarding cytokine secretion upon infection as well as the utility of the generated data for the discrimination between different viral infections.

**Transcriptional profiling of infections in HAE.** For a better understanding of the underlying host response to infection, HAE were lysed at 72 hpi, 5 dpi or 6 dpi and total RNA was extracted. cDNA libraries were then produced, amplified, and subjected to high-throughput sequencing. A Principal Component Analysis



**Figure 1.** Viral infection in HAE: experimental protocol and biological monitoring results. (A,B) Apical poles were gently washed with 200  $\mu\text{L}$  of OptiMEM medium. 150  $\mu\text{L}$  of diluted viruses (Influenza B/Massachusetts/2/2012, Influenza A/Lyon/969/2009, Influenza A/Texas/50/2012 in panel A and hMPV-B strain CAN97-82 or hRSV-A strain Long in panel (B) were added to the apical pole and incubated for 1 h at 37  $^{\circ}\text{C}$ . The infection is mimicked in the mock condition by adding virus-free OptiMEM medium. The viral suspension was then removed and apical poles were washed with OptiMEM. The OptiMEM medium was removed and air-liquid interface was restored. Kinetic samplings and measures were performed at the specified timing and after the last sampling, cells were lysed in RLT buffer and stocked at  $-80^{\circ}\text{C}$  before RNA extraction. (C,D) Membrane resistance between the apical and basal pole was measured at each time-point. The resulting trans-epithelial resistance (TEER in  $\text{Ohms}/\text{cm}^2$ ) is represented in dotted line and color-coded in accordance with infectious condition (mock in white, H3N2 in green, influenza B in red and H1N1 in blue in panel C and blue for hRSV and green for hMPV-B in panel D). Viral production at the apical pole was assessed after apical medium collection at the indicated time-points: 24-48-72hpi for influenza viruses and 3dpi and 5 or 6dpi for hRSV and hMPV. Viral titers indicated at  $T = 0$  in correspond to the input viral load as validated by back-titration. For each time-point, MDCK (influenza virus) or LLC-MK2 cells (hRSV/hMPV) were incubated with serial dilutions from collected sample for the determination of viral titers. The specific parameters (infection protocol, MOI, time-points) previously optimized allow a precious and precise infection monitoring with appropriate viral replication (increasing titers) and a dropping mobility capacity of cilium.

(PCA) was performed after data normalization, to assess if the generated data could allow differential clustering between experimental infections and the mock condition. The PCA shows a clear first level of differential clustering between the members of the *Orthomyxoviridae* and *Pneumoviridae* families, but also enables the specific distinction of mock-, Influenza-, hMPV- and hRSV-infected HAE (Fig. 3). Interestingly, differences were tenuous between influenza virus types and subtypes. Based on these PCA clustering results, we postulated that a deeper study of transcriptomic signatures through detailed comparative analysis of differentially modulated genes would provide significant insight on putative inter- and intra-virus family common or distinctive infection features.

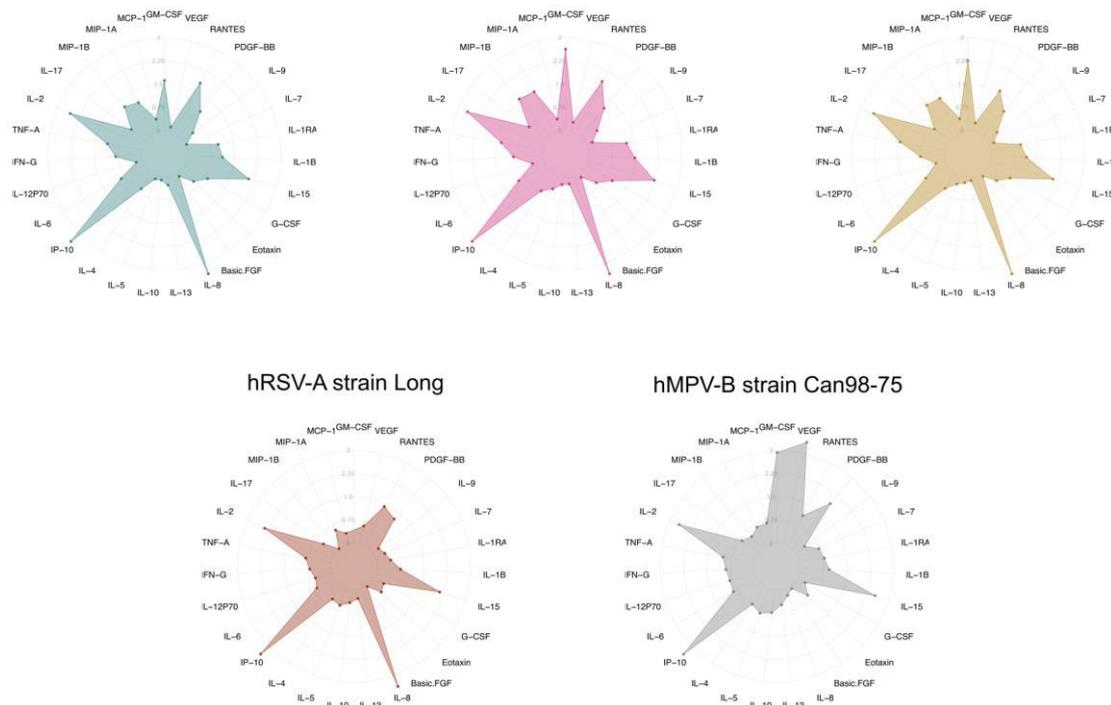
#### General common and specific features of virogenomic signatures of infection in HAE.

Differential expression was calculated by comparing each condition to the mock using a linear model, corrected with the Holm method to control the false discovery rate. Genes with an absolute fold change  $>2$  and a corrected  $p$ -value  $< 0.05$  were considered to be differentially expressed. A validation by RT-qPCR was performed on several genes (Supplementary Fig. 1). As shown in Table 1 and Fig. 4 (set size), the number of deregulated genes in the context of hRSV/hMPV infections was lower than that associated with influenza viruses. In addition, whereas the proportion of up-/down-regulated genes was well equilibrated for influenza H1N1 and B viruses, we observed a

Influenza A/Lyon/969/2009 (H1N1)

Influenza A/Texas/50/2012 (H3N2)

Influenza B/Massachusetts/2/2012

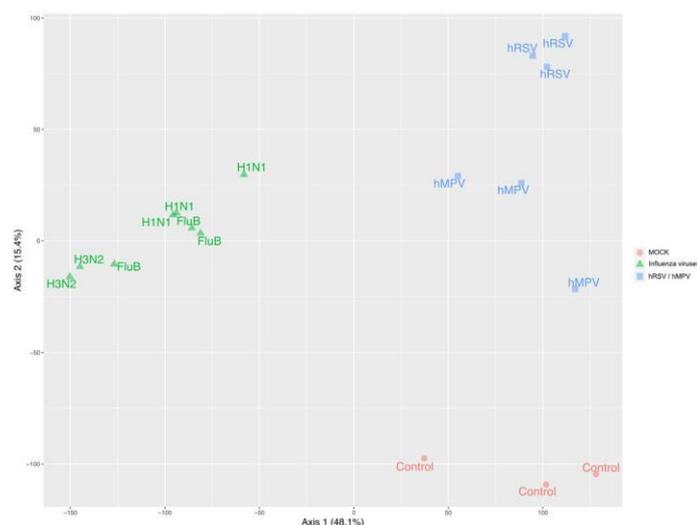


**Figure 2.** Comparison of immunity-related protein secretion profiles of infected airway epithelia. Chemokines and cytokines (FGF basic, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17A, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , PDGF-BB, RANTES, TNF- $\alpha$  and VEGF) harvested at the apical pole were quantified on a FLEXMAP 3D analyzer (Luminex, Austin, Texas, USA). Cytokine concentration values are represented in log<sub>10</sub>-transformation of the ratio (viral cytokine concentration) / (mock cytokine concentration). Because no signal could be assessed for GM-CSF in the case for hRSV, this specific point was set at 0. Each radar chart accounts for the 27 cytokine/chemokine levels in each viral infection.

sharp disequilibrium in favor of up-regulated genes for hMPV, or down-regulated genes for influenza H3N2 and hRSV.

Following this initial observation, we separately analyzed the set of up-regulated (Fig. 4A) and down-regulated genes (Fig. 4B). We first focused our attention on the common set of genes differentially modulated by the 5 viruses studied, which could be considered as the main components of the global virogenomic signature of the infection state (black stars in Fig. 4A,B). This intersection signature consists of a set of 112 up-regulated genes (Fig. 4A) and 98 down-regulated genes (Fig. 4B) that represent around 7.9% and 5.6% of the total number of deregulated genes in the context of infection, respectively. Interestingly, these global signatures represent a large part of the hRSV (more than 37% of up-regulated genes in hRSV-infected HAE) and hMPV (more than 53% of down-regulated genes in hMPV-infected HAE) signatures (Fig. 4 and Table 1). As expected, different influenza viruses share a large set of deregulated genes, notably 156 up-regulated and 180 down-regulated genes. On the other hand, we also investigated the unique sets of genes exclusively modulated by each of the individual viruses tested (red dots in Fig. 4A,B). It is worth noting that these specific sets of genes represented an important proportion of the virogenomic signatures of each virus, particularly in the case of influenza A/Texas/50/2012 (H3N2), in which the number of genes specifically up-regulated ( $n = 181$ , Fig. 4A), and down-regulated ( $n = 441$ , Fig. 4B) represented almost 29% of the global H3N2 virogenomic signature. Overall, these results suggest that, at least in our experimental conditions, it is possible to identify both common and virus-specific features of how respiratory viral infections impact the cellular transcriptome, even when the compared viruses are very close (*e.g.* influenza viruses of the same type).

**Interferon/immune responses and cilium assembly/morphogenesis constitute the hallmarks of viral respiratory infection in HAE.** To provide further functional interpretation of the virogenomic signatures in HAE, we then performed a Gene Ontology (GO)-based functional enrichment analysis using the web-based DAVID toolkit. GO terms, and more particularly Biological Processes (BP), were considered enriched when their Benjamini-Hochberg corrected enrichment  $p$ -value was  $< 0.01$ . We first focused on BP enrichment



**Figure 3.** Principal component analysis (PCA) plot depicts significant differences between virus-induced transcriptomic signatures. Abundances in TPM (Transcripts Per Kilobase Million), counts and metadata were combined in a raw expression matrix. HAE infected by viruses belonging to the *Orthomyxoviridae* family (H3N2, H1N1, FluB) are color-coded in green, hMPV and hRSV in blue and mock-infected in red. The component 1 accounts for 48.1% of the total variance of the dataset whereas the second one accounts for 15.4%. The PCA plot showed a distinct progression of differential gene expression mainly between control – influenza and hRSV/hMPV conditions.

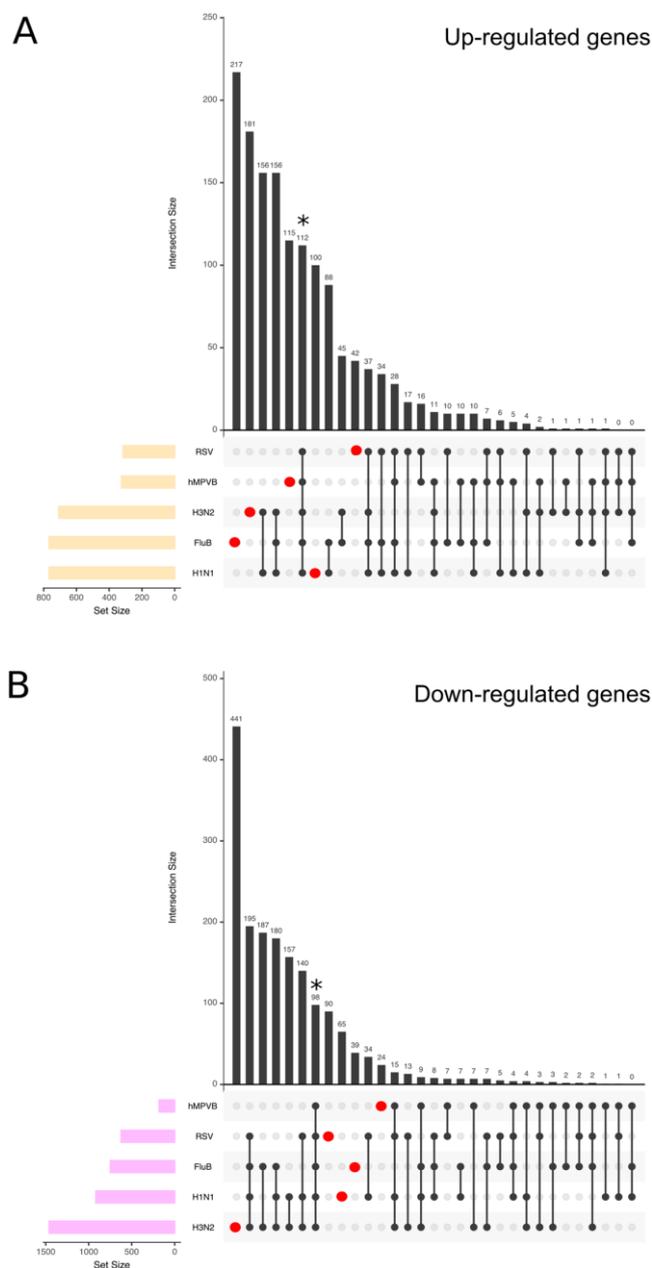
|                                  | Genes Up | Genes Down |
|----------------------------------|----------|------------|
| Influenza A/Lyon/969/2009 (H1N1) | 770      | 918        |
| Influenza A/Texas/50/2012 (H3N2) | 709      | 1461       |
| Influenza B/Massachusetts/2/2012 | 767      | 790        |
| hMPV-B strain Can97-82           | 325      | 182        |
| hRSV-A strain Long               | 316      | 624        |

**Table 1.** Number of differentially over- or under-expressed genes compared to mock. Differential expression was calculated by comparing each condition to the mock using a linear model. The Holm procedure was used to control the false discovery rate. Genes with an absolute fold change  $>2$  and a corrected p-value  $<0.05$  were considered as differentially expressed.

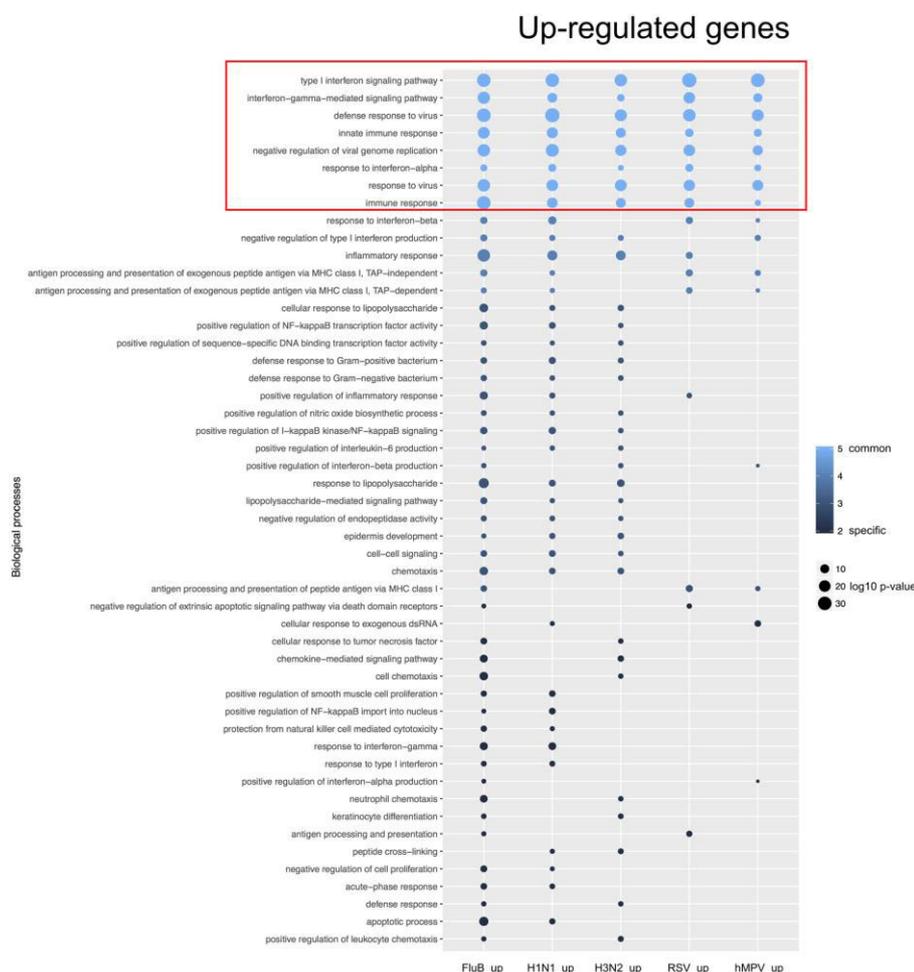
based on the list of up-regulated genes for each virus. Figure 5 shows the enriched BP shared by at least to different viruses. As anticipated, the most enriched BP common to all viruses were associated with Interferon response (IFN alpha - GO:0035455, IFN beta - GO:0035456 and IFN gamma - GO:0060333) and more largely Innate immune response (GO:0045087; GO:0006955) and negative regulation of viral genome (GO:0045071) (Fig. 5). Not surprisingly, a large part of the genes related with these GO terms correlate with the list of 112 up-regulated genes constituting the global virogenomic signatures of infection (black stars in Fig. 4A). Moreover, functional enrichment specific of the group of three influenza viruses studied was observed, notably through BP related to I-kappaB/NF-kappaB signaling (GO:0043123; GO:0042346; GO:0051092) or Apoptotic process (GO:0006915) (Fig. 5).

In parallel, we also performed an analogous analysis based on the list of down-regulated genes (Fig. 6A). A handful of BPs were identified as being associated with more than one virus, the most enriched BP common to all viruses being Cilium assembly (GO:0042384). Interestingly, other cilium-associated BP such as those related to Cilium morphogenesis or Cilium movement (GO:0060271; GO:0003341) were also enriched in four out of the fifth infections studied (H1N1, H3N2, FluB and hRSV). Most of the genes associated with these GO terms were present either in the list of 98 down-regulated genes constituting the global virogenomic signatures of infection or in the list of 195 down-regulated genes common to influenza viruses and hRSV (Fig. 4B). Interestingly, only the cilium-assembly BP was enriched in the context of hMPV infection, despite a similar number of downregulated genes compared to hRSV, suggesting major differences between these two Pneumoviruses.

To better illustrate the impact of infection on cilium-related BP, we used the list of genes associated to these BP and explored the functional association networks of their protein products using the STRING database<sup>19</sup>

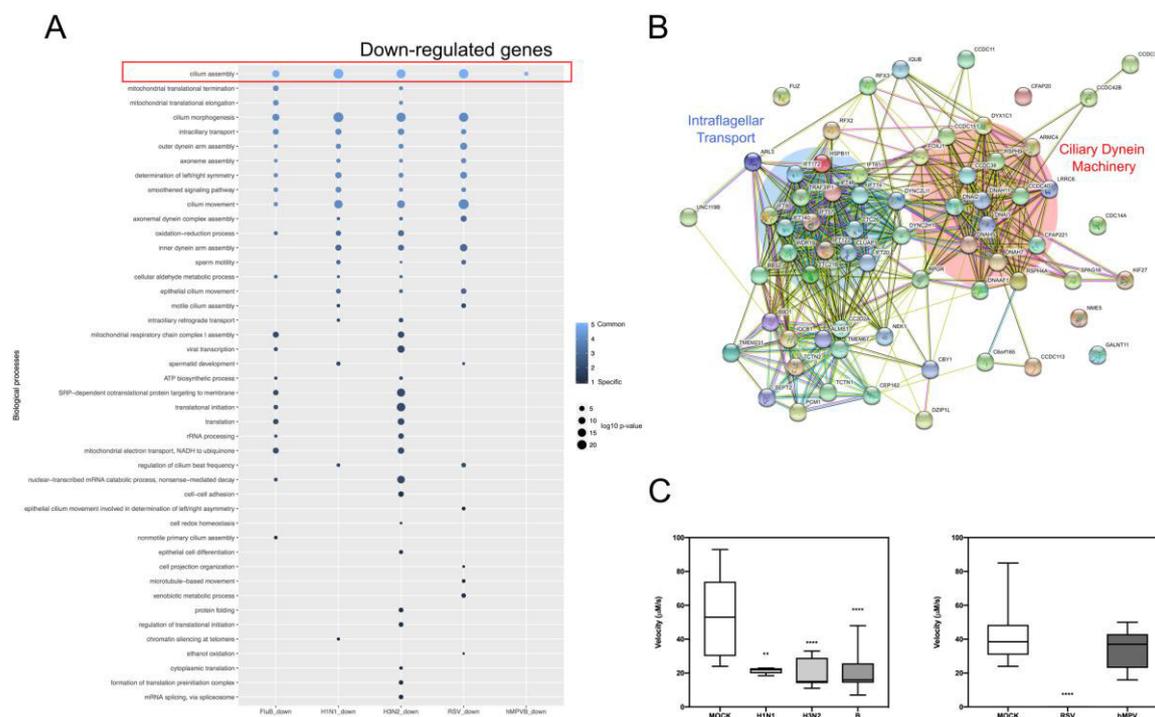


**Figure 4.** Intersections among host-infected signatures. Differential gene expression was calculated with a p-value threshold <0.05 and an absolute fold-change >2. Intersections among five viral signatures are shown. Panel A accounts for up-regulated genes and panel B for the down-regulated ones. The matrix of solid black or grey circles at the bottom illustrates the “presence” (black circle) or “absence” (grey circle) of the gene sets in each intersection. The numbers to the left of the matrix are set sizes. The colored bars on the top of the matrix represent the intersection sizes. hRSV and hMPV infections account for a lower number of genes differentially expressed and the H3N2 down-regulate the highest number of genes (>1000). 112 and 98 genes (black star) were commonly modulated in all infection studied but each infection also accounted for specific gene modulation (represented in red dots).



**Figure 5.** Up regulated genes mainly account for interferon/immune responses in viral-infected HAE. Enrichment was performed on each gene list (up-regulated genes) and biological processes enriched in a least one infection with a Benjamini corrected p-value inferior to 0.01 were plotted. The log<sub>10</sub>-transformed (Benjamini corrected enrichment p-value) is color-coded in a gradient from dark blue (specific to one infection) to pale blue (common between all five infections). Dot size is proportional to p-value. The absence of dot in a column signifies the absence of enrichment of this specific biological process with the defined thresholds. The only biological processes enriched in every infectious condition immune response related terms (type I interferon signaling pathway, response to virus, (defense) response to interferon-alpha, negative regulation of viral genome replication, interferon-gamma-mediated signaling pathway).

(<https://string-db.org>). As presented in Fig. 6B, this analysis highlighted a functional network based on 66 distinct proteins (nodes) and 488 protein-protein associations (edges). These associations, which indicate proteins sharing functions (not necessarily physical interaction), are organized in two major hubs concentrating a large number of edges. These two hubs regroup proteins related to ciliary dynein machinery and intraflagellar transport. Altogether, the results of gene enrichment analysis indicate that viral infections strongly impact the cilium-associated cellular machinery, in good agreement with different phenotypic observations. Indeed, beyond the fact that several measures, such as monitoring of TEER (Fig. 1C), suggest that, at least for influenza viruses, infection strongly impacts HAE physiology, we also obtained strong evidence of the negative impact of viral infection on mucociliary clearance. As illustrated in Fig. 6C, using polystyrene microbeads, the mean clearance velocity was reduced by more than 2-fold compared to the Mock condition in the case of influenza H1N1 (p-value < 0.01) and H3N2 and B (p-value < 0.0001) (Fig. 6C, left panel). In the context of hRSV infection, the mucociliary movement was completely abolished (p-value < 0.001), whereas it was only slightly reduced in hMPV-infected HAE (Fig. 6C, right panel). This observation validates a significant reduction of mucociliary



**Figure 6.** Cilium assembly/morphogenesis is down-regulated in viral-infected HAE. The significant enriched biological processes (down-regulated genes) induced by viral infections and their associated Benjamini-corrected p-values are shown (panel A). The log10-transformed (Benjamini corrected enrichment p-value) is color-coded in a gradient from dark blue (specific to one infection) to pale blue (common between all five infections). Dot size is proportional to p-value. The absence of dot in a column signifies the absence of enrichment of this specific biological process with the defined thresholds. The cilium assembly is common between all infections. A functional network constructed with the STRING database was used to better visualize genes commonly modulated during infections (panel B). The two resulting hubs account for proteins related to ciliary dynein machinery and intraflagellar transport. Finally, for an extra-validation of the impact of viral infection on mucociliary clearance, the velocity (panel C) of polystyrene beads was measured at the surface of infected HAE, in the same experimental conditions (MOI, timing) for H1N1, H3N2 and B (left panel), or hRSV hMPV (right panel) and compared to the velocity of identical beads in mock-infected HAE. \*\*\* $p < 0.01$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$  compared to MOCK.

clearance consecutive to infection, and is in direct link with the described transcriptional downregulation of the cilium associated cellular machinery.

### Discussion

The main objective of this study was to perform a comparative analysis of transcriptomic signatures of infection among different major respiratory viruses (Influenza, hRSV and hMPV) in HAE. Since these viruses can cause relatively similar respiratory symptoms, it is indeed very interesting to compare their global impact at the level of their primary targets (e.g. respiratory cells) and consecutively better understand similarities and differences between viruses. It is worth noting that only few studies have performed such comparison, most of time limited to two viruses or viruses within the same family (e.g. among IAV subtypes), and with very specific and hence limited readouts (antiviral screening, miRNA profiling, etc)<sup>17,18,20,21</sup>. We advantageously used the HAE Mucilair model, which have been previously used in literature to study viral infections<sup>14–17,22,23</sup>. This experimental model constituted of human primary cells appears as an interesting compromise between the low availability/quantity/quality of clinical samples and the limited biological relevance of immortalized cell lines that are still widely used in fundamental research. A major challenge was to setup experimental conditions allowing a comparison between viruses that present different replicative and infectivity properties. After several setup preliminary experiments, we have defined adapted infection parameters (MOI, timing of infection, sampling time) for each virus in order to study and compare infections at a quite similar stage (during the viral peak). These conditions maximize the extent of HAE cells infected and hence ensure a transcriptional profile that will reflect a global state of infection. Interestingly, despite efficient infection, hRSV and hMPV did not significantly affect TEER values, in contrast with influenza viruses (Fig. 1), suggesting viral-dependent differences of impact on epithelium integrity. In addition we found that hMPV and hRSV viral peaks were reached much later than those of influenza viruses (Fig. 1),

which could be also explained by the inherent differences between viruses, but also by the differential mode of viral spreading from one cell to another<sup>24</sup>. Our results suggest that these inherent differences in viral replication kinetics observed in the clinic<sup>25</sup> are more authentically reproduced in the well-differentiated HAE model when compared to the classic monolayer cell lines widely used in the literature.

Another aim of the study was to couple transcriptomic data with different types of virological, immunological and physiological observations to highlight potential correlations that could help gain better insight from the comparative analysis of the different viruses studied. The use of the HAE model allowed us to monitor several parameters at comparable time points and to investigate possible correlations between phenotypic observations/physiological measures and virogenomic signatures. For example, we demonstrated that the viral peak was correlated with a marked decrease of TEER values and changes on the epithelial surface visible through optical microscopy in the case of influenza viruses (Fig. 1C), in good agreement with previously published observations by our group<sup>26</sup>. This inverse correlation could be linked with the strong negative impact of influenza viruses on the regulation of cilium-associated genes (Fig. 6), with a consecutive impact on epithelium integrity. The major enrichment of down-regulated cilium-associated genes observed was also clearly associated to a strong decrease of mucociliary clearance in the context of infection (Fig. 6C). Another interesting transversal observation was made at the cytokine level. Indeed, the retrospective analysis of our virogenomic profiles indicate a relatively good level of concordance between the regulation of genes coding cytokines/chemokines and the measure of cytokines by a multiplex immunoassay, as exemplified by IP-10 (and to a lesser extent RANTES, IL-6, MIP-1B, IL-1B or IL1-RA), in line with previous observations<sup>27</sup> (Fig. 2, Supplementary Fig. 1 and Table 2).

The comparative analysis of transcriptional profiles generated in this study allowed us to establish a common global virogenomic signature of infection, constituted by a subset of 112 up-regulated and 98 down-regulated genes (Fig. 4A,B) that reflect the host response to the different respiratory viruses. Interestingly, we found that, despite being relatively distinct in many aspects of their infection cycle and pathogenesis, viruses such as hMPV and influenza viruses share a large common signature, mostly through the upregulation of genes directly or indirectly involved in the IFN response (Fig. 5), and notably the type III (lambda) IFN response (Supplementary Fig. 1). Type III is major IFN known to be secreted by the human respiratory epithelium following influenza and hRSV infections *in vivo*<sup>28,29</sup>, which also illustrates the biological relevance of the HAE experimental model used in this study. In contrast, less information is available regarding the IFN response in hMPV-infected individuals, but some reports suggest that hMPV infection also induces type III IFN *in vivo*, yet at lower levels in the case of premature infants<sup>30,31</sup>. Whereas the nature of the viral inducers of this type III IFN response in HAE could (or not) be different between influenza, hRSV and hMPV, this response most certainly occurs *via* the same ligands and signaling components, a phenomenon that could be considered of great interest especially in the context of viral co-infections and also for the design of broad-spectrum antiviral therapeutic strategies. Another interesting common feature revealed by the global virogenomic signature shared between hRSV, hMPV and influenza viruses is the global downregulation of cilium-related genes, mostly related to intraflagellar transport and ciliary dynein machinery (Fig. 6B), whose protein products are critical for the assembly, maintenance and function of motile and sensory cilia<sup>32</sup>. These transcriptomic data were in good agreement with the indirect evaluation of mucociliary clearance, using polystyrene microbeads (Fig. 6C). The mucociliary clearance is one of the first and foremost, though often overlooked, lines of defense of the epithelium against infection<sup>33</sup>. Indeed, a relatively limited amount of data, mostly obtained in studies dedicated to influenza viruses and hRSV, is available regarding the impact of respiratory viruses on the epithelium cilia. More particularly, the impact of respiratory viral infections on cilium-related gene expression was not specifically investigated. Several reports indicate that influenza infection in airway epithelial experimental models results in a loss of ciliated cells and the associated impairment of mucociliary clearance, which could explain why a primary viral infection can “pave the way” for a secondary infection by other pathogens such as bacteria<sup>34,35</sup>. In addition, hRSV has also been reported to induce an increase on ciliary dyskinesia combined with ciliary loss and epithelial damage, hence resulting in a strong decrease of mucociliary clearance<sup>36</sup>. This interplay between respiratory viruses and the cilium-related machinery is of great interest, even more in the context of pathological defective mucociliary clearance such as cystic fibrosis, where co-infections are known to be associated with more severe respiratory pathologies<sup>37,38</sup>.

In conclusion, our descriptive study using a comparative transversal approach in a HAE model highlights several facets of the host responses that are common/specific to the infection process by different major respiratory viruses. Future investigations will focus more precisely on the specific virogenomic profile of hMPV in HAE, which appears to be relatively distinct to the other viruses studied. In addition, these data constitute a very interesting starting point for future studies focused on specific cellular factors, sometimes overlooked in previous studies performed in less relevant cellular models. Our work also indicates that it is possible to combine different types of experimental approaches and parameters in order to discriminate the etiology of respiratory viral infections with very similar clinical manifestations. In that regard, further development in this direction would be promising for the future characterization of new biomarkers or groups of biomarkers of diagnostic interest, or as surrogates for the efficacy evaluation of future innovative treatments. Finally, the virogenomic signatures of infection determined in this study could also be used for the future identification and repurposing of molecules for their broad-spectrum antiviral activities<sup>26</sup> and/or alternatively, the identification of new cellular targets of choice for the design of new host-targeted therapeutic approaches.

## Materials and Methods

**Cells and viruses.** Influenza A/Lyon/969/2009(H1N1) (2009 pandemic strain), B/Massachusetts/2/2012 and A/Texas/50/2012(H3N2) viral strains were produced in MDCK cells (ATCC CCL-34), using EMEM supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma Aldrich), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) (Lonza) and 1 µg/mL Lys-acetylated bovine pancreas trypsin at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Viral titers in plaque forming units (PFU/ml) and tissue culture infectious dose 50% (TCID<sub>50</sub>/mL) were determined in MDCK cells as previously

described<sup>39,40</sup>. Respiratory syncytial virus (hRSV-A Long strain ATCC-VR26) and human metapneumovirus (hMPV-B strain CAN97-82 (B1) and CAN98-75 (B2)) were produced in Hep-2 cells (ATCC CCL-23) and in LLCMK2 cells (ATCC CCL7), respectively, using EMEM supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma Aldrich), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) (Lonza), at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Viral stocks were titrated in tissue culture infectious dose 50% (TCID<sub>50</sub>/mL) in the case of hRSV and in fluorescent focus units (ffu/mL) in the case of hMPV, as previously described<sup>41</sup>.

**Viral infection in reconstituted human airway epithelium (HAE).** MucilAir HAE, reconstituted using human primary cells obtained from nasal biopsies, were purchased from Epithelix SARL (Geneva, Switzerland) and maintained in air-liquid interphase with specific culture medium in Costar Transwell inserts (Corning, NY, USA) according to the manufacturer's instructions. For infection experiments, apical poles were gently washed twice with warm OptiMEM medium (Gibco, ThermoFisher Scientific) and then infected with a 150 µL dilution of the different viruses in OptiMEM medium, at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1 (hMPV-B CAN97-82 and influenza B/Massachusetts/2/2012), 1 (RSV-A Long) or 10 (influenza A/Lyon/969/2009(H1N1) and influenza A/Texas/50/2012(H3N2)). After 1 h incubation at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, the viral suspension was removed and HAE were again gently washed with 300 µL of OptiMEM. For mock infection, the same procedure was performed using OptiMEM as the inoculum. For viral kinetics studies, apical sampling was performed between 24- and 72-hours post-infection (hpi) for influenza viruses, or at 3 and 5- or 6-days post-infection (dpi) respectively for hMPV and RSV. Collected samples were separated into 2 tubes: one for viral titration and one for cytokine assay. Variations in trans-epithelial electrical resistance ( $\Delta$  TEER) were measured using a dedicated volt-ohm meter (EVOM2, Epithelial Volt/Ohm Meter for TEER) and expressed as Ohm/cm<sup>2</sup>. At the end of viral kinetics (72 hpi, 5 dpi or 6 dpi), cells were harvested in RLT buffer (Qiagen) and total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). For indirect evaluation of mucociliary clearance, 10 µm-diameter polystyrene microbeads were seeded onto the apical surface of HAE. The particle movement was tracked using videomicroscopy and ImageJ software and was expressed as a velocity (µm/s).

**Multiplex immunoassay of cytokines/chemokines.** Samples collected at apical poles of HAE were screened for the presence of 27 human cytokines and chemokines, as previously described<sup>27</sup>, using the Bio-Plex Pro Human Cytokine Standard 27-Plex kit (Bio-Rad, Hercules, California, USA) on a FLEXMAP 3D analyzer (Luminex, Austin, Texas, USA). Concentrations outside the observation range were arbitrary replaced by zero (if the observation is reported below the detection threshold) or 800000 (if the observation was above the detection threshold). Mean signal was calculated for each condition. For comparison purpose, for each cytokine/chemokine, results were expressed as log-transformed ratio compared to Mock except for the RSV GM-CSF condition where no signal could be measured for which it was set to zero. Visualization of results was achieved using the fmsb R package.

**Real-time quantitative PCR.** Each HAE was lysed with 150 µL of RLT buffer (Qiagen) 72 h p.i, 5dpi or 6dpi for influenza viruses, hMPV and hRSV, respectively. Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. After reverse transcription, real-time qPCR was performed using the StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) in 96-well plates. qPCR primers (GAPDH: Hs02758991\_g1, IFNL1: Hs00601677\_g1, IFNL2: Hs00820125\_g1, IFIT2: Hs00533665\_m1, IFI44L: Hs00915292\_m1) and probe (TaqMan gene expression assays) were provided by Thermo Fisher Scientific. GAPDH was included in each well, in duplex, as the endogenous standard reference. Each sample was analyzed in duplicate, and the cycle threshold (Ct) values were normalized against the endogenous GAPDH reference. Relative changes in gene expression were determined using the  $\Delta\Delta$ Ct method and reported as the fold change relative to the uninfected mock control.

**Sample processing, RNA preparation and sequencing.** The Scriptseq complete Gold kit-Low Input (SCL6EP, Epicentre) was used according to manufacturer's instructions to prepare cDNA libraries from 200 ng of total RNA. Amplified and indexed libraries with primers provided in the ScriptSeq Index PCR Primers kit (RSBC10948, Epicentre) were quantified with QuBit and Bioanalyzer2100, pooled in equimolar concentrations and sequenced as 100 bp paired-end reads on an Illumina HiSeq. 2500 system (Illumina, Carlsbad, CA), with a required minimum of 40 million reads sequenced per sample. Conversion and demultiplexing of reads were performed using bcl2fastq 1.8.4 (Illumina). The FastQC software (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) was used for quality controls of the raw data. Reads were trimmed using the Trimmomatic software<sup>42</sup>, with a minimum quality threshold of Q30. Reads were pseudo-aligned to the Homo sapiens genome (GRCh38.p11) using the Kallisto software<sup>43</sup>. The results of the main quantification (abundance estimate in Transcripts Per Million) were used for principal component analysis (PCA) with the R packages factoextra and FactoMineR<sup>44</sup>. Statistical analysis was performed in R3.3.1 with the package EdgeR 3.14.0<sup>45</sup>. Differential expression was calculated by comparing each condition to the mock using a linear model. The Holm procedure was used to control the false discovery rate. Genes with an absolute fold change >2 and a corrected p-value < 0.05 were considered to be differentially expressed. Visualization of subsequent analysis results was achieved using the UpsetR and ggplot2 R packages.

**Functional analysis.** Pathway and functional enrichment analysis were carried out using the web-based tool DAVID v6.8 (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery)<sup>46</sup>. GO terms and pathways were considered enriched when their Benjamini-Hochberg corrected enrichment p-value was below 0.01.

## References

- Williams, B. G., Gouws, E., Boschi-Pinto, C., Bryce, J. & Dye, C. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. *Lancet Infect. Dis.* **2**, 25–32 (2002).
- Mandell, L. A. Etiologies of Acute Respiratory Tract Infections. *Clin. Infect. Dis.* **41**, 503–506 (2005).
- WHO | Acute respiratory infections. WHO Available at, [http://apps.who.int/vaccine\\_research/diseases/ari/en/index.html](http://apps.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/index.html). (Accessed: 3rd June 2016).
- Seo, Y. B. *et al.* Etiology and Clinical Outcomes of Acute Respiratory Virus Infection in Hospitalized Adults. *Infect. Chemother.* **46**, 67–76 (2014).
- Dasaraju, P. V. & Liu, C. Infections of the Respiratory System. in *Medical Microbiology* (ed. Baron, S.) (University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996).
- Hancock, A. S. *et al.* Transcriptome Analysis of Infected and Bystander Type 2 Alveolar Epithelial Cells during Influenza A Virus Infection Reveals *In Vivo* Wnt Pathway Downregulation. *J. Virol.* **92** (2018).
- Parnell, G. P. *et al.* A distinct influenza infection signature in the blood transcriptome of patients with severe community-acquired pneumonia. *Crit. Care Lond. Engl.* **16**, R157 (2012).
- Zhang, N. *et al.* Whole transcriptome analysis reveals differential gene expression profile reflecting macrophage polarization in response to influenza A H5N1 virus infection. *BMC Med. Genomics* **11**, 20 (2018).
- Ampuero, S. *et al.* Time-course of transcriptome response to respiratory syncytial virus infection in lung epithelium cells. *Acta Virol.* **62**, 310–325 (2018).
- Steerman, Y. *et al.* Dissection of Influenza Infection *In Vivo* by Single-Cell RNA Sequencing. *Cell Syst.* **6**, 679–691.e4 (2018).
- Josset, L. *et al.* Gene expression signature-based screening identifies new broadly effective influenza A antivirals. *PLoS One* **5** (2010).
- Terrier, O. *et al.* Cellular transcriptional profiling in human lung epithelial cells infected by different subtypes of influenza A viruses reveals an overall down-regulation of the host p53 pathway. *Virol. J.* **8**, 285 (2011).
- Schmolke, M., Viemann, D., Roth, J. & Ludwig, S. Essential impact of NF-kappaB signaling on the H5N1 influenza A virus-induced transcriptome. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 5180–5189 (2009).
- Villeneuve, R., Shields, M. D. & Power, U. F. Respiratory syncytial virus interaction with human airway epithelium. *Trends Microbiol.* **21**, 238–244 (2013).
- Brookes, D. W., Miah, S., Lackenby, A., Hartgroves, L. & Barclay, W. S. Pandemic H1N1 2009 influenza virus with the H275Y oseltamivir resistance neuraminidase mutation shows a small compromise in enzyme activity and viral fitness. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 466–470 (2011).
- van Doremalen, N. *et al.* A Single Amino Acid in the HA of pH1N1 2009 Influenza Virus Affects Cell Tropism in Human Airway Epithelium, but Not Transmission in Ferrets. *PLoS ONE* **6**, e25755 (2011).
- Boda, B. *et al.* Antiviral drug screening by assessing epithelial functions and innate immune responses in human 3D airway epithelium model. *Antiviral Res.* **156**, 72–79 (2018).
- González-Parra, G. *et al.* A comparison of RSV and influenza *in vitro* kinetic parameters reveals differences in infecting time. *PLoS One* **13**, e0192645 (2018).
- Szklarczyk, D. *et al.* The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res.* **45**, D362–D368 (2017).
- Choi, W.-S. *et al.* Screening for Neuraminidase Inhibitor Resistance Markers among Avian Influenza Viruses of the N4, N5, N6, and N8 Neuraminidase Subtypes. *J. Virol.* **92** (2018).
- Terrier, O. *et al.* Host microRNA molecular signatures associated with human H1N1 and H3N2 influenza A viruses reveal an unanticipated antiviral activity for miR-146a. *J. Gen. Virol.* **94**, 985–995 (2013).
- Reus, A. A. *et al.* Feasibility of a 3D human airway epithelial model to study respiratory absorption. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* **28**, 258–264 (2014).
- Essaidi-Laziosi, M. *et al.* Propagation of respiratory viruses in human airway epithelia reveals persistent virus-specific signatures. *J. Allergy Clin. Immunol.* **141**, 2074–2084 (2018).
- Cifuentes-Muñoz, N., Dutch, R. E. & Cattaneo, R. Direct cell-to-cell transmission of respiratory viruses: The fast lanes. *PLoS Pathog.* **14**, e1007015 (2018).
- Bagga, B. *et al.* Comparing influenza and RSV viral and disease dynamics in experimentally infected adults predicts clinical effectiveness of RSV antivirals. *Antivir. Ther.* **18**, 785–791 (2013).
- Pizzorno, A. *et al.* Repurposing of Drugs as Novel Influenza Inhibitors From Clinical Gene Expression Infection Signatures. *Front. Immunol.* **10** (2019).
- Hoffmann, J. *et al.* Viral and bacterial co-infection in severe pneumonia triggers innate immune responses and specifically enhances IP-10: a translational study. *Sci. Rep.* **6**, 38532 (2016).
- Andreakos, E., Salagianni, M., Galani, I. E. & Koltsida, O. Interferon-λs: Front-Line Guardians of Immunity and Homeostasis in the Respiratory Tract. *Front. Immunol.* **8**, 1232 (2017).
- Wells, A. I. & Coyne, C. B. Type III Interferons in Antiviral Defenses at Barrier Surfaces. *Trends Immunol.* **39**, 848–858 (2018).
- Uche, I. K. & Guerrero-Plata, A. Interferon-Mediated Response to Human Metapneumovirus Infection. *Viruses* **10** (2018).
- Pancham, K. *et al.* Premature infants have impaired airway antiviral IFN $\gamma$  responses to human metapneumovirus compared to respiratory syncytial virus. *Pediatr. Res.* **78**, 389–394 (2015).
- Scholey, J. M. Intraflagellar transport motors in cilia: moving along the cell's antenna. *J. Cell Biol.* **180**, 23–29 (2008).
- Vareille, M., Kieninger, E., Edwards, M. R. & Regamey, N. The Airway Epithelium: Soldier in the Fight against Respiratory Viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**, 210–229 (2011).
- Smith, C. *et al.* Influenza virus infection of human ciliated respiratory epithelial cells in culture. *Eur. Respir. J.* **42**, P4406 (2013).
- Wu, N.-H. *et al.* The differentiated airway epithelium infected by influenza viruses maintains the barrier function despite a dramatic loss of ciliated cells. *Sci. Rep.* **6**, 39668 (2016).
- Smith, C. M. *et al.* Ciliary dyskinesia is an early feature of respiratory syncytial virus infection. *Eur. Respir. J.* **43**, 485–496 (2014).
- Hendricks, M. R. & Bomberger, J. M. Digging through the Obstruction: Insight into the Epithelial Cell Response to Respiratory Virus Infection in Patients with Cystic Fibrosis. *J. Virol.* **90**, 4258–4261 (2016).
- McCullers, J. A. The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 252–262 (2014).
- Pizzorno, A., Bouhy, X., Abed, Y. & Boivin, G. Generation and Characterization of Recombinant Pandemic Influenza A(H1N1) Viruses Resistant to Neuraminidase Inhibitors. *J. Infect. Dis.* **203**, 25–31 (2011).
- Moules, V. *et al.* *In vitro* characterization of naturally occurring influenza H3NA- viruses lacking the NA gene segment: toward a new mechanism of viral resistance? *Virology* **404**, 215–224 (2010).
- Dubois, J. *et al.* Mutations in the fusion protein heptad repeat domains of human metapneumovirus impact on the formation of syncytia. *J. Gen. Virol.* **98**, 1174–1180 (2017).
- Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinform. Oxf. Engl.* **30**, 2114–2120 (2014).
- Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P. & Pachter, L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat. Biotechnol.* **34**, 525–527 (2016).
- Lê, S., Josse, J. & Husson, F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *J. Stat. Softw.* **25**, 1–18 (2008).

45. Robinson, M. D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **26**, 139–140 (2010).
46. Dennis, G. Jr. *et al.* DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* **4**, (P3 (2003)).

### Acknowledgements

The authors want to thank Jacques Corbeil and Frederic Raymond (Research Center in Infectious Diseases of the CHU de Quebec and Laval University, Quebec) for their help and useful advice. This work was funded by grants from FINOVI foundation, the Région Auvergne Rhône-Alpes (CMIRA No. 14007029 and AccueilPro COOPERA No. 15458 grants), and Canadian Institutes of Health Research (No. 229733 and 230187). Claire Nicolas de Lamballerie was funded by National Association for Research in Technology (ANRT). Guy Boivin is the holder of the Canada Research Chair on influenza and other respiratory viruses. Funding institutions had no participation in the design of the study, collection, analysis and interpretation of data, or in the writing of the manuscript.

### Author Contributions

C.N.d.L., A.P., J.D., T.J., B.P., M.B., A.T., C.L.L., B.L., G.B., O.T. and M.R.C. carried out the experiments and analysis of the results. C.N.d.L., A.P., C.L.L., B.L., G.B., O.T. and M.R.C. participated to conception and coordination of the study. C.N.d.L., A.P., C.L.L., B.L., G.B., O.T. and M.R.C. designed the study and wrote the manuscript.

### Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48013-7>.

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

### II.3. Discussion et perspectives de ce travail

Le premier objectif de cette étude était de mettre en place au laboratoire ce modèle innovant et d'évaluer son potentiel pour l'établissement de signatures transcriptomiques en RNAseq. Nous avons donc choisi de réaliser une analyse comparative des signatures transcriptomiques d'infection par 5 virus respiratoires majeurs (IAV, IBV, HRSV et HMPV), afin de mieux comprendre leur influence sur leurs cibles cellulaires, les cellules épithéliales respiratoires. Ces virus provoquent des symptômes respiratoires relativement similaires, il est donc très intéressant de comparer leur impact global pour mieux comprendre les similitudes et les différences entre les virus.

Le modèle Mucilair™ a déjà été décrit pour l'étude de l'absorption respiratoire de composés divers<sup>522</sup> (antipyrine, caféine, naproxène, propranolol, mannitol, insuline, etc.) ou des criblages d'antiviraux<sup>523</sup>. Ce modèle expérimental constitué de cellules primaires humaines apparaît comme un compromis intéressant entre la faible disponibilité, quantité ou qualité des échantillons cliniques et la pertinence biologique limitée des lignées cellulaires immortalisées.

La première étape de notre étude a été de mettre en place des conditions expérimentales permettant une comparaison entre les virus (MOI, *timing* de l'infection, fréquence d'échantillonnage) à un stade d'étude similaire (pic viral), malgré leurs différences inhérentes et notamment leur mode de propagation distinct. L'un des premiers résultats a été l'observation du retard d'apparition des pics viraux des pneumovirus (5-6 jours post-infection contre 72h pour les virus influenza) et le faible effet de ces infections sur les valeurs de TEER malgré une infection efficace. La diminution marquée des valeurs TEER dans les cas d'infection par les virus influenza est associée à de profonds changements phénotypiques observables par microscopie optique. Nous avons par exemple observé une nette diminution de la clairance muco-ciliaire lors d'une infection par H1N1, que nous avons pu coupler aux résultats de transcriptome. En effet, les analyses d'enrichissement ont révélé une sous-expression majeure des gènes associés aux cils (transport intraflagellaire et machinerie ciliaire de la dynéine), totalement en accord avec les observations phénotypiques / mesures physiologiques réalisées. L'impact fort des virus sur l'épithélium se manifeste aussi par son action sur la machinerie immunitaire (enrichissements très significatifs de termes associés aux mécanismes de défense de l'hôte), que nous avons pu quantifier au niveau des cytokines (immunodétection de 27 cytokines pro et anti-inflammatoires), notamment IP-10, RANTES, IL-6, MIP-1B, IL-1B ou IL1-RA.

Nous avons établi une signature virogénomique globale de l'infection (112 gènes sur- et 98 gènes sous-exprimés) partagée par l'ensemble des virus respiratoires étudiés. Malgré leurs différences intrinsèques, les virus partagent une signature commune, principalement composée de gènes directement ou indirectement impliqués dans la réponse interféron, et notamment la réponse IFN de type III, ce qui corrèle parfaitement avec les données disponibles par ailleurs, notamment *in vivo*<sup>524,525</sup>. En miroir à cet enrichissement (parmi les gènes surexprimés) des voies associées à la

réponse immunitaire, on observe la sous-expression généralisée des gènes associés à l'assemblage ou la morphogénèse des cils et au transport intra-ciliaire, illustrant à nouveau la pertinence biologique du modèle expérimental utilisé dans cette étude.

Nous avons choisi de prendre en main un modèle innovant et de le challenger avec des virus bien connus au laboratoire, afin de mieux cerner les possibilités de ce modèle HAE. Dans notre étude, nous avons uniquement utilisé le modèle Mucilair™ d'origine nasale. Depuis ces travaux, d'autres modèles d'origine bronchique et bronchiolaire ont été employés au laboratoire. De la même manière, des épithéliums sains ou pathologiques (asthme, BPCO, mucoviscidose, rhinite allergique ou fumeur) ont également été exploités. L'intégration de données obtenues à partir de ces différents modèles est en parfaite adéquation avec les problématiques de repositionnement de molécules du laboratoire, pour (i) mieux comprendre les impacts de différents virus ou médicaments sur un épithélium sain ou pathologique et (ii) prédire les possibles complications inhérentes aux pathologies individuelles, pour adapter en conséquence les posologies ou modes d'administration par exemple.

Notre démarche s'inscrit dans une dynamique de développement de modèles *in vitro* plus physiologiques que les lignées cellulaires. D'autres modèles tels que des organoïdes sont décrits dans la littérature (structures 3D auto-organisées issues de cellules souches qui récapitulent les aspects essentiels de la structure et de la fonction des organes). Pour les voies respiratoires humaines, ces modèles sont générés à partir de matériels de lavages par exemple<sup>526</sup> pour l'étude *in vitro* de maladies pulmonaires héréditaires, malignes et infectieuses. D'autres technologies voient aussi le jour comme le prototype de « *lung-on-chip* », proposé par la société AlveoliX. Ce modèle complexe a pour ambition de reproduire l'environnement biophysique du poumon humain, y compris le stress mécanique induit par la respiration. La membrane alvéolaire, support de culture, subit donc des mouvements cycliques d'aspiration induits par un micro-diaphragme (pompe externe électropneumatique). Ces modèles toujours plus performants permettent aux équipes de recherche de mieux prédire la réponse d'un organisme à un traitement, notamment dans l'optique d'une médecine individuelle, par exemple dans le cas de la mucoviscidose pour laquelle les traitements ont des efficacités très différentes entre patients. De nombreuses équipes se sont lancées sur ce marché d'« *organ-on-chips* », pour la conception de dispositifs de culture microfluidique qui imitent la microarchitecture et les fonctions de divers organes humains vivants, notamment les poumons, l'intestin, les reins, la peau, la moelle osseuse, etc<sup>526,527</sup>.

Les résultats obtenus dans le cadre de notre étude assoient notre choix de travail avec le modèle HAE physiologiquement pertinent, mais ouvrent aussi la voie à l'étude de facteurs cellulaires spécifiques, biomarqueurs ou encore l'identification et le repositionnement de médicaments selon notre stratégie innovante. Cette preuve de concept nous conforte non seulement dans l'emploi de ce

modèle pour l'étude des infections virales respiratoires, mais aussi dans l'intérêt fort de préférer le séquençage à haut débit pour la suite des études poursuivies au laboratoire.

Dans notre démarche de crible de molécules antivirales, nous n'avons pas délaissé l'usage de lignées cellulaires respiratoires, qui sont toujours avantageusement utilisées pour les étapes préliminaires de crible à plus large échelle et pour l'établissement de données concernant la cytotoxicité des molécules ainsi que leurs doses efficaces. Une fois ces données préliminaires acquises, le modèle HAE est alors exploité pour l'évaluation des candidats antiviraux sélectionnés grâce à sa versatilité qui nous permet de monitorer plusieurs paramètres physiologiques, en parallèle des propriétés antivirales des molécules, seules ou en combinaison, à des concentrations différentes, en traitement apical ou basal, en application unique ou répétée, sur un épithélium sain ou pathologique, infecté ou non. Nous évaluons présentement plusieurs molécules candidates anti-HRSV et anti-HMPV, parallèlement aux cribles initiés dans l'urgence de molécules anti-SARS-CoV-2. Nous avons aussi débuté l'établissement et l'analyse de signatures transcriptomiques de molécules d'intérêt sur ces modèles HAE afin de parfaire notre compréhension de leur(s) mode(s) d'action (cf. étude FLUNEXT) et constituer une base de données de signatures de référence, plus légitimes que celles disponibles dans la base de données CMap, qui ne s'appuie que sur des lignées cellulaires immortalisées et / ou transformées.

Afin de compléter l'optimisation de la stratégie de repositionnement engagée au laboratoire, l'étude prospective d'échantillons cliniques et leur séquençage sera systématiquement effectué. Une comparaison de ces signatures avec celles obtenues en épithélium reconstitué sera réalisée pour compléter notre compréhension de l'infection et des effets des traitements.



### III . Signature transcriptomique *in vivo* d'infection à HRSV (Programme RESPIROMIX)

Dans la dynamique du programme RESPIROMIX, dont la stratégie est illustrée en Figure 34, nous avons exploité avantageusement (i) les collections biologiques de patients établies par le laboratoire (VirPath, UCBL-HCL) et celles des partenaires du CIIL et du CHRU de Lille, de l'institut Pasteur, ainsi que de l'Université Laval et du CHU de Québec, et (ii) le modèle d'infection *in vitro* d'épithéliums respiratoires reconstitués. Un premier travail, effectué en collaboration étroite avec la société lyonnaise ViroScan3D, spécialisée dans l'exploitation d'échantillons infectieux de qualité et quantité faibles, a permis de générer des signatures transcriptomiques d'infections à HRSV chez des patients pédiatriques. Ces résultats ont fait l'objet d'un article scientifique dans le journal international à comité de lecture en langue anglaise *The Journal of Infectious Diseases* (JID) et disponible en ligne sur la plateforme bioRxiv (DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.05.20.106492>).

Ce chapitre est consacré à la présentation du manuscrit intitulé « **Human Respiratory Syncytial Virus-induced immune signature of infection revealed by transcriptome analysis of clinical pediatric nasopharyngeal swab samples** », dont les auteurs sont Claire Nicolas de Lamballerie, Andrés Pizzorno, Julia Dubois, Blandine Padey, Thomas Julien, Aurélien Traversier, Julie Carbonneau, Elody Orcel, Bruno Lina, Marie-Eve Hamelin, Magali Roche, Julien Textoris, Guy Boivin, Catherine Legras-Lachuer, Olivier Terrier, Manuel Rosa-Calatrava.

#### III . 1 . Résumé

Dans un contexte d'absence totale de traitement contre les infections au HMPV et de solutions thérapeutiques très limitées pour les infections au HRSV, les infections aux pneumovirus constituent un enjeu sanitaire majeur. Les nombreux échecs des stratégies ciblant le virus, parfois dans des étapes de développement avancées dans le cas du HRSV (par exemple, l'évaluation de la lumicitabine, analogue de nucléoside, polymérase ARN-dépendante, abandonnée en mars 2019, alors en essai de phase II), légitiment le développement de stratégies alternatives pour le développement d'antiviraux innovants. Notre étude s'est donc inscrite dans ce contexte en appliquant notre stratégie de repositionnement de molécules sur la base de signatures transcriptomiques cliniques des infections à pneumovirus.

Grâce à nos collaborations nationales et internationales, nous avons eu accès à des échantillons de lavages naso-pharyngés de patients pédiatriques infectés par ces pneumovirus. Peu de données sont à ce jour disponibles sur ce type d'échantillons respiratoires, puisque la plupart des études

transcriptomiques publiées concernent l'exploitation d'échantillons sanguins. La première étape de notre programme a donc consisté en la définition de la signature transcriptomique de patients infectés à partir de lavages naso-pharyngés.

Nous avons amélioré certaines étapes critiques de préparation d'échantillons cliniques complexes afin de remédier à l'état de dégradation de ceux-ci, sur la base de divers tests d'amplification. De plus, dans ce projet, nous avons aussi eu accès à des puces Affymetrix plus récentes permettant d'interroger un plus grand nombre de loci sur chaque exon (Human Gene 2.0 st), en comparaison de notre étude précédente FLUNEXT. En ce qui concerne les étapes d'analyse, nous avons délaissé l'algorithme MAXRS pour le pré-process des données brutes au profit d'une analyse plus classique en médiane.

Nous avons ainsi obtenu une signature transcriptomique de l'infection par le HRSV, composée de 296 gènes modulés (*fold change* absolu > 2, p valeur < 0.05), dont 258 (87%) ont été identifiés comme surexprimés. Nos résultats concordent avec la littérature puisque nous décrivons une majorité de gènes modulés relatifs à la réponse immunitaire de l'hôte ou aux réponses liées aux interférons. En effet, ces réponses sont caractéristiques de la cascade de réponse immunitaire innée, largement décrite comme associée à la pathologie induite par le HRSV. Cette cascade d'amplification de la réponse immunitaire complexifie le développement de vaccins anti-HRSV puisque des préparations à base de virus inactivé à la formoline ont été la cause de l'apparition d'une pathologie aggravée chez des enfants vaccinés infectés naturellement (saisons 1966-1967), avec une morbidité et une mortalité plus importante que chez les enfants non vaccinés<sup>528,529</sup>. Dans notre étude, 18 des 21 termes enrichis significativement (*fold enrichment* > 2, p valeur corrigée < 0.05) associés aux gènes surexprimés sont effectivement liés à la réponse immunitaire induite par l'infection (GO:0060337~voie de signalisation de l'interféron de type I, GO:0060333~voie de signalisation médiée par l'interféron gamma, GO:0045071~régulation négative de la réplication du génome viral, GO:0009615~réponse au virus, GO:0051607~réponse de défense au virus, etc.). En revanche, aucun processus biologique n'a été identifié comme significativement enrichi pour les gènes sous-régulés avec les seuils choisis.

Dans cet article, nous décrivons également la modulation (sur- et sous- expression) d'un panel de microARN dont les cibles prédites sont variées. En effet, l'infection au HRSV semble induire une diminution de l'expression de 10 microARN (hsa-miR-769, hsa-miR-4316, hsa-miR-54812, hsa-miR-3622A, hsa-miR-3143, hsa-miR-320C1, hsa-miR-663B, hsa-miR-1229, hsa-miR-486-2, hsa-miR-572) ciblant des gènes associés à la phagocytose (GO:0006909) ou à la transcription cellulaire (GO:0006351). De même, nous retrouvons 8 microARN surexprimés dans la condition infectée (VMP1/ hsa-miR-21, hsa-miR-4288, hsa-miR-3650, hsa-miR-4642, hsa-miR-500A, hsa-miR-328, NPC2/ hsa-miR-4709, C15orf48/ hsa-miR-147B), qui ciblent des gènes liés à divers processus biologiques comme la régulation négative de la prolifération des lymphocytes T (GO:0042130), la régulation du

transport transmembranaire ionique (GO:0034765) ou la libération de cytochrome c des mitochondries (GO:0001836).

Nous avons par la suite comparé nos résultats avec ceux obtenus par d'autres équipes de recherche sur des prélèvements sanguins pédiatriques afin de déterminer si nous pouvions établir une signature caractéristique du tissu nasal infecté. Le peu de recoupement entre les gènes significativement modulés dans les échantillons sanguins, les PBMC et le nez (ANXA3, FCGR1B, OASL, BCL2A1, CLEC4D, RSAD2) suggère en effet une signature nasale spécifique de l'infection, composée de 242 gènes, non modulés significativement dans les autres types de tissus. Ces gènes soulignent un certain bouleversement des voies de l'interféron et des voies de présentation et traitement de l'antigène peptidique exogène, notamment *via* le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I, dépendant de TAP (GO:0060337 et GO:0002479).

Nous avons enfin mis à profit le modèle d'épithélium respiratoire humain précédemment décrit, dans le contexte d'une infection par le HRSV, avec un suivi jusqu'à 6 jours post-infection. La technologie nCounter de Nanostring nous a ensuite permis d'évaluer les modulations d'expression de 94 gènes lors d'une infection *in vitro* par HRSV. Le panel de gènes choisi interroge des gènes liés à la production de cytokines, à la prolifération des cellules T ou plus généralement à l'immunité innée cellulaire. Grâce à cette approche complémentaire, nous avons pu valider en modèle *in vitro* HAE, le bouleversement des voies associées à la réponse immunitaire de l'hôte dans un contexte d'infection par le HRSV.



### Title

Human Respiratory Syncytial Virus-induced immune signature of infection revealed by transcriptome analysis of clinical pediatric nasopharyngeal swab samples

### Authors

Claire NICOLAS DE LAMBALLERIE<sup>1,2</sup>, Andrés PIZZORNO<sup>1</sup>, Julia DUBOIS<sup>1</sup>, Blandine PADEY<sup>1</sup>, Thomas JULIEN<sup>1,3</sup>, Aurélien TRAVERSIER<sup>1</sup>, Julie CARBONNEAU<sup>4</sup>, Elody ORCEL<sup>2</sup>, Bruno LINA<sup>1</sup>, Marie-Eve HAMELIN<sup>4</sup>, Magali ROCHE<sup>2</sup>, Julien TEXTORIS<sup>5</sup>, Guy BOIVIN<sup>4</sup>, Catherine LEGRAS-LACHUER<sup>2,6</sup>, Olivier TERRIER<sup>1#</sup>, Manuel ROSA-CALATRAVA<sup>1,3#</sup>

#OT and MRC are co-last authors

### Affiliations

- 1) CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, (Team VirPath), Univ Lyon, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, F-69007, Lyon, France.
- 2) Virosan3D SAS, Lyon 69008, France.
- 3) VirNext, Faculté de Médecine RTH Laennec, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon 69008, France.
- 4) Research Center in Infectious Diseases of the CHU de Quebec and Laval University, Quebec City, QC G1V 4G2, Canada.
- 5) Pathophysiology of Injury-Induced Immunosuppression (PI3), EA 7426 Hospices Civils de Lyon, bioMérieux, Université Claude Bernard Lyon 1, Hôpital Edouard Herriot, Lyon 69003, France.

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, e-mail: journals.permissions@oup.com.

6) Ecologie Microbienne, UMR CNRS 5557, USC INRA 1364, Université Claude Bernard  
Lyon 1, Université de Lyon, Villeurbanne 69100, France.

**Corresponding authors**

olivier.terrier@univ-lyon1.fr; manuel.rosa-calatrava@univ-lyon1.fr

**Short summary**

In this study, Nicolas de Lamballerie & colleagues applied a tailored transcriptomics workflow to exploit nasal wash samples from HRSV-positive hospitalized children. The transcriptional immune signature appears as a direct reflection of HRSV pathogenesis and highlights putative biomarkers of interest.

Accepted Manuscript

## **Abstract**

Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) constitutes one the main causes of respiratory infection in neonates and infants worldwide. Transcriptome analysis of clinical samples using high-throughput technologies remains an important tool to better understand virus-host complex interactions in the real-life setting but also to identify new diagnosis/prognosis markers or therapeutics targets. A major challenge when exploiting clinical samples such as nasal swabs, washes or bronchoalveolar lavages is the poor quantity and integrity of nucleic acids. In this study, we applied a tailored transcriptomics workflow to exploit nasal wash samples from children who tested positive for HRSV. Our analysis revealed a characteristic immune signature as a direct reflection of HRSV pathogenesis and highlighted putative biomarkers of interest such as IP-10, TMEM190, MCEMP1 or TIMM23.

## **Keywords**

Respiratory Syncytial Virus; DNA microarray; Transcriptome; Nasal epithelium; NanoString assay

## Background

Respiratory Syncytial Virus (HRSV) constitutes one of the main causes of respiratory tract infection in newborns and young children worldwide [1] but also in the elderly, immunocompromised, and patients with chronic heart and lung conditions [2]. The global HRSV disease burden is estimated at approximately 200,000 deaths and more than 3 million hospitalizations per year [1,3]. Despite numerous attempts and ongoing clinical trials, no efficacious HRSV vaccine is yet available, and the specific therapeutic arsenal currently available is very limited and remains relatively expensive [4]. In this context, we urgently need to increase our understanding of HRSV pathogenesis and the multiple facets of its virus/host interactions.

Much of the HRSV-induced disease is considered as the reflection of the host innate immune response to infection [5,6], with respiratory epithelial cells and monocytes/macrophages being the main actors in this response [7,8]. Indeed, HRSV infection was previously shown to up-regulate the expression of host genes involved in the antiviral and cell-mediated immune responses, such as genes coding for interferons (IFNs) and more largely several cytokines/chemokines such as CXCL10/IP-10, CXCL8/IL-8, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 or IL6 [8]. For example, we previously demonstrated that HRSV infection, alone or in the context of bacterial co-infection, strongly promotes CXCL10/IP-10 expression in human macrophages [9]. We also showed that HRSV infection of human respiratory epithelial cells induces a strong disequilibrium in the p53/NF- $\kappa$ B balance, which appears to contribute to the up-regulation of several proinflammatory cytokines and chemokines [10]. One limitation of these *in vitro* approaches is that they do not necessarily reflect the whole complexity of the *in vivo* environment. In this context, we advantageously investigated the HRSV-induced host response using an innovative and highly relevant primary human reconstituted airway epithelial

model, cultivated at the air-liquid interface to assess previously undescribed facets of the HRSV biology, such as the impact of the infection on cilium mobility and morphogenesis [11].

The development of high-throughput “omics” approaches has contributed to deepen our understanding of the multiple levels of interplay between respiratory viruses and the host cell [12–15]. These approaches, in addition to be very informative about the dynamic interplay between the virus and the host and hence the pathogenesis mechanisms, could also constitute a powerful tool to identify new therapeutic targets and/or propose novel antiviral strategies. In the case of HRSV, few studies have investigated the transcriptomic host response using clinical specimens, and an even more limited number have exploited respiratory tract samples [16–18]. A major challenge associated with transcriptome analysis of clinical samples is the intrinsic low copy number and/or low integrity of the nucleic acids recovered. To tackle these hassles, several research groups, including ours, have proposed and developed adapted/optimized sample processes [19–21].

In this study, we investigated the impact of the infection on the host cell using nasal washes from hospitalized children with lab-confirmed HRSV infection. The analysis of HRSV-induced gene expression signature validated the importance of several IFN and cytokine-related pathways, in line with previous studies, but also provided valuable insight on potential biomarkers of diagnostic interest or as surrogates for the evaluation of future innovative treatments.

## **Methods**

### *Clinical samples and ethical considerations*

Written consent was obtained from parents of the three hospitalized children with lab-confirmed HRSV infections. Control samples come from the collection of samples established

by the Québec CHU in the context of RespiVir surveillance study. The protocol was approved by Ethics committee of the CHU de Québec-Université Laval. RNAs were obtained from nasal washes (in 1.5 mL saline) stored at -80°C. After thawing, the cell pellets were transferred to an RNAlater® Stabilization solution (Thermo Fisher Scientific).

#### *RNA extraction and microarray experiment*

Isolation of total RNA from nasal washes was performed using the RNeasy Micro kit (QIAGEN) with Dnase I treatment following the manufacturer's instructions. Samples were quantified using the Quantifluor RNA System (Promega) and qualified using Agilent RNA 6000 Pico chip on Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Whole RNA amplification using three rounds of in vitro transcription was then performed in two steps. First, the ExpressArt Trinucleotide mRNA amplification Pico kit (Amp Tec) was used for RNA amplification. Then, ss-cDNA synthesis was performed with the GeneChip® WT PLUS Reagent Kit (Affymetrix) with a minimal input requested of 5.5 µg. Labeled cRNA was hybridized to GeneChip Human Gene 2.0 ST Array (Affymetrix) for 16h at 45°C and scanned using the Affymetrix 3000 7G Scanner. .CEL file generation and basic quality controls were performed with the GeneChip™ Command Console® (Affymetrix).

#### *Data analysis*

Data were analyzed using the R software and its xps (eXpression Profiling System) package (version 1.32.0) downloaded from [www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org). Quality controls were performed to assess technical bias, RNA degradation levels and background noise. Preprocessing steps consisted in background correction, Robust Multichip Average (RMA) normalization, probe summarization, and log<sub>2</sub> transformation. A linear model was used to assess differential expression with the limma (Linear Models for Microarray Data) R/Bioconductor software

package [22]. Genes were considered for subsequent analysis if they exhibited at least a 2-fold change in expression levels compared to the control samples coupled with p-values < 0.05. In order to further functionally characterize the patient transcriptomic signature, the web-based tool DAVID 6.8 was used to determine the enriched pathways [23]. Genes predicted by TargetScan 7.2 [24] to be targeted by the up- or down- regulated miRNAs with cumulative weighted score < -0.5 were used for functional enrichment analysis using the same web-based tool. To further comprehend the connexions between the modulated genes in our study, we chose to represent the interactome as a graph where nodes correspond with proteins and edges with pairwise interactions using the web-based tool STRING 11.0 [30] (<https://string-db.org>), paired with Markov Clustering (MCL [26]) in order to extract relevant modules from such graphs.

#### *Pediatric mRNA datasets*

We chose three datasets from HRSV-infected host transcriptomic studies publicly available on Gene Expression Omnibus database (GEO) and ArrayExpress, based on peripheral pediatric blood samples (GSE69606 & E-MTAB-5195) or PBMC gene expression responses to infection (GSE34205 ; n=51 HRSV-infected & n=10 controls). We extracted raw data corresponding severe disease samples from the series GSE69606 (n=8) and MTAB-5195 (n=18) and the recovery corresponding samples or healthy control samples (each n=8). Raw data were processed as previously described and differential analysis was performed according to the same thresholds (p-value < 0.05 and absolute fold-change > 2).

#### *Reconstituted human airway epithelia (HAE) and viruses*

MucilAir® human airway epithelia (HAE) model from Epithelix SARL was used for validation purposes. Infections (MOI of 1) were performed as previously described [11,21]. The Human

Respiratory syncytial virus (HRSV-A Long strain ATCC-VR26) was produced in LLCMK2 cells (ATCC CCL7) in EMEM supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma Aldrich), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) (Lonza), at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>.

#### *NanoString nCounter validation*

The nCounter platform (NanoString technologies) was used for mRNA detection of a 86 gene panel, according to manufacturer's instructions [27]. This custom panel gathers immunity-related genes. Briefly, 300 ng of total RNA were hybridized to the probes at 67°C for 18 hours using a thermocycler (Biometra, Tprofessional TRIO, Analytik Jena AG, Jena, Germany). After loading into the nCounter Prep Station (NanoString Technologies) for purification and immobilization, the sample cartridge was then transferred and imaged on the nCounter Digital Analyzer (NanoString Technologies) Counts number were normalized by the geometric mean of HPRT1 (NM\_000194.1), DECR1 (NM\_001359.1), RPL19 (NM\_000981.3), POLR2A (NM\_000937.2) and TBP (NM\_001172085.1) housekeeping genes count number, as well as the negative and positive control values using nSolver analysis software (version 4.0, NanoString technologies). Gene expression results are expressed in fold change induction compared to the mock-infected condition.

## **Results**

### *Differential gene expression in HRSV-infected samples*

In this study, we assessed nasal airway gene expression on pediatric nasal wash samples (3 infected and 5 controls). Given the low quality and low integrity of these sensitive samples (quality status available in **Supplementary table 1**), previously published adapted protocols were successfully used for their amplification and their subsequent hybridization on an

Affymetrix GeneChip™ Human Gene 2.0ST [19]. An overview of the customized sample process and workflow is presented in **Figure 1A** and the subsequent hierarchical clustering of all analyzed samples is featured in **Figure 1B**. Despite the known heterogeneity of clinical samples, HRSV-infected and non-infected samples clustered appropriately to their corresponding experimental group.

For differential analysis, genes were considered significantly modulated if they exhibited at least a 2-fold change in expression levels compared to the control samples, with p-values inferior or equal to 0.05. Using these criteria, we listed a total of 296 differentially expressed genes, 258 (87.16%) of them being up-regulated (**Supplementary table 2**). This unbalanced up- versus down-regulated ratio was quite in line with previous observations [11]. As expected in the context of infected samples, many significantly up-regulated genes with fold changes far above 5 were related to the immune and IFN responses, such as ISG15, OASL, CXCL10/IP-10, CCL2-3, IFITM1-3 or IRF1 (**Supplementary table 2**). In contrast, among the 38 down-regulated genes, we listed genes associated with protein heterodimerization activity (SRGAP2C, HIST3H2BB and NTSR1), genes encoding zinc finger protein (ZNF439, ZNF28, ZNF286B, ZNF500) or transmembrane proteins acting as receptors or T-cell co-activators (such as SLC7A5P1, MSLNL or NTSR1). Of note, an important fraction (26%) of the down-regulated genes was represented by miRNAs, such as hsa-miR-572, hsa-miR-486-2, hsa-miR-1229 or hsa-miR-663b (**Supplementary table 2**). Aside from miRNAs, only 3 other down-regulated genes (KIR3DL2, SLC7A5P1 and SRGAP2C) had fold changes lower than -3.

#### *Gene Ontology-based functional enrichment analysis*

To provide further functional interpretation of these clinical transcriptomic signatures, we then performed a Gene Ontology (GO)-based functional enrichment analysis using the web-based DAVID v6.8 toolkit (<https://david.ncifcrf.gov/>). GO terms, and particularly Biological

Processes (BP), were considered enriched if their fold enrichment was higher than 2 and the Benjamini-Hochberg corrected enrichment p-value was inferior to 0.05. This BP enrichment was based on the global list of deregulated genes (**Figure 2**). As anticipated, the most enriched BP were primarily associated with interferon response (ex: GO:0060337; GO:0060333), response to virus (ex: GO:0009615; GO:0051607) or antigen processing (ex: GO:0002479; GO:0042612), which represent 16 out of the 24 most enriched BP listed (**Figure 2A**). Interestingly, the remaining GO terms were mainly related to mitochondria/respiratory burst (ex: GO:0005739; GO:0045730; GO:0045454) or ubiquitin ligase (ex: GO:0051437; GO:0051436).

To better illustrate the impact of HRSV infection on the host immunity-related genes, we used the list of up-regulated genes and explored the functional association networks of their protein products using the STRING [25] database (<https://string-db.org>). As presented in **Figure 2B**, this analysis highlighted a functional network based on 241 distinct proteins (nodes) and 637 protein-protein associations (edges). These associations, which highlight proteins sharing functions but not necessarily physical interaction, are categorized into 15 relevant clusters, among which 10 contained more than 3 proteins (each color = 1 cluster by Markov Clustering [26] or MCL). Two major hubs concentrating a large number of edges were identified. The main hub consisted of proteins related to the immune response, with a central place for major actors like CXCL10, OASL and ISG15 (**Figure 2B**, red dots). The second hub harbored proteins involved in the positive and negative regulation of ubiquitin-protein ligase activity during the mitotic cell cycle (GO:0051436 and GO:0051437, medium purple dots). Much as the first hub would have been expected in an infectious context, the specific modulation of genes related to respiratory burst, cell redox homeostasis or ubiquitin-protein ligase activity by HRSV infection has been less studied.

Because of the numerous miRNAs deregulated, we used a prediction algorithm (TargetScan 7.2 [24]) for the identification of all genes targeted by the down- and up- regulated miRNAs. The predicted genes targeted by the down-regulated miRNAs were related to biological processes such as phagocytosis (GO:0006909), peptide cross-linking (GO:0018149) or positive regulation of release of cytochrome c from mitochondria (GO:0090200). Interestingly, the predicted targets of the up-regulated miRNAs are linked to similar processes: negative regulation of nucleic acid-templated transcription (GO:1903507) and negative regulation of T cell proliferation (GO:0042130) for the most enriched BPs (**Supplementary Figure 1**).

#### *Tissue-specific gene expression*

In order to describe tissue-specific HRSV infection signatures, differentially expressed gene lists were extracted from three pediatric mRNA array datasets [28–30] and compared to our data to highlight similarities and differences between blood and respiratory airway transcriptional profiles, respectively (**Figure 3**). As previously shown, the overlap between the blood/PBMC and respiratory tract gene expression is scarce [29]. Only 6 genes (ANXA3, FCGR1B, OASL, BCL2A1, CLEC4D, RSAD2) were upregulated in all analyzed datasets, mostly associated with the host immune response to the infection. As expected, both studies on peripheral blood shared a specific signature composed of 228 genes, whereas 51 additional genes were also modulated in PBMCs. These genes are mostly associated with the innate immune response of the host (GO:0045087). When comparing these signatures with the list of genes deregulated in our study, we highlighted 242 genes exclusively modulated in nasal washes, hence constituting specific drivers of the nasal epithelium signature. Among these tissue-specific modulated genes, genes were associated with the immune response regulation (GO:0050776) and, more precisely, with type I interferon signaling pathway (GO:0060337), or antigen processing and presentation (GO:0002479).

*Validation of differential expression in reconstituted human airway epithelium (HAE)*

We then sought to validate these results in the context of experimental infections with the prototype HRSV A Long strain (MOI = 1) in a human reconstituted airway epithelial (HAE) model, as previously described [11]. This HAE model, issued from healthy donor biopsies, is composed of human primary ciliated columnar cells, mucus-secreting goblet and basal cells cultivated at the air-liquid interface, and has been successfully used to study viral infections in previous studies [11,21]. After 6 days of infection, HAE were lysed and total RNA was extracted and subsequently analyzed with the NanoString nCounter platform using a customized 94 immunity-related (cytokine production, T cell proliferation, interferon-gamma-mediated signaling pathway, etc) gene panel [27]. As shown in **Figure4**, 39 out of the 94 genes in the NanoString panel were differentially modulated in the HRSV-infected condition compared to the mock-infected control. Despite the differential nature of infectious samples, the comparison of global gene expression modulation results between Affymetrix microarray (clinical samples) and NanoString (experimental infections in HAE) assays showed a correlation coefficient of 0.63. This relatively high correlation could be explained by the fact that both types of samples contain cells of nasal origin. Unsurprisingly, the most up-regulated gene in the infectious context is CXCL10/IP-10, followed by IFI44L, IDO1 and TNFSF13B, with expression ratios above 50 (**Figure4**). The top 20 modulated genes are strongly linked to “type I interferon signaling pathway” (GO:0060337) or more widely to “response to virus” (GO:0009615 or GO:0051607). Altogether, the gene expression results observed in clinical samples were cross-validated using an alternative method and underline a global deregulation of the biological defenses of the host, notably in the case of interferon stimulated genes (ISGs) that constitute a hallmark of many infectious and/or autoimmune disease states.

## Discussion

In the particular context of HRSV infections, most of the respiratory samples collected for clinical studies are issued from pediatric patients, from whom only limited amounts of material are obtained. Moreover, given the fact that the main purpose of patient sampling is usually clinical analysis rather than research, the low quantity and quality of exploitable material is far from being optimal. In this study, we showed that these hurdles for the exploitation of highly degraded clinical samples could be mitigated by using adapted protocols and microarray, such as the Affymetrix GeneChip Human Gene 2.0 ST. Thus, despite starting from a limited number of children nasal washes presenting an acute HRSV infection, our adapted sample-processing pipeline enabled the determination and characterization of robust pediatric HRSV-induced nasal transcriptome signatures. In this study, patient-derived samples were processed with adapted protocols and transcriptomic signatures were obtained by hybridization on the HuGene 2.0 st Affymetrix microarray and subsequent process of the data. We compared our results to published pediatric blood microarray datasets for the establishment of a nasal-specific signature. We also included biological results obtained using our previously described relevant human reconstituted airway epithelial (HAE) model of HRSV infection [11] for a deeper comprehension of the virus impact on the host epithelium.

Initial signature analysis enabled the identification of well known markers of HRSV infection, namely the upheaval of the immune cascade [15–17], notably highlighting the strong overturning of CXCL10/IP-10 gene expression. We then advantageously used a biologically relevant reconstituted human airway epithelia (HAE) model to reproduce and validate these results by NanoString nCounter assay. IP-10 has already been described as the most abundant cytokine in bronchoalveolar lavages collected from HRSV-infected patients [31]. We also identified up-regulated genes seemingly commonly modulated in different infection scenarios. For example, HRASLS2 is highly induced in RV infection [32], FFAR2 promotes

internalization during IAV entry [33], and IFI6 has pleiotropic functions in HRSV, Dengue, or hepatitis C virus infections [34–36]. Conversely, our analysis revealed TMEM190 and MCEMP1 as potential specific biomarkers of HRSV infection. Although, TMEM190 expression was largely decreased in small airway epithelium by smoking [37] and MCEMP1 was proposed as a biomarker for stroke prognosis [38], a particular expression profile of these genes has not yet been described on other viral infections, for which they underscore further study as potential biomarkers. A similar rationale supports the study of TIMM23, strongly up-regulated in our study. A previous study conducted by Zaas et al. [15] identified a panel of 15 genes specifically modulated in HRSV-infected adults, of which FCGR1B, GBP1, RTP4, RSAD2, ISG15, IFIT2 were also significantly deregulated in our study. Despite the different nature of the biological samples used (children nasal washes *versus* adult blood), the high degree of concordance observed between our results and theirs supports a distinctive HRSV infection signature.

In addition to genes related to the immune response, our transcriptomics results also highlighted the modulation of genes and pathways related to a global mitochondrion cellular process disruption. This suggests that HRSV infection could unsettle less described biological processes related to the cAMP cascade, the redox complexes of mitochondrial respiratory chain (respiratory burst). Although, this impact on the respiratory chain is a less explored aspect of HRSV pathogenesis in the respiratory tract, a study from Bataki et al. [39] investigated whether HRSV can directly signal to activate neutrophil cytotoxic function or not in the context of infant bronchiolitis. Besides HRSV infections, the respiratory burst is known to be defective in influenza-infected neutrophils or during co-infections [40,41]. The disruption of such metabolic process could be a first clue regarding prognostic evolutions of children infected by HRSV.

In addition, the biological interpretation of the 38 down-regulated genes is not as straightforward. Indeed, no biological process or function was significantly enriched in our

study, only modulations of individual gene were highlighted. Some markers, already described in the context of other viral infections, were found in the top down-regulated genes [42,43]. This protection is known to be mediated partially by the inhibitory NK cell receptor KIR3DL2, whose gene expression is strongly inhibited in our HRSV infectious context. The SLC7A5P1 gene is also predicted to be linked to NK cells (GO:0032825~positive regulation of natural killer cell differentiation) whereas SRGAP2C had already be linked to HRSV bronchiolitis. Interestingly, we also observed the significant downregulation of several miRNAs. Among them, some are already described in literature such as miRNA-572, prognosis biomarker for renal cell carcinoma and sclerosis [44,45], or miRNA-769, included in a miRNA panel for discrimination between *Mycobacterium tuberculosis* infected and healthy individuals [46]. Regardless of the studied tissue, HRSV is consensually described as a major disruptor of the host immune response [47–49]. Here, comparing our signatures with 3 other ones extracted from pediatric whole blood transcriptomic analyses [28–30], we highlighted the common deregulation of 7 genes, independently of the tissue, and interestingly, 242 genes that seem to be specific to nasal epithelium HRSV-induced gene expression, in line with data from literature [50].

Collectively, the transcriptomic analysis of nasal wash samples highlights the qualitative importance of such clinical samples, particularly in the context of their limited availability. The results obtained with a complementary approach such as the reconstituted HAE greatly contribute to bridge the knowledge gap in the understanding of the specific effects of HRSV on the host respiratory tissue and pave the way for several so far undescribed avenues of investigation.

### **Acknowledgements & Funding sources**

The authors want to thank Sophie Assant for her help with the NanoString nCounter assay and Epithelix (Switzerland) for its help with MucilAir® human airway epithelia (HAE). This work was funded by grants from Région Auvergne Rhône-Alpes (CMIRA N° 14007029 and AccueilPro COOPERA N°15458 grants), and Canadian Institutes of Health Research (N° 229733 and 230187). Claire Nicolas de Lamballerie was funded by National Association for Research in Technology (ANRT). Guy Boivin is the holder of the Canada Research Chair on influenza and other respiratory viruses. Funding institutions had no participation in the design of the study, collection, analysis and interpretation of data, or in the writing of the manuscript. The authors declare they have no competing interests.

### **Author contributions**

CNDL, AP, BL, GB, CLL, OT, MRC participated to conception and coordination of the study. CNDL, AP, BP, JC, EO, TJ, AT, BL, MEH, MR, JT, GB, CLL, OT, MRC carried out the experiments and analysis of the results. CNDL, JD, OT, AP, MRC designed the study and wrote the manuscript.

## References

1. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* [Internet]. **2010**, 375(9725):1545–1555. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673610602061>
2. Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE. Respiratory Syncytial Virus Infection in Elderly and High-Risk Adults. *N Engl J Med* [Internet]. Massachusetts Medical Society; **2005** [cited 2019 Mar 26]; 352(17):1749–1759. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa043951>
3. Hall CB, Simões EAF, Anderson LJ. *Clinical and Epidemiologic Features of Respiratory Syncytial Virus*. Springer, Berlin, Heidelberg; 2013 [cited 2019 Nov 7]. p. 39–57. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-38919-1\\_2](http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-38919-1_2)
4. Griffiths C, Drews SJ, Marchant DJ. *Respiratory Syncytial Virus: Infection, Detection, and New Options for Prevention and Treatment*. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); **2017** [cited 2019 Nov 7]; 30(1):277–319. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27903593>
5. Durbin JE, Johnson TR, Durbin RK, et al. The role of IFN in respiratory syncytial virus pathogenesis. *J Immunol* [Internet]. American Association of Immunologists; **2002** [cited 2019 Nov 7]; 168(6):2944–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8345194>
6. Ramaswamy M, Shi L, Monick MM, Hunninghake GW, Look DC. Specific Inhibition of Type I Interferon Signal Transduction by Respiratory Syncytial Virus. *Am J Respir Cell Mol Biol* [Internet]. American Thoracic Society; **2004** [cited 2019 Nov 7]; 30(6):893–900. Available from: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/rcmb.2003-0410OC>

7. Tripp RA, Oshansky C, Alvarez R. Cytokines and Respiratory Syncytial Virus Infection. *Proc Am Thorac Soc* [Internet]. **2005** [cited 2019 Nov 7]; 2(2):147–149. Available from: <http://pats.atsjournals.org/cgi/doi/10.1513/pats.200502-014AW>
8. Russell CD, Unger SA, Walton M, Schwarze J. The Human Immune Response to Respiratory Syncytial Virus Infection. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); **2017** [cited 2019 Nov 7]; 30(2):481–502. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28179378>
9. Machado D, Hoffmann J, Moroso M, et al. RSV Infection in Human Macrophages Promotes CXCL10/IP-10 Expression during Bacterial Co-Infection. *Int J Mol Sci* [Internet]. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; **2017** [cited 2019 Mar 22]; 18(12):2654. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/12/2654>
10. Machado D, Pizzorno A, Hoffmann J, et al. Role of p53/NF-κB functional balance in respiratory syncytial virus-induced inflammation response. *J Gen Virol* [Internet]. Microbiology Society; **2018** [cited 2019 Nov 7]; 99(4):489–500. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.001040>
11. Nicolas de Lamballerie C, Pizzorno A, Dubois J, et al. Characterization of cellular transcriptomic signatures induced by different respiratory viruses in human reconstituted airway epithelia. *Sci Rep* [Internet]. Nature Publishing Group; **2019** [cited 2019 Nov 7]; 9(1):11493. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31391513>
12. Parnell GP, McLean AS, Booth DR, et al. A distinct influenza infection signature in the blood transcriptome of patients with severe community-acquired pneumonia. *Crit Care* [Internet]. BioMed Central; **2012** [cited 2019 Nov 7]; 16(4):R157. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22898401>
13. Hancock AS, Stairiker CJ, Boesteanu AC, et al. Transcriptome Analysis of Infected

- and Bystander Type 2 Alveolar Epithelial Cells during Influenza A Virus Infection Reveals In Vivo Wnt Pathway Downregulation. *J Virol* [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); **2018** [cited 2019 Nov 7]; 92(21). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30111569>
14. Troy NM, Bosco A. Respiratory viral infections and host responses; insights from genomics. *Respir Res.* **2016**; 17(1):1–12.
  15. Zaas AK, Chen M, Varkey J, et al. Gene Expression Signatures Diagnose Influenza and Other Symptomatic Respiratory Viral Infection in Humans. *Cell Host Microbe.* **2009**; 6(3):207–217.
  16. Levitz R, Gao Y, Dozmorov I, Song R, Wakeland EK, Kahn JS. Distinct patterns of innate immune activation by clinical isolates of respiratory syncytial virus. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; **2017** [cited 2019 Nov 7]; 12(9):e0184318. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28877226>
  17. Do LAH, Pellet J, Doorn HR van, et al. Host Transcription Profile in Nasal Epithelium and Whole Blood of Hospitalized Children Under 2 Years of Age With Respiratory Syncytial Virus Infection. *J Infect Dis* [Internet]. Oxford University Press; **2017** [cited 2019 Nov 5]; 217(1):134–146. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29029245>
  18. Ampuero S, Andaur R, Milano M, et al. Time-course of transcriptome response to respiratory syncytial virus infection in lung epithelium cells. *Acta Virol* [Internet]. **2018** [cited 2019 Nov 7]; 62(03):310–325. Available from: [http://www.elis.sk/index.php?page=shop.product\\_details&flypage=flypage.tpl&product\\_id=5804&category\\_id=145&option=com\\_virtuemart](http://www.elis.sk/index.php?page=shop.product_details&flypage=flypage.tpl&product_id=5804&category_id=145&option=com_virtuemart)
  19. Dupinay T, Nguyen A, Croze S, et al. Next-generation sequencing of ultra-low copy samples from clinical FFPE samples to single-cell sequencing. *Curr Top Virol*

- [Internet]. **2012** [cited 2019 Mar 21]; 10(June 2015):63–83. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/278684713\\_Next-generation\\_sequencing\\_of\\_ultra-low\\_copy\\_samples\\_from\\_clinical\\_FFPE\\_samples\\_to\\_single-cell\\_sequencing](https://www.researchgate.net/publication/278684713_Next-generation_sequencing_of_ultra-low_copy_samples_from_clinical_FFPE_samples_to_single-cell_sequencing)
20. Degletagne C, Keime C, Rey B, et al. Transcriptome analysis in non-model species: a new method for the analysis of heterologous hybridization on microarrays. *BMC Genomics* [Internet]. BioMed Central; **2010** [cited 2019 Mar 21]; 11:344. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20509979>
  21. Pizzorno A, Terrier O, Nicolas de Lamballerie C, et al. Repurposing of Drugs as Novel Influenza Inhibitors From Clinical Gene Expression Infection Signatures. *Front Immunol* [Internet]. Frontiers; **2019** [cited 2019 Mar 22]; 10:60. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.00060/full>
  22. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* [Internet]. **2015** [cited 2017 Nov 14]; 43(7). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4402510/pdf/gkv007.pdf>
  23. Dennis G, Sherman BT, Hosack DA, et al. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* [Internet]. **2003** [cited 2019 Mar 21]; 4(5):P3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12734009>
  24. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell*. Cell Press; **2003**; 115(7):787–798.
  25. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, et al. STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* [Internet]. **2015** [cited 2019 Mar 21]; 43(D1):D447–D452. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25352553>

26. S. VD. Graph clustering by flow simulation. 2000.
27. Tsang H-F, Xue VW, Koh S-P, Chiu Y-M, Ng LP-W, Wong S-CC. NanoString, a novel digital color-coded barcode technology: current and future applications in molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* [Internet]. **2017** [cited 2019 Apr 10]; 17(1):95–103. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27917695>
28. Jong VL, About IML, Ham H-J Van Den, et al. Transcriptome assists prognosis of disease severity in respiratory syncytial virus infected infants. *Nat Publ Gr*. **2016** .
29. Ioannidis I, McNally B, Willette M, et al. Plasticity and Virus Specificity of the Airway Epithelial Cell Immune Response during Respiratory Virus Infection. *J Virol*. American Society for Microbiology; **2012**; 86(10):5422–5436.
30. Brand HK, About IML, Ridder D De, et al. Olfactomedin 4 serves as a marker for disease severity in pediatric respiratory syncytial virus (RSV) infection. *PLoS One*. Public Library of Science; **2015**; 10(7).
31. McNamara PS, Flanagan BF, Hart CA, Smyth RL. Production of Chemokines in the Lungs of Infants with Severe Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis. *J Infect Dis* [Internet]. **2005** [cited 2019 Nov 13]; 191(8):1225–1232. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/428855>
32. Chen Y, Hamati E, Lee PK, et al. Rhinovirus induces airway epithelial gene expression through double-stranded RNA and IFN-dependent pathways. *Am J Respir Cell Mol Biol*. American Thoracic Society; **2006**; 34(2):192–203.
33. Wang G, Jiang L, Wang J, et al. The G Protein-Coupled Receptor FFAR2 Promotes Internalization during Influenza A Virus Entry. *J Virol*. American Society for Microbiology; **2019**; 94(2).
34. Mejias A, Dimo B, Suarez NM, et al. Whole Blood Gene Expression Profiles to Assess Pathogenesis and Disease Severity in Infants with Respiratory Syncytial Virus

- Infection. *PLoS Med.* **2013**, 10(11).
35. Qi Y, Li Y, Zhang Y, et al. IFI6 Inhibits Apoptosis via Mitochondrial-Dependent Pathway in Dengue Virus 2 Infected Vascular Endothelial Cells. Jin X, editor. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; **2015** [cited 2020 Apr 15]; 10(8):e0132743. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0132743>
  36. Meyer K, Kwon YC, Liu S, Hagedorn CH, Ray RB, Ray R. Interferon- $\alpha$  inducible protein 6 impairs EGFR activation by CD81 and inhibits hepatitis C virus infection. *Sci Rep.* Nature Publishing Group; **2015**, 5(1):1–10.
  37. Hackett NR, Butler MW, Shaykhiev R, et al. RNA-Seq quantification of the human small airway epithelium transcriptome. *BMC Genomics.* BioMed Central; **2012**, 13(1):82.
  38. Raman K, O'Donnell MJ, Czlonkowska A, et al. Peripheral Blood MCEMP1 Gene Expression as a Biomarker for Stroke Prognosis. *Stroke.* Lippincott Williams and Wilkins; **2016**, 47(3):652–658.
  39. Bataki EL, Evans GS, Everard ML. Respiratory syncytial virus and neutrophil activation. *Clin Exp Immunol.* **2005**, 140(3):470–477.
  40. Heo JY, Song JY, Noh JY, et al. Effects of influenza immunization on pneumonia in the elderly. *Hum. Vaccines Immunother.* Taylor and Francis Inc.; 2018. p. 744–749.
  41. Bosch AATM, Biesbroek G, Trzcinski K, Sanders EAM, Bogaert D. Viral and Bacterial Interactions in the Upper Respiratory Tract. *PLoS Pathog.* Public Library of Science; 2013.
  42. Hansasuta P, Dong T, Thananchai H, et al. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *Eur J Immunol.* **2004**, 34(6):1673–1679.
  43. Cosman D, Fanger N, Borges L, et al. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity.* Cell Press; **1997**, 7(2):273–

282.

44. Pan X, Li Z, Zhao L, et al. microRNA-572 functions as an oncogene and a potential biomarker for renal cell carcinoma prognosis. *Oncol Rep* [Internet]. Spandidos Publications; **2018** [cited 2020 Apr 15]; 40(5):3092–3101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30132566>
45. Mancuso R, Hernis A, Agostini S, Rovaris M, Caputo D, Clerici M. MicroRNA-572 expression in multiple sclerosis patients with different patterns of clinical progression. *J Transl Med* [Internet]. BioMed Central Ltd.; **2015** [cited 2020 Apr 15]; 13(1):148. Available from: <http://www.translational-medicine.com/content/13/1/148>
46. Cui JY, Liang HW, Pan XL, et al. Characterization of a novel panel of plasma microRNAs that discriminates between Mycobacterium tuberculosis infection and healthy individuals. *PLoS One*. Public Library of Science; **2017**; 12(9).
47. Hijano DR, Vu LD, Kauvar LM, Tripp RA, Polack FP, Cormier SA. Role of Type I Interferon (IFN) in the Respiratory Syncytial Virus (RSV) Immune Response and Disease Severity. *Front Immunol* [Internet]. Frontiers; **2019** [cited 2019 Jun 6]; 10:566. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.00566/full>
48. Heinonen S, Rodriguez-Fernandez R, Diaz A, Rodriguez-Pastor SO, Ramilo O, Mejias A. Infant Immune Response to Respiratory Viral Infections. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* W.B. Saunders; 2019. p. 361–376.
49. Carvajal JJ, Avellaneda AM, Salazar-Ardiles C, Maya JE, Kalergis AM, Lay MK. Host Components Contributing to Respiratory Syncytial Virus Pathogenesis. *Front. Immunol.* Frontiers Media S.A.; 2019. p. 2152.
50. Pennings JLA, Schuurhof A, Hodemaekers HM, et al. Systemic Signature of the Lung Response to Respiratory Syncytial Virus Infection. Ahuja SK, editor. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; **2011** [cited 2020 Apr 6]; 6(6):e21461. Available

from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0021461>

Accepted Manuscript

## Figure legends

### **Figure 1. Sample processing workflow and transcriptomic hierarchical clustering. (A)**

Adapted workflow for the processing and exploitation of clinical samples with low RNA quality/quantity. **(B)** Hierarchical clustering of the signal intensities corresponding to all infected and non-infected clinical samples evaluated in the study. The resulting clusters are representative of the degree of similarity between samples and enable clustering into infected and non-infected experimental groups. The height of the y-axis at the branching points is a measure of similarity; y-axis units are arbitrary. For representation purposes, data was auto-scaled and log<sub>2</sub> transformed.

### **Figure 2. Gene Ontology-based functional enrichment and protein-protein interaction analyses (A)**

Enriched biological process terms corresponding to the up-regulated gene list (enrichment score >2 and Benjamini-Hochberg corrected p-value <0.05). The down-regulated gene list did not present sufficient enrichment to pass our thresholds. **(B)** Evidence view of predicted protein associations associated with up-regulated genes in the HRSV-infected condition. Network nodes are host proteins and edges represent predicted functional associations. The color-coded lines correspond to the types of evidence supporting predicted associations (minimum required interaction score: 0.7). Node colors correspond to Markov clusters (MCL, inflation parameter: 1.5).

### **Figure 3. Gene expression cross-analysis as a key to tissue-specific local reaction to infection. (A)**

We selected 3 pediatric mRNA expression datasets for gene expression comparison across tissues. The GSE69606 dataset combines samples from 26 patients with acute HRSV infections, with symptoms spanning from mild to severe and the corresponding recovery paired samples. The E-MTAB-5195 dataset was originally used to investigate blood

transcriptomics of 39 children during HRSV infection and for a longitudinal analysis to determine an 84-gene prognosis signature discriminating hospitalized infants with severe HRSV disease from infants with mild symptoms. The GSE34205 dataset is part of a wider study (GSE32140), aiming at establishing the signature induced by influenza and HRSV on PBMCs and primary airway epithelial cells. Because of the disease status of our study samples, we focused on severely ill children infected by HRSV. **(B)** Comparative cross-analysis of the gene lists on the 4 datasets (3 external plus ours). Common and specific infection features and gene enrichment analysis applied to the 242 nasal-specific genes are shown.

**Figure 4. Experimental validation of gene expression results by NanoString assay in human airway epithelia (HAE).** The expression of immunity-related genes in infected nasal HAE was validated using Nanostring nCounter technology. Data processing and normalization were performed with nSolver 4.0 analysis software and significant results (absolute fold change > 2) are expressed in fold change induction compared to the mock-infected condition.

Figure 1

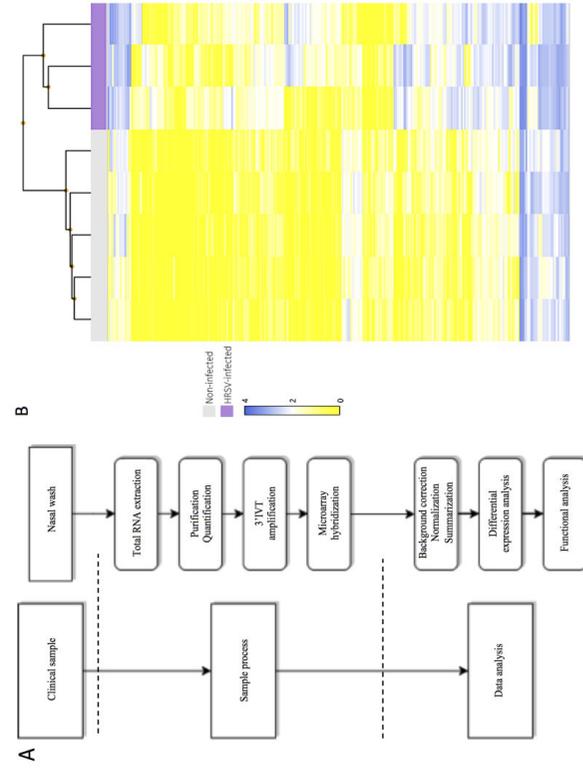


Figure 2

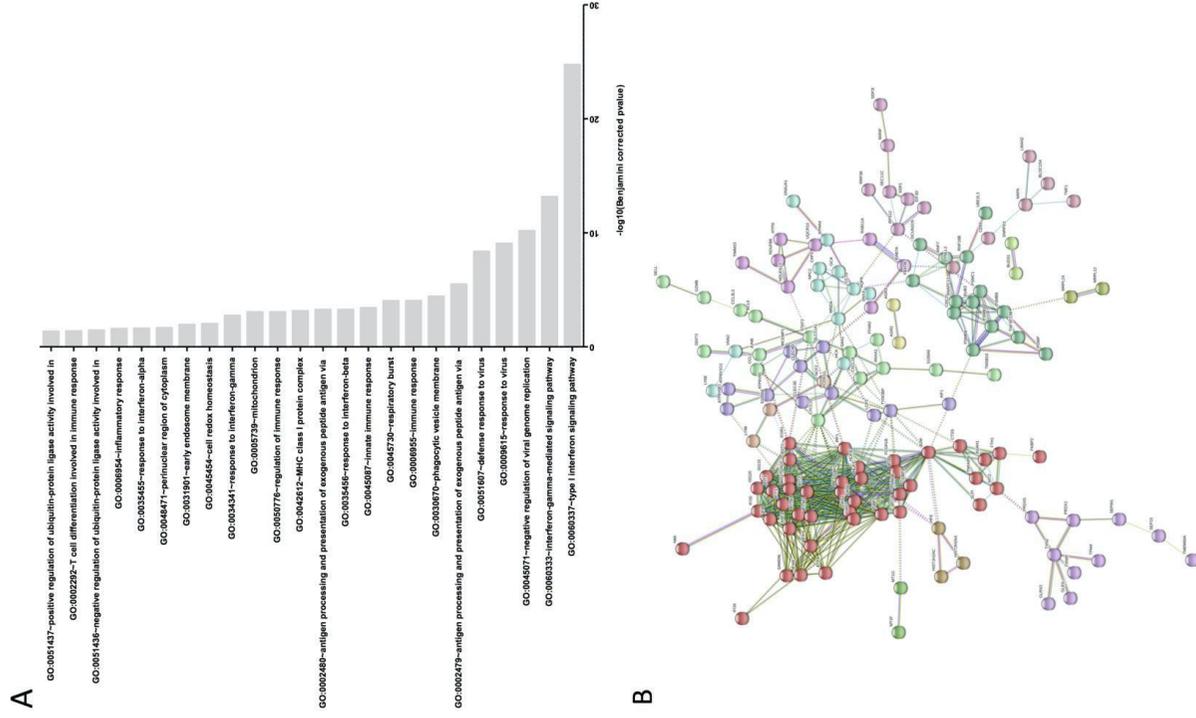
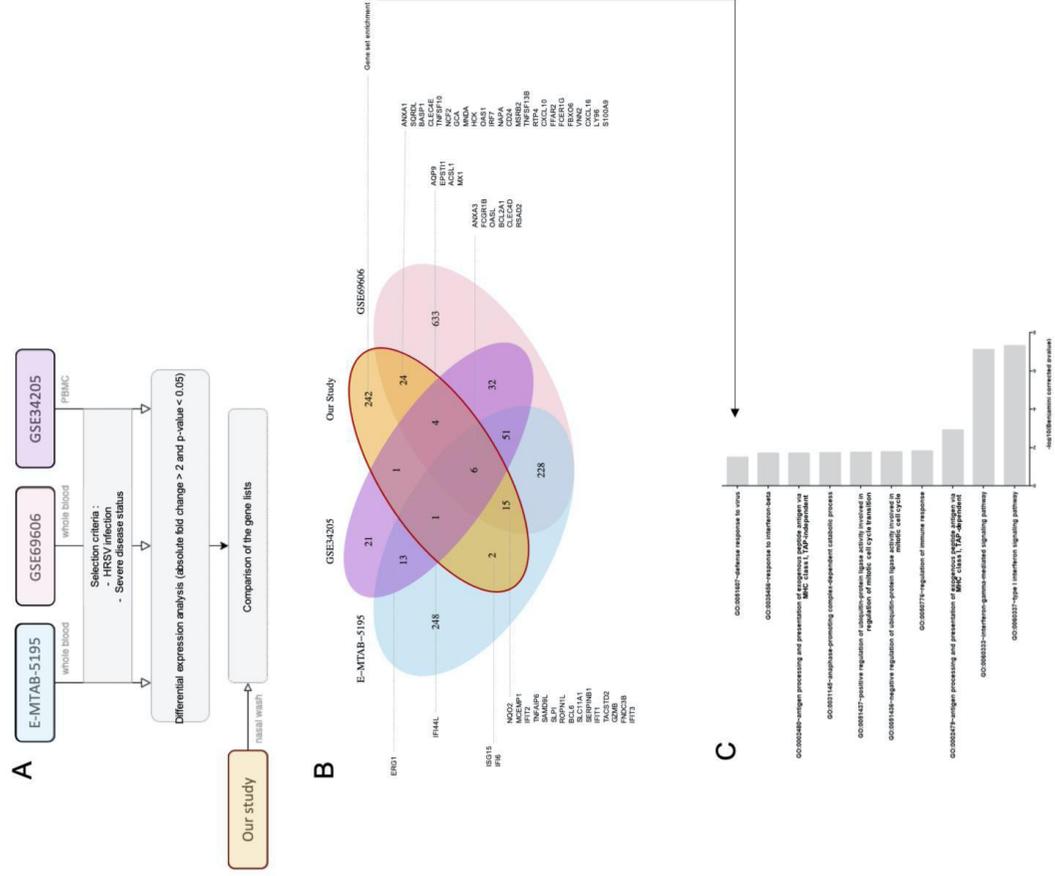


Figure 3



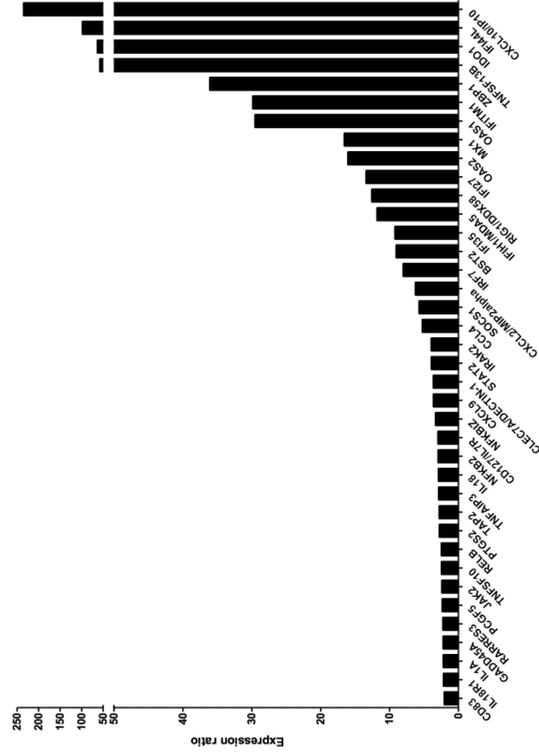


Figure 4

### III . 3 . Discussion et perspectives de ce travail

Tout comme lors de l'étude FLUNEXT, nous avons dû faire face à des échantillons cliniques présentant un état de dégradation avancé, présentant un RIN moyen de 1 post-purification, synonyme d'une fragmentation importante de l'ARN. Riche de l'expertise de la société ViroScan3D, le protocole développé lors de la mise en place du projet FLUNEXT a été davantage optimisé en vue d'une hybridation sur biopuce<sup>530</sup>. De plus, il est intéressant de souligner que les résultats présentés ici ne reflètent pas totalement le fil de la réflexion que nous avons suivie. En effet, puisque la méthode de *summarization* avait été adaptée dans l'étude FLUNEXT (algorithme MAXRS, déjà décrit pour le traitement de données brutes de biopuces provenant d'espèces hétérologues), nous avons voulu explorer de nouvelles possibilités d'amélioration de la procédure d'analyse afin de parer à la dégradation forte des échantillons cliniques. Cette étape nous permet d'estimer le niveau d'expression de transcrits / gènes à partir de l'intensité mesurée des sondes correspondantes. Or, la littérature recense une multitude de méthodes comme la moyenne, la médiane, la médiane pondérée<sup>531</sup>, modèle linéaire<sup>532</sup> (RLM), li wong<sup>533</sup>, playerout<sup>534</sup> ou MAXRS<sup>504</sup>.

Nous avons alors confronté plusieurs de ces méthodes de *summarization*, tout en gardant l'ensemble des autres étapes de la procédure d'analyse (correction du bruit de fond, normalisation, PM-correction et analyse différentielle) et nous avons constaté que les résultats obtenus variaient grandement selon les méthodes utilisées. En effet, avec des seuils classiques de *fold change* absolu > 2 et une p valeur < 0.05, les listes de gènes établies avec une *summarization* de type médiane ou MAXRS ne concordent que très peu (13 gènes communs, Figure 38, panel A). Les gènes significativement modulés ont ensuite été l'objet d'une analyse fonctionnelle. Les processus biologiques les plus enrichis avec la méthode MAXRS sont associés à la réticulation peptidique, la différenciation des kératinocytes ou kératinisation, la perception sensorielle de l'odorat et la régulation de la conduction cardiaque (GO:0018149, GO:0030216, GO:0031424, GO:0007608 et GO:1903779, Figure 38, panel B). Ces résultats diffèrent grandement de ceux obtenus par la méthode de *summarization* en médiane qui surlignait elle un enrichissement majeur de la réponse immunitaire. Ainsi, la validation d'un set de gènes de la réponse immunitaire par la technologie nCounter de Nanostring à partir d'échantillons issus d'épithélium humain reconstitués HAE infectés par HRSV, nous a permis de conforter notre choix dans l'utilisation de la méthode classique de *summarization* en médiane (Figure 38, panel C).

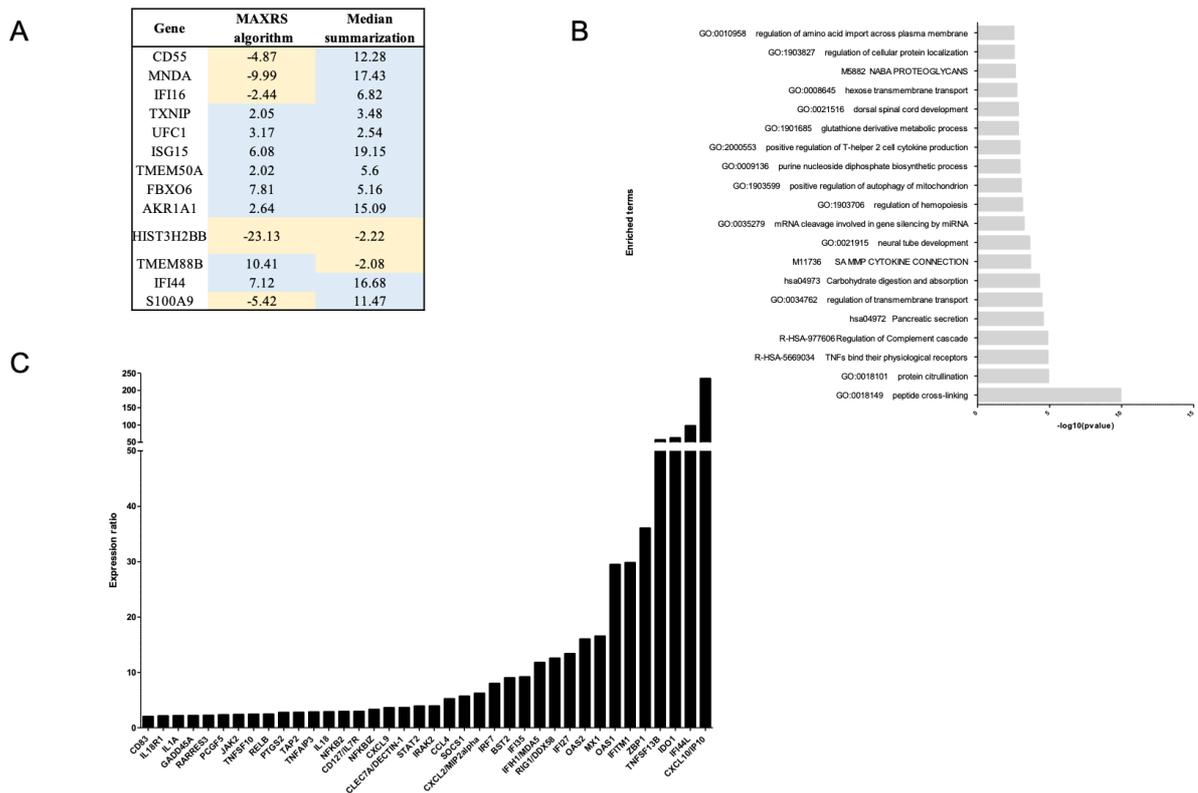


Figure 38 : Comparaison de deux méthodes de summarization. Seuls 13 gènes sont communs aux deux listes (panel A) et l'analyse par la méthode MAXRS diffère grandement de celle précédemment observée par la méthode de la médiane (panel B). La technologie Nanostring nCounter a ensuite été utilisée pour valider l'utilisation de la seconde méthode.

Rétrospectivement, nous avons donc cherché à expliquer cette discordance de résultats que nous pensons être due à la conception des biopuces. En effet, les Affymetrix Human Genechip™ 2.0 ST démultiplie le nombre de probes interrogeant un même transcrit/gène dans toute sa longueur alors que les biopuces Human Genome U133 plus 2.0 ne sont placées que en 3'. Etant donné la répartition de ces sondes, il semblerait que le choix des sondes avec la plus haute intensité comme représentatives de l'intensité du gène avec les puces Human Genechip™ 2.0 ST ne permette pas de capturer la diversité des gènes modulés dans nos échantillons infectés par HRSV.

Dans sa globalité, notre protocole nous a finalement permis d'obtenir une liste de 296 gènes modulés significativement dans la condition infectée, avec un net déséquilibre en faveur des gènes surexprimés (n=258). Ce déséquilibre se traduit d'ailleurs dans les résultats obtenus lors des analyses d'enrichissement puisqu'aucun processus biologique n'est significativement enrichi parmi les gènes sous-exprimés alors que plusieurs processus biologiques associés aux voies de la réponse immunitaire de l'hôte sont fortement enrichis lorsque nous considérons les gènes surexprimés. Parmi ces derniers, nous retrouvons ainsi des gènes clefs de cette réponse comme CXCL10, OASL ou ISG15, mais aussi des gènes associés à d'autres voies métaboliques moins décrites lors de l'infection HRSV comme l'explosion oxydative (libération rapide de dérivés réactifs de l'oxygène, comme l'ion

superoxyde et le peroxyde d'hydrogène), l'homéostasie redox cellulaire ou l'activité ubiquitine-protéine ligase.

La modulation de l'expression du gène CXCL10 est souvent considérée comme un marqueur de référence dans l'étude des infections au HRSV. Ce gène code pour une chimiokine de la sous-famille CXC, la chimiokine IP10 qui est un ligand du récepteur CXCR3. La liaison de cette protéine à CXCR3 entraîne des effets pléiotropes, tels que l'attraction et la stimulation des monocytes, cellules NK et lymphocytes T, et la modulation de l'expression des molécules d'adhésion. La modulation de CXCL10/IP10 est déjà bien décrite dans ce contexte, par exemple par McNamara et collaborateurs dans une étude de la réponse cytokinique chez des nourrissons atteints de bronchiolite virale<sup>535</sup>. Dans notre étude, nous avons mesuré une importante surexpression de CXCL10 *via* l'hybridation sur biopuce à partir de nos échantillons cliniques ainsi que *via* la technologie Nanostring nCounter à partir d'échantillons issus d'épithélium reconstitué.

Notre étude a également permis de mesurer la surexpression de plusieurs gènes qui, à notre connaissance, n'avaient pas été décrits dans les études s'intéressant aux infections HRSV, mais plutôt à d'autres type d'infections virales, à l'image de HRASLS2, FFAR2 ou IFI6 connus pour être associés aux infections à rhinovirus, IAV ou Dengue et Hépatite C, respectivement. Nous avons également mesuré une large surexpression des gènes TMEM190, MCEMP1 et / ou TIMM23, jusque-là non décrits dans un contexte pédiatrique d'infections au HRSV. Nous proposons donc d'approfondir l'étude de l'expression de ces gènes afin de confirmer leur intérêt en tant que biomarqueurs locaux d'un certain nombre d'infections virales ou spécifiques de l'infection par le HRSV.

Par ailleurs, l'interprétation de la sous-expression de seulement 38 gènes *in vivo* est plus complexe, puisqu'aucune voie biologique n'est significativement enrichie. Nous avons tout de même pu identifier des gènes déjà décrits dans d'autres conditions d'infection comme KIR3DL2 (virus Epstein-Barr et cytomegalovirus humain), SRGAP2C, déjà décrit chez des enfants atteints de bronchiolites d'étiologie virale au HRSV et SLC7A5P1 associé au terme « régulation positive de la différenciation des cellules NK » (GO:0032825). En plus de l'effet immunomodulateur direct du HRSV, nous avons aussi souligné dans notre étude son effet sur de nombreux microARN, eux-mêmes ciblant des facteurs de l'immunité, renforçant l'impact du virus sur les mécanismes de défense de l'hôte. De manière intéressante, nous avons mis en évidence la sous-expression de microARN dont les cibles sont des gènes associés à la phagocytose par exemple, ainsi que la surexpression de microARN ciblant des gènes en lien avec la régulation négative de la prolifération des cellules T. Certains de ces microARNs pourraient donc être ajoutés à des panels de biomarqueurs comme c'est déjà le cas pour miRNA-769, qui permet de discriminer entre des individus sains et ceux infectés par *Mycobacterium tuberculosis*.

Dans le but de valider nos résultats d'analyse des signatures *in vivo*, nous avons ensuite exploré l'impact de l'infection au HRSV sur notre modèle d'épithélium humain reconstitué par la quantification de l'expression d'un panel de gènes sans amplification préalable *via* la technologie nCounter (Nanostring). Le panel choisi s'intéresse à 94 gènes liés à la réponse immunitaire innée cellulaire (tels que les 28 gènes associés au GO:0006955 : IL1R2, CCL2, C3, CCR1, IL18, CXCL2, CXCL9, CCL8, OAS1, OAS2, HLA-DMB, CCL4, IL10, CD74, CXCL10, CCL20, IFNG, ZAP70, IL1B, HLA-DPB1, IL1A, IL18R1, IL6, TNFSF10, TNFSF13B, HLA-DPA1, IL2, HLA-DRA) et plus précisément à la production de cytokines, la prolifération des cellules T, la régulation des voies médiées par l'interféron gamma ou la transduction du signal activant la réponse immunitaire innée. Dans ce modèle physiologique *in vitro*, les résultats d'analyse différentielle (infecté/contrôle) obtenus valident la forte modulation de la réponse immunitaire lors d'une infection au HRSV avec 39 gènes significativement surexprimés. De manière intéressante, 34 gènes surexprimés en épithélium le sont aussi chez les patients infectés. Seuls 5 gènes du panel (IL1A, JAK2, PCGF5, SOCS1, STAT2) présentaient une modulation inverse chez les patients par rapport à l'épithélium infecté, probablement une illustration de la plus grande complexité des échantillons de patients par rapport à notre modèle *in vitro*. Nous avons ainsi validé l'effet de l'infection par le HRSV sur la réponse immunitaire cellulaire locale et conforté de nouveau notre choix de travailler avec ce modèle d'épithélium respiratoire humain reconstitué, surtout dans le contexte d'études de virus touchant des populations pédiatriques, pour lesquelles les prélèvements sont difficiles d'accès.

Nous avons enfin comparé la signature que nous avons obtenue à partir des échantillons nasaux pédiatriques à celle de prélèvements sanguins issus du même type de population provenant de la littérature<sup>469,536,537</sup>. Comme attendu, seuls 7 gènes sont dérégulés de manière commune entre les différents tissus et nous avons identifié 242 gènes pouvant définir une signature nasale spécifique. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Pennings et collaborateurs obtenus en modèle murin qui n'identifient que 53 gènes communs entre des échantillons de poumons, sang et ganglions lymphatiques bronchiques et associent aux signatures pulmonaires les termes « phase aiguë », « activité des cytokines/chimiokines » et « traitement des antigènes »<sup>538</sup>.

L'ensemble de nos résultats conforte notre choix de travail avec des prélèvements de patients correspondant au tissu en première ligne face à l'infection (prélèvement nasal), mais confirme aussi l'importance de modèles physiologiquement adéquats pour mieux comprendre et décrire la pathologie du HRSV et ainsi contribuer à notre stratégie de repositionnement.

## Discussion et perspectives générales



## Discussion et perspectives générales

Les rhinovirus, adénovirus, pneumovirus, coronavirus, virus influenza et parainfluenza sont la cause de nombreuses IRAs, menaces considérables sur la santé des populations et dont le coût très important pour nos sociétés ne cesse de croître. La plupart de ces virus respiratoires ont un potentiel de propagation rapide à travers le monde, ce qui impose une surveillance et un contrôle efficace de ces virus au potentiel pandémique. En dépit de ces constatations alarmantes, l'arsenal thérapeutique et prophylactique reste très limité (cas des virus influenza) ou inexistant (cas des pneumovirus), comme nous avons pu le constater face au nouveau virus pandémique SARS-CoV-2 apparu fin 2019 en Chine. Dans ce contexte de besoins médicaux non pourvus, nous avons mis en place une stratégie reposant sur une meilleure compréhension de ces infections virales respiratoires et de leurs impacts sur les différentes machineries et voies cellulaires, *via* la détermination de signatures transcriptomiques, afin de proposer de nouvelles thérapies antivirales à partir des molécules déjà sur le marché ciblant la cellule hôte plutôt que des déterminants viraux. Ces stratégies de repositionnement sont plus que jamais sur le devant de la scène avec des encouragements de l'OMS à valoriser ce type d'approche, notamment dans le contexte pandémique actuel.

Mes travaux de thèse se donc tout d'abord intéressés aux virus influenza de type A, par l'étude de signatures transcriptomiques de patients infectés dans le but de repositionner des médicaments déjà sur le marché pour de nouvelles indications thérapeutiques anti-grippe tout en identifiant leur(s) mode(s) d'action. Ce travail nous a conduits à la sélection et la validation du diltiazem dans différents modèles *in vitro* (HAE) et *in vivo* (murin) puis au lancement d'un essai clinique multicentrique de phase II (2017-2021) pour en tester l'efficacité en combinaison avec l'oseltamivir (FLUNEXT TRIAL PHRC #15-0442 – ClinicalTrials.gov identifier NCT03212716). Les patients inclus dans cette étude ont été et seront prélevés à différents temps et leurs échantillons (écouvillons et lavages) seront utilisés pour établir les signatures d'infection et du traitement dans le but d'améliorer d'une part notre stratégie et d'autre part notre connaissance de la biologie des pathogènes étudiés et de la physiopathologie associées (biomarqueurs d'infection, sévérité et / ou réponse au traitement). La deuxième partie de mon travail a consisté en l'élargissement des concepts et approches technologiques éprouvés ci-dessus, avec la caractérisation et l'analyse intégrée de multiples signatures transcriptomiques *in vitro* (modèle d'épithélium respiratoire reconstitué) et *in vivo* (banque d'échantillons biologiques de patients).

Afin de remédier aux difficultés rencontrées lors de l'exploitation d'échantillons de patients, nous avons choisi d'établir des signatures virogénomiques dans un modèle pertinent et innovant d'épithélium respiratoire humain reconstitué cultivé en interface air/liquide (HAE), tout en mettant à profit les technologies actuelles de séquençage à haut débit, pour toujours mieux comprendre les interactions hôte-pathogène et identifier au mieux les antiviraux de demain. Nous avons ainsi confirmé l'intérêt et la pertinence de ce modèle d'étude physiologique, adapté au NGS et à l'étude des virus respiratoires par la mise en lumière d'un certain nombre de biomarqueurs d'infection qui nécessitent de plus amples investigations, mais qui soulignent l'importance grandissante de telles technologies. En France, il n'est pas encore possible de les utiliser en routine, mais leurs nombreux avantages leur assurent une place de choix dans les années à venir.

Enfin, nous avons mené une étude ciblée sur le HRSV pour décrire les bouleversements profonds induits par cette infection sur la cellule hôte et déterminer la faisabilité de notre stratégie de repositionnement sur d'autres virus respiratoires que les virus influenza. Les premiers résultats (non présenté dans cette thèse) sont très encourageants, avec la découverte de plusieurs composés antiviraux potentiels contre HRSV.

Avec l'expérience acquise de l'exploitation de nos différentes signatures transcriptomiques, nous avons appliqué de nouvelles optimisations à notre stratégie de repositionnement de médicaments. Il a notamment été décidé d'établir une liste de gènes associés à l'immunité et de la retirer de nos signatures lors de l'interrogation/du criblage de la base de données CMap pour établir notre liste de molécules à tester. Ce faisant, nous conservons intact cet aspect important de la réponse de l'hôte. Sont listés en annexe l'ensemble des gènes que nous avons associés à la réponse immunitaire. Tout comme lors des études précédentes, les résultats des cribles ont été raffinés avec, en premier lieu, une évaluation critique par nos partenaires cliniciens afin d'éliminer les médicaments inadaptés aux nouvelles indications thérapeutiques visées. Par exemple, le fulvestrant (stéroïde de synthèse anti-estrogène) est apparu dans notre criblage comme ayant une signature anti-corrélée avec celle induite par le HRSV. Cependant, il n'a pas été sélectionné pour les étapes suivantes d'évaluation pré-clinique, sa pharmacocinétique étant totalement incompatible avec une infection aiguë puisque son absorption est lente et la concentration plasmatique maximale n'est atteinte qu'au bout de 5 jours environ. D'autres composés ont aussi été supprimés de nos listes de molécules candidates comme la syrosingopine (prescrite dans les cas d'hypertension) pour ses effets secondaires inadaptés à des cas d'infections aiguës. D'autres critères de sélection ont été appliqués, notamment le caractère brevetable des différents candidats par une étude bibliographique et des requêtes sur des bases de données de propriété intellectuelle. En accord avec nos partenaires, une liste de molécules candidates a été établie pour être testée au sein des différents laboratoires. Les molécules candidates anti-HRSV sont en cours d'évaluation au laboratoire VirPath en modèle d'épithélium respiratoire reconstitué. Le dépôt d'un ou plusieurs brevets étant envisagé, la valorisation par

publication des résultats obtenus dans un journal à comité de lecture international se fera dans un second temps.

Nous avons aussi exploité des échantillons de patients infectés par d'autres virus respiratoires (MERS-CoV, CoV-229E, CoV-OC43 et HMPV-B), en avons établi la signature d'infection et avons proposé différents candidats au repositionnement. En accord avec nos partenaires dans ce projet d'envergure, les molécules en question sont en cours d'évaluation afin d'établir leurs activités antivirales potentielles. Plus récemment, nous avons mis à profit les signatures transcriptomiques de patients infectés par des coronavirus (précédemment établies dans le cadre du projet RESPIROMIX) et notre connaissance du modèle expérimental HAE pour accélérer la recherche d'antiviraux anti-SARS-CoV-2, en adéquation avec notre stratégie de repositionnement.

Notre stratégie de cible de la cellule plutôt qu'un déterminant viral précis nous permet d'espérer la découverte de molécules communes aux coronavirus par exemple ou plus généralement pan-antivirales, notamment le diltiazem, qui, par son mode d'action cellulaire (stimulation de l'expression endogène des gènes IFN III), pourrait se révéler efficace contre différents types d'infections respiratoires.

En parallèle des travaux réalisés sur différents virus, nous avons aussi débuté des études de co-infection en mettant à profit notre modèle d'épithélium reconstitué. En effet, nous sommes conscients de la problématique de multiplicité d'infections et de surinfections chez les patients infectés, notamment en réanimation. Nous avons par exemple choisi de mettre en place et caractériser un modèle de co-infection entre *Pseudomonas aeruginosa* et certains virus de la grippe. Ces données critiques feront l'objet de futures publications. Un autre modèle de surinfection (SARS-CoV-2 + *Aspergillus niger*) a été mis en place très récemment sur épithélium respiratoire reconstitué et a fait l'objet d'un article scientifique que je signe en premier auteur, soumis dans un journal à comité international de lecture (cf. Annexes).

Notre stratégie de repositionnement se heurte actuellement à plusieurs limites, mais de futures évolutions techniques pourraient nous permettre de les surpasser et d'affiner notre approche. En effet, le choix de la base de données de signatures chémogénomiques CMap constitue une première limite intrinsèque de notre approche puisque celle-ci a été établie à partir de (i) lignées cellulaires peu pertinentes dans le contexte d'étude de pathogènes respiratoires (MCF7, PC3, HL60, SKMEL5) (ii) à des concentrations éloignées des posologies effectivement prescrites (un traitement unique à 10 µM) (iii) sur des biopuces qui sont depuis dépassées technologiquement (*Affymetrix GeneChip Human Genome U133A Array*) et (iv) avec certains composés dont le repositionnement semble difficile (faible biodisponibilité par exemple). Enfin, l'accès à cette base de données est de plus en

plus incertain et limité. C'est à partir de ces constatations que la start-up Signia Therapeutics a été créée afin de constituer une base de données à partir de modèle beaucoup plus pertinent d'un point de vue physiologique. Une seconde limite de notre stratégie émane de notre modèle d'épithélium reconstitué qui ne contient pas de cellule immunitaire, ne nous permettant pas d'appréhender une réponse complète des tissus à l'infection. Cependant, il reste bien plus accessible que les prélèvements sur des patients, très précieux et difficiles à obtenir. D'ailleurs, nos obligations éthiques sur ces échantillons sont de plus en plus renforcées à mesure que les technologies de séquençage progressent.

Malgré cette limite, ce modèle complexe comporte de nombreux avantages et constitue une véritable opportunité pour mieux comprendre l'effet de l'infection au niveau du tissu, y compris dans des conditions pathologiques, mais aussi le mode d'action d'un médicament. Ces données critiques nous permettront de toujours mieux expliquer les effets antiviraux ou pro-viraux de certains composés par exemple. Il nous permet aussi d'envisager et de tester des modes de délivrance alternatifs, comme l'aérosolisation, pour une action plus ciblée *in vivo* avec moins de risque potentiel systémique.

A plus long terme, notre stratégie de repositionnement pourrait être élargie en dehors de nos domaines d'expertise et savoir-faire acquis au sein de nos laboratoires, à d'autres espèces, pour le traitement de pathologies virales et / ou microbiennes mais aussi pour initier des projets de médecine personnalisée et proposer des traitements au plus près des besoins de chacun. Il existerait aussi un intérêt fort à compléter nos données de transcriptomique avec d'autres approches technologiques telles que la protéomique et / ou la métabolomique dans le but de cartographier avec précision les bouleversements cellulaires induits par les virus et les médicaments repositionnés. L'étude intégrée de ces signatures « omics » nous permettrait d'approfondir nos connaissances sur les relations hôte-pathogène, pour toujours mieux les combattre.

Dans l'optique de découverte de nouveaux antiviraux ou antimicrobiens, notre stratégie permettrait de mettre en place une réponse rapide en cas d'épidémie de pathogènes comme les virus influenza mais aussi d'autres pathogènes, émergents ou ré-émergents. Dans le contexte pandémique actuel, nous avons effectivement vu que la situation d'urgence a conduit l'ensemble des états à tenter de repositionner un panel de médicaments, s'appuyant sur le concept de polypharmacologie, déjà abordé dans ce manuscrit. La polypharmacologie est aujourd'hui l'un des défis majeurs du développement de médicaments, et elle ouvre de nouvelles voies pour concevoir rationnellement la prochaine génération d'agents thérapeutiques.

## Documents annexes

Annexe 1 : Notice du brevet d'invention intitulé « DILTIAZEM POUR SON UTILISATION DANS LE TRAITEMENT DES INFECTIONS MICROBIENNES » (Source : INPI)



BASE BREVETS

### DILTIAZEM POUR SON UTILISATION DANS LE TRAITEMENT DES INFECTIONS MICROBIENNES

#### DESCRIPTION DOCUMENTS

|   |  |
|---|--|
| N° et date de publication de la demande | FR3081325 - 2019-11-29 (BOPI 2019-48)  |
| Type de la demande                      | A1   |
| N° et date de dépôt                     | FR1854307 - 2018-05-23   |
| N° et date de priorité                  | FR1854307 - 2018-05-23   |
| Classification CIB                      | A61K 31/554 ; A61P 1/00 ; A61P 11/00   |
| Classification CPC                      | A61K 9/0073 ; A61K 31/554 ; A61P 31/00 ; A61P 31/04 ; A61P 31/10 ; A61P 31/12 ; A61P 33/00 |
| Famille de brevets                      | W02019224489A1 ; FR3081325A1   |

#### Abrégé

La présente invention concerne le diltiazem pour son utilisation en tant qu'agent activateur de l'expression d'au moins un gène codant pour un interféron de type III, dans la prévention et/ou le traitement des infections par au moins un microorganisme pathogène des épithéliums des tractus respiratoires et/ou intestinaux.

#### INTERVENANTS

##### Demandeur(s) :

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1 - 43 BOULEVARD DU 11 NOVEMBRE 1918 - 69622 VILLEURBANNE - FR - N° Siren : 196917744

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) - 3 RUE MICHEL ANGE - 75016 PARIS - FR - N° Siren : 180009013

ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON - 15 PARVIS RENE DESCARTES - 69007 LYON - FR - N° Siren : 196932594

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) - 101 RUE DE TOLBIAC - 75013 PARIS 13 - FR - N° Siren : 180036048

UNIVERSITE LAVAL - 2325, RUE DE L'UNIVERSITE - G1V 0A6 QUEBEC - CA

##### Titulaire(s) :

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1 - 43 BOULEVARD DU 11 NOVEMBRE 1918 - 69622 VILLEURBANNE - FR - N° Siren : 196917744

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) - 3 RUE MICHEL ANGE - 75016 PARIS - FR - N° Siren : 180009013

ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON - 15 PARVIS RENE DESCARTES - 69007 LYON - FR - N° Siren : 196932594

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) - 101 RUE DE TOLBIAC - 75013 PARIS 13 - FR - N° Siren : 180036048

UNIVERSITE LAVAL - 2325, RUE DE L'UNIVERSITE - G1V 0A6 QUEBEC - CA

##### Inventeur(s) :

ROSA-CALATRAVA MANUEL - 9 BIS RUE DU DOCTEUR REBATEL - 63003 LYON - FR

TERRIER OLIVIER - 67 RUE BATAILLE - 69008 LYON - FR

NICOLAS DE LAMBALLERIE CLAIRE - 24B IMPASSE DES MIMOSAS - 13820 ENSUES LA REDONNE - FR

BONVIN GUY - 2531 MONTBRAY - G1V 1E7 QUEBEC - CA

PIZZORNO MARIO ANDRES - 14 RUE DOMER - 69007 LYON - FR

##### Mandataire :

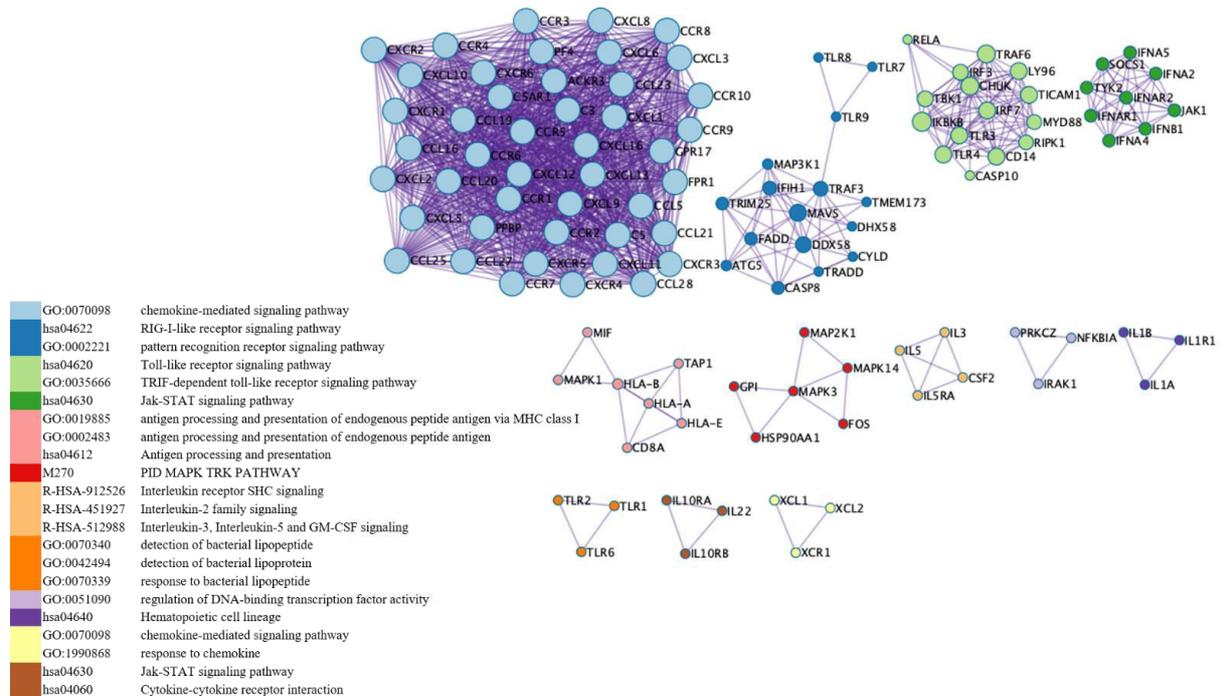
REGIMBEAU - 67 RUE DE SEZE, - 69477 LYON CEDEX 06 - FR

#### STATUT EN FRANCE

|  |            |                |
|--|------------|----------------|
| Publication du rapport de recherche préliminaire | 2019-11-29 | (BOPI 2019-48) |
| Dernière annuité payée                           | 2019-05-13 |                |
| Quantième - N° de l'annuité payée                | 2          |                |
| Date de paiement de la prochaine annuité         | 2020-06-11 |                |



Annexe 2 : Ensemble des gènes choisis pour définition d'une liste à dominante immunitaire. Sous la couleur bleu clair sont regroupés les gènes associés au GO:0070098 (chemokine-mediated signaling pathway), en bleu foncé ceux associés au GO:0002221 / hsa04622 (pattern recognition receptor signaling pathway / RIG-I-like receptor signaling pathway), ceux relatifs au GO:0035666 / hsa04620 (TRIF-dependent toll-like receptor signaling pathway / Toll-like receptor signaling pathway) en vert clair, hsa04630 (Jak-STAT signaling pathway) en vert foncé, GO:0019885 / GO:0002483 / hsa04612 (antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class I / antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen / Antigen processing and presentation) en rose, en rouge ceux associés au MAP kinases, interleukines en orange clair, GO:0070340 / GO:0042494 / GO:0070339 (detection of bacterial lipopeptide) en orange, GO:0051090 (regulation of DNA-binding transcription factor activity) en violet clair, hsa04640 (Hematopoietic cell lineage) en violet, GO:0070098 / GO:1990868 (chemokine-mediated signaling pathway / response to chemokine) en jaune clair, hsa04630 / hsa04060 (Jak-STAT signaling pathway / Cytokine-cytokine receptor interaction) en marron.





*1.1. Strain-dependent impact of G and SH deletions provide new insights for live attenuated HMPV vaccine development*



Article

## Strain-Dependent Impact of G and SH Deletions Provide New Insights for Live-Attenuated HMPV Vaccine Development

Julia Dubois <sup>1,2,\*</sup>, Andrés Pizzorno <sup>1</sup>, Marie-Hélène Cavanagh <sup>2</sup>, Blandine Padey <sup>1</sup>, Claire Nicolas de Lamballerie <sup>1</sup>, Olus Uyar <sup>2</sup>, Marie-Christine Venable <sup>2</sup>, Julie Carbonneau <sup>2</sup>, Aurélien Traversier <sup>1</sup>, Thomas Julien <sup>1,3</sup>, Sophie Lavigne <sup>4</sup>, Christian Couture <sup>4</sup>, Bruno Lina <sup>1,5</sup>, Marie-Eve Hamelin <sup>2</sup>, Olivier Terrier <sup>1</sup>, Manuel Rosa-Calatrava <sup>1,3,\*†</sup> and Guy Boivin <sup>2,†</sup>

- <sup>1</sup> Laboratoire de Virologie et Pathologie Humaine—VirPath team, Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, 69008 Lyon, France; mario-andres.pizzorno@univ-lyon1.fr (A.P.); blandine.padey@univ-lyon1.fr (B.P.); claire.nicolas-de-lamballerie@univ-lyon1.fr (C.N.d.L.); aurelien.traversier@univ-lyon1.fr (A.T.); bruno.lina@univ-lyon1.fr (B.L.); olivier.terrier@univ-lyon1.fr (O.T.)
- <sup>2</sup> Centre de Recherche en Infectiologie of the Centre Hospitalier Universitaire de Québec and Université Laval, QC G1V 4G2, Canada; marie-helene.cavanagh@crchudequebec.ulaval.ca (M.-H.C.); olus.uyar@crchudequebec.ulaval.ca (O.U.); marie-christine.venable@crchudequebec.ulaval.ca (M.-C.V.); julie.carbonneau@crchudequebec.ulaval.ca (J.C.); marie-eve.hamelin@crchudequebec.ulaval.ca (M.-È.H.); guy.boivin@crchudequebec.ulaval.ca (G.B.)
- <sup>3</sup> VirNext, Faculté de Médecine RTH Laennec, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, 69008 Lyon, France; thomas.julien@univ-lyon1.fr
- <sup>4</sup> Quebec Heart and Lung Institute, Laval University, Quebec City, QC G1V 4G5, Canada; sophlavigne@hotmail.com (S.L.); christian.couture@sss.gouv.qc.ca (C.C.)
- <sup>5</sup> Laboratoire de Virologie, Centre National de Référence des virus Influenza, Institut des Agents Infectieux, Groupement Hospitalier Nord, Hospices Civils de Lyon, 69004 Lyon, France
- \* Correspondence: julia.dubois@univ-lyon1.fr (J.D.); manuel.rosa-calatrava@univ-lyon1.fr (M.R.-C.); Tel.: +33-4-78-771-099 (J.D. & M.R.-C.)
- † M.-R.C. and G.B. are co-last authors.

Received: 2 October 2019; Accepted: 23 October 2019; Published: 30 October 2019



**Abstract:** Human metapneumovirus (HMPV) is a major pediatric respiratory pathogen with currently no specific treatment or licensed vaccine. Different strategies to prevent this infection have been evaluated, including live-attenuated vaccines (LAV) based on SH and/or G protein deletions. This approach showed promising outcomes but has not been evaluated further using different viral strains. In that regard, we previously showed that different HMPV strains harbor distinct *in vitro* fusogenic and *in vivo* pathogenic phenotypes, possibly influencing the selection of vaccine strains. In this study, we investigated the putative contribution of the low conserved SH or G accessory proteins in such strain-dependent phenotypes and generated recombinant wild type (WT) and SH- or G-deleted viruses derived from two different patient-derived HMPV strains, A1/C-85473 and B2/CAN98-75. The  $\Delta$ SH and  $\Delta$ G deletions led to different strain-specific phenotypes in both LLC-MK2 cell and reconstituted human airway epithelium models. More interestingly, the  $\Delta$ G-85473 and especially  $\Delta$ SH-C-85473 recombinant viruses conferred significant protection against HMPV challenge and induced immunogenicity against a heterologous strain. In conclusion, our results show that the viral genetic backbone should be considered in the design of live-attenuated HMPV vaccines, and that a SH-deleted virus based on the A1/C-85473 HMPV strain could be a promising LAV candidate as it is both attenuated and protective in mice while being efficiently produced in a cell-based system.

**Keywords:** human metapneumovirus (HMPV); live-attenuated vaccine (LAV); G protein; SH protein; gene deletion; reverse genetics

---

## 1. Introduction

Human metapneumovirus (HMPV) is a worldwide cause of acute respiratory tract infections (ARTI) among children, the elderly and immunocompromised individuals [1,2]. HMPV infections share many features with those of the human respiratory syncytial virus (HRSV), also belonging to the *Pneumoviridae* family [3,4]. Despite the important clinical burden in infants and young children, no licensed vaccine or specific and potent antiviral are currently available. While several HRSV vaccine candidates have already entered clinical trials [5], some HMPV candidates have shown the potential to progress towards clinical evaluation stages [6]. In that regard, different HMPV vaccine strategies have been evaluated in animals, from formalin-inactivated vaccine, leading to enhanced disease [7], to the elaboration of protein-based recombinant vaccines or live-attenuated vaccines (LAV) [6]. Among them, LAV have shown the potential to elicit both humoral and mucosal immunity and mimic natural viral replication routes, and they are therefore considered as highly suitable for HMPV pediatric immunization strategies [8].

HMPV viruses are divided into two main phylogenetic lineages (A and B), which are further divided into at least two sub-lineages (A1, A2a/A2b, B1 and B2) [9–13]. The HMPV genome is composed of a negative single stranded RNA molecule of approximately 13 kb in length, containing eight genes encoding for nine different proteins [14,15], including three surface glycoproteins (F, G, SH). The F (fusion) glycoprotein is the major HMPV antigen [16] and leads to both attachment and fusion of viral particles to the target cell [17]. In contrast, the exact role of G (glycoprotein) and SH (small hydrophobic) glycoproteins is still a matter of debate. Indeed, the F protein of HMPV has been shown to bind not only the cellular integrin  $\alpha V\beta 1$  receptor but also glycosaminoglycans (GAGs), such as heparan sulfate, hence being able to substitute to the virus GAG-mediated attachment function once exclusively attributed to the G protein [18–21]. Nonetheless, a role of the G protein was also suggested in the host cell response to infection [22–24]. For instance, stimulation of the retinoid-acid inducible gene 1 (RIG-I) signaling pathway was reported with a recombinant HMPV (rHMPV) lacking the G protein ( $\Delta G$ ) in vitro, which leads to increased NF- $\kappa B$  activation and enhanced cytokine secretion [22]. On the other hand, the SH protein has been shown to alter the NF- $\kappa B$  pathway [25] and also to form a viroporin complex at the cell membrane [26].

The G and SH proteins have been considered for a long time as “accessory” non-essential proteins for HMPV replication [27], as illustrated by recombinant HMPV viruses lacking either G, SH or both genes that can replicate efficiently in vitro and in vivo [28]. Moreover, the contribution of G and SH proteins to HMPV antigenicity, as well as the attenuation phenotype associated to G-deleted virus, led to the consideration of such modified viruses as potential LAV candidates [16,27]. However, the achievement of such perspectives is nuanced by the fact that all previous studies were based on a unique HMPV backbone, notably the prototypical CAN97-83 strain from the A2 sub-lineage. In that regard, many HMPV subtypes co-circulate each year with high genetic diversity among A and B subtypes, particularly in the case of the less conserved G and SH proteins, with approximately 37% and 59% amino acid sequence homologies between subtypes, respectively [9,14]. In parallel, we and others previously demonstrated that HMPV viruses diverge in their in vitro and/or in vivo phenotypes in a strain-dependent manner, notably by considering the HMPV F and G proteins and their functions [18,29–33].

In this context, we generated recombinant wild type (WT) and SH- or G-deleted viruses ( $\Delta SH$  and  $\Delta G$  respectively) from two patient-derived HMPV strains (A1/C-85473 and B2/CAN98-75) and compared the respective functional impacts of SH and G deletions. In this context, we observed different strain-specific phenotypes both in LLC-MK2 cells and reconstituted human airway epithelium

(HAE) models that provided new insights on the importance of the genetic background in the design of HMPV LAV. This prompted us to evaluate the  $\Delta$ SH-C-85473 and  $\Delta$ G-C-85473 recombinant viruses in BALB/c mice for their capacity to induce efficiently neutralizing antibody response, recruit immune cells in lungs and protect mice against lethal HMPV challenge. Our results suggest that an HMPV C-85473 strain-based LAV harboring SH and/or G deletions would be a promising platform for further development of pneumovirus vaccine candidates.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Cells

LLC-MK2 cells (ATCC CCL-7) were maintained in minimal essential medium (MEM, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Wisent) and 10 mM HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). BSR-T7/5 cells (a kind gift from Dr Ursula Buchholz at the National Institute of Allergy and Infectious Diseases in Bethesda, MD) were cultured in MEM supplemented with 10% FBS, 1% non-essential amino acids (NEAA) (Life Technologies), 10 mM HEPES (Sigma-Aldrich), 1% penicillin/streptomycin (Wisent) and 0.2 mg/mL geneticin (G418, Life Technologies).

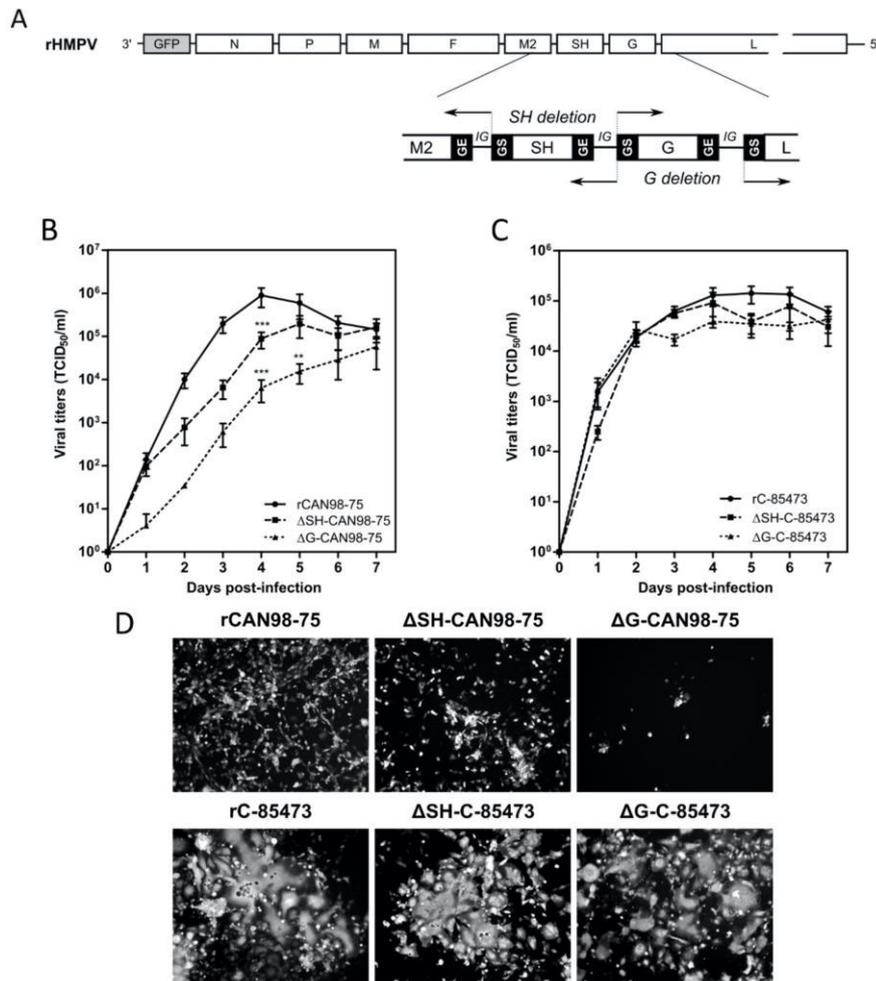
### 2.2. Rescue of Recombinant Viruses

pSP72 plasmids (Promega, Madison, WI, USA) encoding the full-length genomic cDNA of HMPV B2/CAN98-75 or A1/C-85473 strains (GenBank accession numbers: AY145289.1 and KM408076.1, respectively) were constructed as previously described [29,34]. To generate G- or SH-deleted viruses, plasmids encoding HMPV antigenomes were amplified with Phusion DNA polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) using primers (listed in Table 1) designed to match with the 3' and 5' regions of either G or SH genes, and taking care to conserve an intergenic sequence between flanking genes (as represented in Figure 1A). After amplification, linear DNA was phosphorylated and re-ligated by T4 Ligase. All plasmids were sequenced completely.

BSR-T7 cells were transfected with the HMPV antigenome constructions plus four supporting plasmids, encoding N, P, L, and M2-1 ORFs of CAN98-75 and LLC-MK2 cells were added for co-culture (two to three days), as previously described [29]. Cells were harvested, sonicated, centrifuged and the supernatant was diluted to inoculate LLC-MK2 monolayers. After three to four amplification passages onto LLC-MK2 cells, recombinant GFP-expressing viruses (rHMPV) were concentrated by ultracentrifugation, resuspended in OptiMEM (Life Technologies) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Viral stocks were titrated as 50% tissue culture infectious doses (TCID<sub>50</sub>)/mL [35].

**Table 1.** List of primers.

| Target               | Virus Background | Forward Primer                             | Reverse Primer                              |
|----------------------|------------------|--|---|
| SH deletion          | A1/C-85473       | 5'-GGGACAAGTAGTTATGGA-3'                   | 5'-ACTCTGATGTGTTTTACTAAC-3'                 |
|                      | B2/CAN98-75      | 5'-GGGACAAGTGCCATG-3'                      | 5'-ATTCATTTATTTTTIAC<br>AACTTAAGTAAAGCTT-3' |
| G deletion           | A1/C-85473       | 5'-GAGACAAATAACAATGGATC-3'                 | 5'-ATATTATTGTTTTACTTCTAAAT-3'               |
|                      | B2/CAN98-75      | 5'-GGGACAAATAACAATGGATCCG<br>TTTGTAATCC-3' | 5'-ATTTCTGTTTTGTGTA<br>TTACTCAGTGATTG-3'    |
| N gene amplification | A1/C-85473       | 5'-AGAGTCTCAATACACAATAAA                   | 5'-CCTATCTCTGCAGCA                          |
|                      | B2/CAN98-75      | AAGAGATGTAGG-3'                            | TATTTGTAATCAG-3'                            |



**Figure 1.** Construction of recombinant human metapneumovirus (HMPV) viruses and in vitro replicative capacity of SH and G-deleted rHMPV viruses. **(A)** Schematic representation of the genome of a recombinant GFP-expressing recombinant HMPV (rHMPV) viruses, with specific focus on the region of the genome describing the position of primers used for the deletion strategy (arrow, Table 1). GS: gene start. GE: gene end. IG: intergenic sequence. **(B,C)** LLC-MK2 monolayers in 24 wells-plates were infected with each of the six recovered rHMPV strains (rCAN98-75, ΔSH-CAN98-75, ΔG-CAN98-75; rC-85473, ΔSH-C-85473, ΔG-C-85473) at a MOI of 0.01. Supernatants were harvested every 24 h for seven days, frozen, sonicated and titrated as tissue culture infectious doses (TCID<sub>50</sub>)/mL on LLC-MK2 cells. Growth curves represent mean titers of two independent experiments, with each time point titrated in triplicate. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  when comparing each ΔSH/ΔG virus to its wild type (WT) counterpart using repeated measures two-way ANOVA. **(D)** Images of representative cytopathic effects and spread of each virus at three days post-infection were captured using fluorescent microscopy (10 × magnification).

### 2.3. *In Vitro* Experiments

For replication kinetics assays, confluent monolayers of LLC-MK2 cells in 24-wells plates were infected with rHMPV viruses at a Multiplicity of Infection (MOI) of 0.01, as described previously [29]. Supernatants of infected wells were harvested in triplicate every 24 h for seven days and end-point TCID<sub>50</sub>/mL titrations were performed on each sample.

For viral binding assays, confluent LLC-MK2 monolayers were washed with cold PBS and placed on ice before rHMPV inoculation at MOI 0.5. After adsorption times on ice (30 min, 1, 2 or 3 h), the inoculum was removed and replaced by fresh infection medium. After a 24 h incubation at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, cells were trypsinized, centrifuged and fixed using 2% formaldehyde. The percentages of infected GFP positive cells over  $1 \times 10^4$  total cells were measured by flow cytometry by using a FACSCantoII analyzer (Becton Dickinson, Franklin lakes, NJ, USA) with FACSDiva software. Data were analyzed by using the FlowJo software (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA) and normalized to each virus inoculum.

For experimental virus entry assays, confluent LLC-MK2 cells were inoculated at a MOI of 0.5 after being placed on ice for 5 min and washed with cold PBS. The binding of virus to cells proceeded for 2 h on ice until the inoculum was replaced by fresh infection medium. Cells were incubated for 5 min, 30 min, 1 or 2 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> to allow virus entry into cells, medium was then removed and citrate buffer (40 mM sodium citrate dihydrate, 10 mM potassium chloride, 135 mM sodium chloride, pH 3.0) was added to inactivate any remaining extracellular virus, as previously described [36]. Cells were washed in PBS and incubated at 37 °C in fresh medium during 24 h. Infected cells were quantified by GFP detection in flow cytometry and values were normalized to condition without viral inactivation.

### 2.4. Infection of Reconstituted Human Airway Epithelium

In vitro 3D reconstituted human airway epithelium (HAE), derived from a pool of healthy donors' primary bronchial cells (MucilAir™) were purchased from Epithelix (Genève, Switzerland). A viral inoculum corresponding to a MOI of 0.1 was added onto HAE and incubated for 1.5 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. After five days of infection, captured images of infected HAE by fluorescent microscopy were taken and the whole epithelium was scraped in RLT buffer (Qiagen, Hilden, Germany). Total RNA was then extracted with RNeasy minikit (Qiagen) to perform viral genome quantification by RT-qPCR.

### 2.5. Real-Time (RT)-PCR

The total RNA extracted from samples was randomly reverse transcribed using SuperScriptIII RT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at 42 °C. Amplification of the HMPV *N* gene was performed by quantitative PCR using SYBR Green qPCR Master Mix (Agilent, Santa Clara, CA, USA) and a set of primers listed in Table 1. The calibration of HMPV *N* copies was assessed by amplification of a plasmid kindly provided by Dr Ab Osterhaus (Erasmus Medical Center, Rotterdam, The Netherlands).

### 2.6. Animal Studies

Four- to six-week-old BALB/c mice (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA), housed in groups of five per micro-isolator cage, were infected intra-nasally with  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> of rHMPV C-85473 viruses (WT, ΔSH or ΔG). As a control group, mice were mock-infected intra-nasally with OptiMEM. Animals were monitored on a daily basis during 14 days for weight loss, clinical signs, reduced activity or ruffled fur and were sacrificed if they reached 20% of initial weight loss. Mice were euthanized at 5 days post-infection (dpi) using sodium pentobarbital and lungs were removed for the evaluation of viral titers or histopathological analysis, as described [29]. For virus titration, lungs were homogenized in 1 mL of PBS before TCID<sub>50</sub> titration or *N* quantification by RT-qPCR.

For HMPV challenge experiments three weeks post-immunization with  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> of recombinant rC-85473 viruses, mice were challenged intra-nasally with  $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> of WT rC-85473

HMPV virus (50% lethal dose). Mice immunized with OptiMEM were used as negative control. Viral titers and histopathological scores were evaluated at five days post-challenge as previously described. Prior to immunization/infection and 21 days after challenge, blood samples were taken to evaluate the neutralizing antibodies against the recombinant virus (rC-85473) or WT patient-derived homologous C-85473 and heterologous CAN98-75 strains. Reciprocal neutralizing antibody titers were determined by end-point dilution assay, as described [7].

To quantify pulmonary inflammatory cytokine/chemokine levels in HMPV-immunized challenged mice, we euthanized mice and harvested lungs on days one and five post-challenge. Lungs were homogenized in D-PBS containing protease inhibitors to perform the cytokines quantification using a commercial multiplex mouse cytokine bead assay (Bio-Plex Pro Mouse Cytokine 23-plex Assay, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Results were analyzed with the Luminex system (QIAGEN).

In order to analyze lung-infiltrating immune cells, mice were deeply anesthetized and perfused intracardially with D-PBS without  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  on days one and five post-challenge. Lungs were collected, digested with Liberase TL and processed to recover living leukocytes, as described [34]. Then, cells were incubated on ice for 40 min with a pool of antibodies (anti-CD45, anti-Ly6G, anti-CD11b, anti-CD170/Siglec-F, anti-Ly6C, anti-CD11c, anti-F4/80, anti-B220, anti-CD3 $\epsilon$ , anti-CD4 and anti-CD8a, purchased from BD) to discriminate cell populations. The count numbers of total pulmonary leukocytes (CD45+), neutrophils (Ly6G+), macrophages (SiglecF+, F4/80+), lymphocytes T (CD3 $\epsilon$ +), CD4+, CD8+ and lymphocytes B (B220+) were measured by flow cytometry from whole living cells. Number of cells were determined with Precision Count Beads™ (BioLegend, San Diego, CA, USA). Data acquisition and analyses were performed by a BD LSRII flow cytometer and the BD FACSDiva software.

Animal studies were approved by the SFR Biosciences Ethics Committee (CECCAPP C015 Rhône-Alpes, protocol ENS\_2017\_019) according to European ethical guidelines 2010/63/UE on animal experimentation and by the Animal Protection Committee of the Quebec University Health Centre (Protocol CPAC 2017-140-2) according to Canadian Council guidelines on Animal Care.

### 2.7. Statistical Analysis

Two-way ANOVAs with Dunnett post-tests were used to compare data of  $\Delta$ SH and  $\Delta$ G HMPV to their corresponding WT virus. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism7.

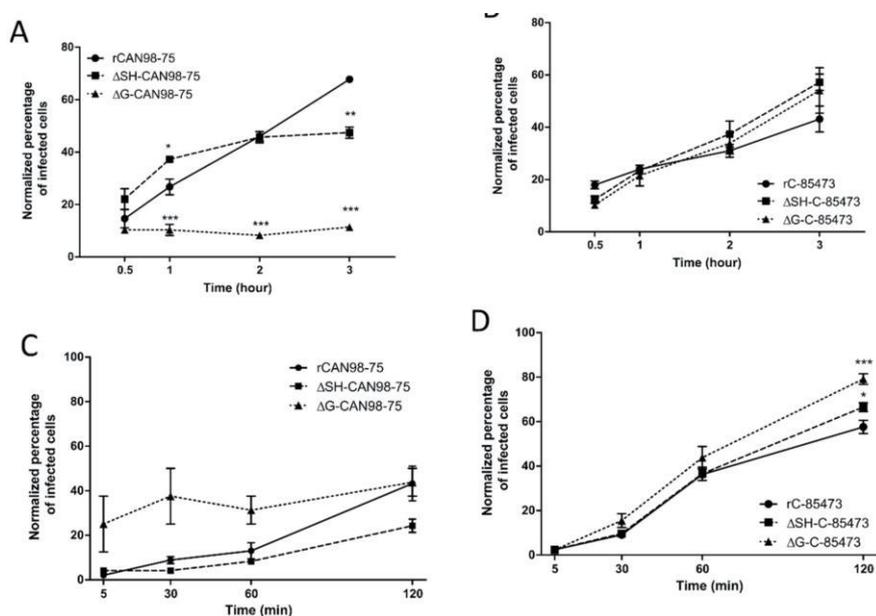
## 3. Results

### 3.1. In Vitro Characteristics of $\Delta$ G- and $\Delta$ SH-HMPV Recombinant Viruses Differ Depending on the Viral Strain Background

Based on our previous studies [29,30], we successfully generated by reverse genetics different GFP-expressing HMPV recombinant viruses derived from the A1/C-85473 strain (rC-85473,  $\Delta$ G-C-85473,  $\Delta$ SH-C-85473) and the B2/CAN98-75 strain (rCAN98-75,  $\Delta$ G-CAN98-75 and  $\Delta$ SH-CAN98-75) (Figure 1A). Rescued recombinant viruses were firstly assessed for their replicative capacity in LLC-MK2 cells over a seven-day period (Figure 1B,C). While rCAN98-75 virus peaked at  $8.95 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL at 4 dpi,  $\Delta$ SH-CAN98-75 virus showed reduced replication as early as 2 dpi, with a 24 h delay to reach peak titer ( $1.95 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL) (Figure 1B). A significantly more attenuated phenotype was observed with the  $\Delta$ G-CAN98-75 virus, for which the highest viral titer measured ( $5.72 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/mL at 7 dpi) was delayed and 1.2 log<sub>10</sub> lower than that of the WT (Figure 1B). This differential replication among the three CAN98-75-based recombinant viruses was also illustrated by representative fluorescent microscopy images of infected LLC-MK2 cells at 3 dpi, notably considering the extent of viral spread and GFP positive cells (Figure 1D). On the contrary, no such important differences in replication properties were observed between the two deleted C-85473-derived recombinant viruses and their WT counterpart (Figure 1C). Peak viral titers of approximately  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL for both the C-85473-WT and  $\Delta$ SH-C-85473 viruses, or a peak of  $4.22 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/mL for the  $\Delta$ G-C-85473 virus were

reached by 4 dpi (Figure 1C). According to previous studies with the viral C-85473 background [29,30], fluorescence microscopy showed that  $\Delta$ SH-C-85473 and  $\Delta$ G-C-85473 viruses harbored high viral spread and hyperfusogenic phenotypes, comparable to the WT rC-85473 (Figure 1D).

Considering the different phenotypes of rHMPV virus derived from the A1/C-85473 and B2/CAN98-75 strains and the “attachment” role attributed to the G protein, we further evaluated the specific impact of the G and SH gene deletions on the binding and the entry of the rHMPV to LLC-MK2 cells (Figure 2). While the rCAN98-75 virus showed progressive binding kinetics, reaching a maximum of 68% GFP-positive cells after 3 h of adsorption, the  $\Delta$ SH-CAN98-75 virus showed faster binding in the first hour, yet achieving a maximal plateau of 47% by 2 h (Figure 2A). Not surprisingly, the deletion of the G protein significantly hampered the binding capacity of the  $\Delta$ G-CAN98-75 virus, with a mean of ~10% GFP-positive cells all throughout the experiment (Figure 2A). In contrast, and as observed for the replicative capacities, the binding ability of the C-85473-derived viruses was not significantly hampered at 3 h by the gene deletions: 57% for  $\Delta$ SH- and 54% for  $\Delta$ G-C-85473 versus 43% for the WT rC-85473 (Figure 2B).



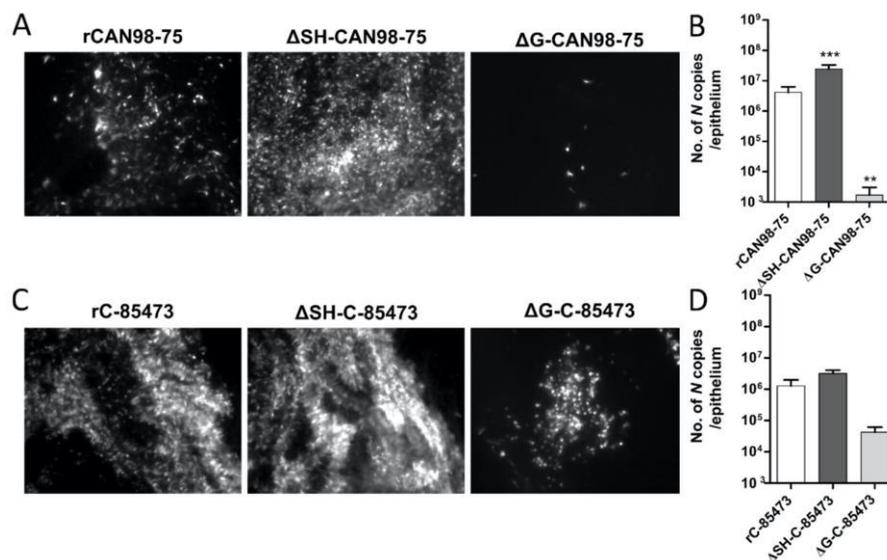
**Figure 2.** Binding and entry kinetics of WT,  $\Delta$ SH- or  $\Delta$ G- rHMPV viruses in LLC-MK2 cells. Binding kinetics of (A) rCAN98-75-derived viruses and (B) rC-85473-derived viruses or entry kinetics of (C) rCAN98-75-derived viruses and (D) rC-85473-derived viruses in LLC-MK2 cells were measured by flow cytometry as described in Materials and Methods. Mean values represented triplicates in two independent experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  when comparing each  $\Delta$ SH /  $\Delta$ G virus to its WT counterpart using repeated measures two-way ANOVA.

Regarding cell entry kinetics, the  $\Delta$ SH-CAN98-75 virus seemed to enter LLC-MK2 cells slower than its WT counterpart and the  $\Delta$ G-CAN98-75 virus, with 24% of  $\Delta$ SH-CAN98-75-infected cells after 120 min compared to 43% for WT and  $\Delta$ G-CAN98-75 viruses (Figure 2C). Conversely, the three rC-85473-derived viruses showed rather rapid cell entry kinetics with more than 36% of infected cells after 60 min. Interestingly, both  $\Delta$ SH- and  $\Delta$ G-C-85473 viruses showed higher entry properties compared to their WT counterpart after 120 min with 66%, 79% and 57% of infected cells, respectively (Figure 2D).

Altogether, our *in vitro* results on virus replication, cell binding and entry kinetics, suggested that G and SH deletions had strong differential impact on HMPV phenotypes depending on the viral background, hence highlighting a strain-dependent role of the viral surface proteins.

### 3.2. $\Delta$ G- and $\Delta$ SH-Viruses Harbor Different Replicative Properties in Reconstituted Human Airway Epithelium

We further investigated the properties of  $\Delta$ G- and  $\Delta$ SH-viruses by using reconstituted human airway epithelium (HAE) as a more physiological model of respiratory infection. Indeed, we previously showed that this model is permissive to HMPV infection and globally mimics the *in vivo* host respiratory epithelium response to such infection [37]. In line with these results, we observed that both rCAN98-75 and rC-85473-derived viruses are also able to infect, replicate and spread within the HAE (Figure 3).



**Figure 3.** Recombinant HMPV viruses differed in infectivity and viral growth in reconstituted human airway epithelium (HAE). MucilAir™ epithelium from healthy donors were infected with the different rHMPV strains at a MOI of 0.1. At 5 dpi, the viral spread in infected ciliated cells was monitored by fluorescence microscopy (images at 10 $\times$  magnification) and the quantity of viral genome was measured by specific RT-qPCR against the *N* viral gene from epithelium lysates, respectively (A) and (B) for rCAN98-75-derived viruses or (C) and (D) for rC-85473-derived viruses. Genome quantifications are shown as means  $\pm$  SD and represent experimental triplicates. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  when comparing each  $\Delta$ SH /  $\Delta$ G virus to its WT counterpart using repeated measures two-way ANOVA.

Based on the GFP expression pattern within the infected HAE at 5 dpi, we observed that the  $\Delta$ SH-CAN98-75 spread more efficiently than its WT counterpart, at the difference of the  $\Delta$ G-CAN98-75 virus, which appeared dramatically impaired (Figure 3A). These results were confirmed by the quantification of *N* gene copies number within the infected epithelium. In line with the fluorescent microscopy observations, the viral quantifications at 5 dpi indicated a significant six-fold higher viral replication of the  $\Delta$ SH-CAN98-75 virus and 3.3  $\log_{10}$  lower values for the  $\Delta$ G-CAN98-75 virus in comparison to the WT CAN98-75 virus (Figure 3B). At the difference, the  $\Delta$ SH-C-85473 virus acted similarly to its WT counterpart, considering both spread pattern and viral replication within the HAE

model (Figure 3C,D). In addition, the spread of the  $\Delta$ G-C-85473 virus seemed to be more affected in HAE model than in LLC-MK2 monolayer (Figure 3C) even though its replication diminished slightly in comparison to the WT rC-85473 virus, considering the 30-fold decrease of the number of *N* gene copies (Figure 3D).

These results indicate that rHMPV harbored different strain-dependent replicative properties in the HAE model (Figure 3) compared to the LLC-MK2 model (Figure 1). In the CAN98-75 viral background, the SH deletion significantly enhanced the viral replication and spread in HAE, whereas it caused a deleterious delay of replication in LLC-MK2 cells. In addition, the G deletion appeared to attenuate excessively the viral replication in HAE, in line with results in LLC-MK2 model. In contrast, rC-85473 viruses showed similar characteristics in both HAE and LLC-MK2 models, including comparable replication phenotypes between the WT virus and its derived deleted viruses, and especially the  $\Delta$ SH-C-85473 virus.

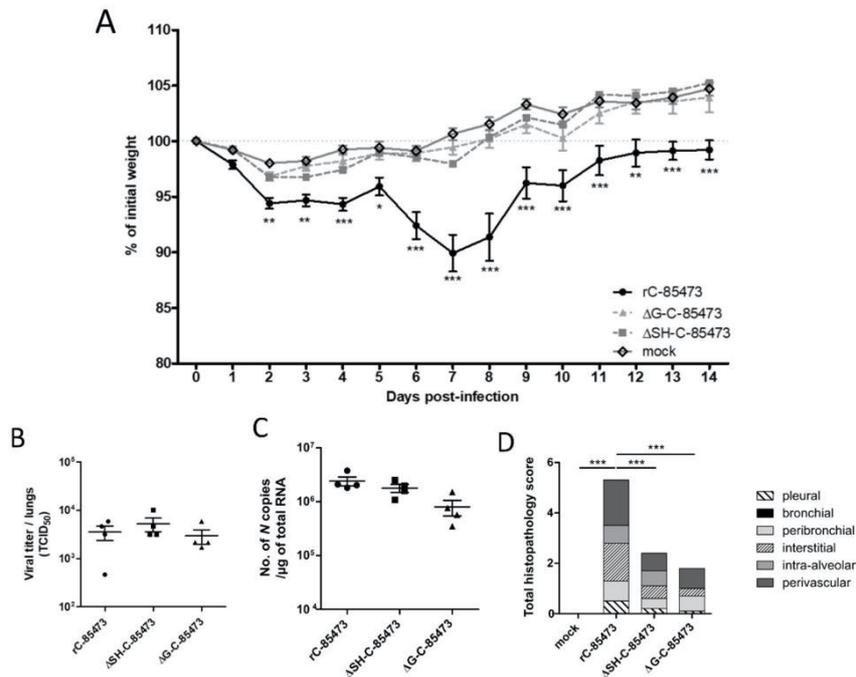
Altogether, considering the characteristics of the rC-85473-derived viruses in LLC-MK2 and HAE models, we focused on this viral backbone to further investigate in vivo functional impact of SH- and G-deletions and evaluate their potential in the development of LAV candidates.

### 3.3. Immunization with Deleted-C-85473 Viruses Reduces HMPV Disease Severity in Challenged BALB/c Mice

We therefore infected mice intra-nasally with  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> of either  $\Delta$ G-C-85473 or  $\Delta$ SH-C-85473 viruses, the equivalent non-lethal dose inoculum needed to induce a significant (>10%) weight loss with the WT rC-85473 virus at 7 dpi (Figure 4A). Similar to the mock (non-infected) group and in contrast with the WT rC-85473, neither weight loss nor clinical signs were observed in the  $\Delta$ G-C-85473 and  $\Delta$ SH-C-85473-infected groups during the 14-day follow-up. In contrast, lung viral titers at 5 dpi were comparable between WT and deleted viruses, as determined by both cell culture and molecular methods (Figure 4B,C). In agreement with the weight curves, lower histopathological scores were recorded for both  $\Delta$ G-C-85473 and  $\Delta$ SH-C-85473-infected mice compared to the WT group (1.8 and 2.4 versus 5.3, respectively), particularly owing to significant reductions in interstitial, perivascular and/or intra-alveolar inflammation (Figure 4D).

We then evaluated the capacity of  $\Delta$ SH- and  $\Delta$ G-C-85473 attenuated viruses to protect mice from a lethal viral challenge. Upon viral challenge with  $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> of rC-85473 virus, mock-immunized mice showed significant (50%) HMPV-associated mortality, starting on day five post-challenge and spanning until day eight post-challenge, with mean weight loss of 11% (peak after seven days) (Figure 5A). Conversely, both  $\Delta$ SH- and  $\Delta$ G-C-85473-immunized mice groups, as well as control rC-85473-immunized mice, were completely protected from HMPV-associated mortality induced by viral challenge and showed mean maximum weight losses of 3%–4% of their initial weight (peak at day two post-challenge) (Figure 5A,B).

Similarly, to the rC-85473 WT virus, the protection induced by immunization with  $\Delta$ G-C-85473 and  $\Delta$ SH-C-85473 was associated with the induction of high neutralizing antibody titers at 21 days after challenge, particularly in the case of  $\Delta$ SH-C-85473 (Table 2). Importantly, neutralization assays also showed that induced antibody responses were effective in neutralizing WT patient-derived strains as well as the heterologous CAN98-75 HMPV B strain (Table 2). In line with these results, we were unable to recover HMPV viruses or detect viral genome from the lungs of any of the three different rHMPV-immunized groups on day five post-challenge (Table 2). However, we still recorded reduced but significant pulmonary inflammation in WT- and  $\Delta$ G-C-85473-immunized mice, compared to mock-immunized mice (scores of 7.5 and 7 versus 9.5, respectively), whereas  $\Delta$ SH-C-85473-immunized mice had a much lower histopathological score of 2.5 (Figure 5C). Indeed,  $\Delta$ SH-C-85473-immunized group showed reduced interstitial and perivascular inflammations and no bronchial and intra-alveolar inflammation (Figure 5C). In contrast to mock-immunized mice, none of the rHMPV-immunized groups developed pulmonary edema after viral challenge (Figure S1).

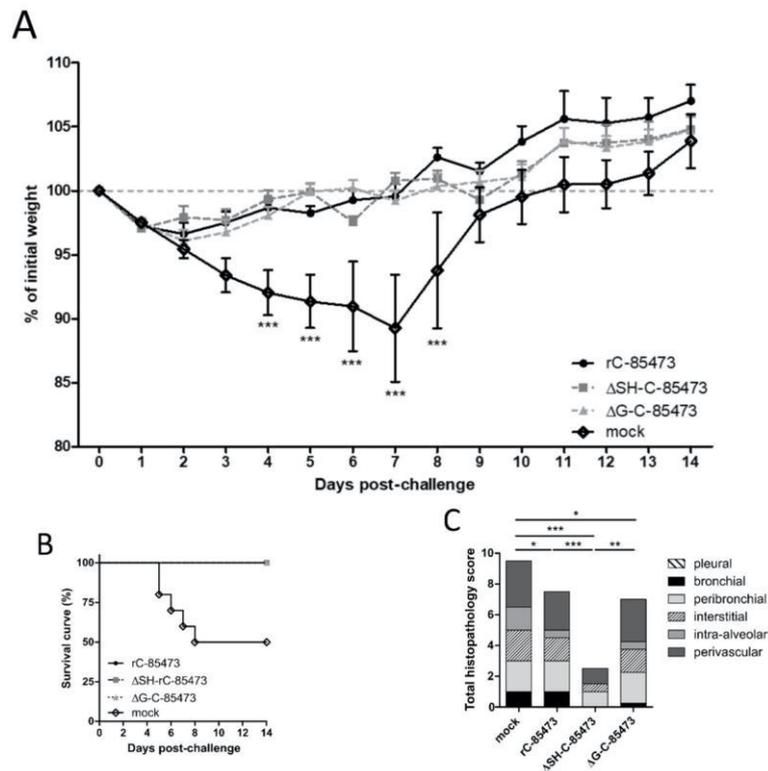


**Figure 4.** Weight loss, lung viral titers and histopathological scores of BALB/c mice infected with rC-85473-derived live-attenuated vaccines (LAV) candidates. BALB/c mice were intranasally infected with  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> of rC-85473 rHMPV viruses (WT, ΔSH and ΔG). (A) Weight loss was monitored during 14 days since infection ( $n = 16$ ). At 5 dpi, mice were euthanized and lungs were harvested to measure viral titers by both TCID<sub>50</sub> titration (B) and quantitative RT-PCR (C) ( $n = 4$ ). (D) Cumulative histopathological scores (bronchial, peribronchial, perivascular, interstitial, pleural and intra-alveolar inflammation scores) of other infected mouse lungs were evaluated at 5 dpi ( $n = 5$ ). Data are shown as means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  when comparing each ΔSH/ΔG virus to its WT counterpart using repeated measures two-way ANOVA.

**Table 2.** Immunogenicity and protective efficiency of HMPV C-85473-derived viruses in mice.

| Imm. virus  | Imm. Inoculum (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> ) | Reciprocal Neutralization Titer 21 Days Post-Challenge against Different HMPV Strains ( $n = 4$ ) <sup>1</sup> |            |             | Challenge Virus Replication in Lungs Five Days Post-Challenge ( $n = 4$ ) |  |
|-------------|---|--|------------|-------------|---|--|
|             |   | rC-85473   | WT C-85473 | WT CAN98-75 | Mice with Detectable Virus (%)  | Mean Virus Titer (log <sub>10</sub> N copies/μg RNA) |
| mock        |   | 10   | 7.5        | 12.5        | 100   | 4.8 $\pm$ 4.3  |
| rC-85473    | 5.7   | >160   | 80         | 60          | 0   | <1   |
| ΔSH-C-85473 | 5.7   | >160   | >160       | >160        | 0   | <1   |
| ΔG-C-85473  | 5.7   | >160   | 80         | 70          | 0   | <1   |

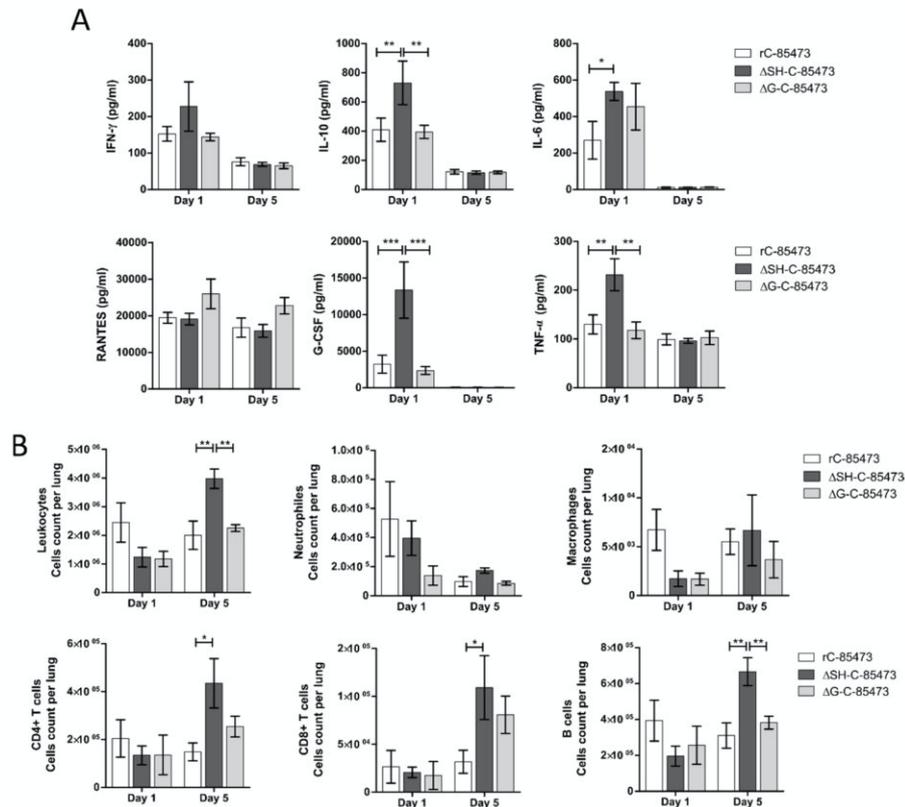
<sup>1</sup> Sera were tested for neutralization efficiency against rC-85473 virus, which was the same recombinant virus used for infectious challenge; WT C-85473, as homologous A1 virus; and WT CAN98-75, as heterologous B2 strain. Two biological replicates per group were tested. The “naïve” status of mice was confirmed by neutralizing antibody dosage of sera harvested one day before intranasal immunization (reciprocal titer <5). Imm. = immunization.



**Figure 5.** Weight loss, survival and histopathological scores of HMPV-immunized mice after viral challenge. BALB/c mice were intranasally immunized with  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> of ΔSH-C-85473, ΔG-C-85473 or WT rC85473 viruses (immunization control), as previously described. Three weeks after immunization, animals ( $n = 16$ ) were inoculated with  $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> (LD<sub>50</sub>) of rC-85473 (viral challenge). (A) Weight loss and (B) mortality were monitored during 14 days after the viral challenge ( $n = 10$ ). (C) Cumulative histopathological scores (bronchial, peribronchial, perivascular, interstitial, pleural and intra-alveolar inflammation scores) of infected mouse lungs were evaluated on day five post challenge ( $n = 2$ ) while pulmonary viral titers were measured by RT-qPCR ( $n = 4$ , Table 2). Data are shown as means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  when comparing each ΔSH/ΔG virus to its WT counterpart using repeated measures two-way ANOVA.

To further characterize the immune response after viral challenge of the rHMPV-immunized mice, we characterized the production of pulmonary cytokines/chemokines and the subsequent infiltration of different immune cell populations into the lungs. As soon as one day after the challenge, we measured high expression levels of cytokines, corresponding to an acute response to high dose of viral challenge, as it is the case for RANTES (19,000 pg/mL, Figure 6A). Interestingly, higher levels of several cytokines/chemokines (IL-10, IL-6, G-CSF, TNF- $\alpha$ ) were measured in the lungs of ΔSH-immunized mice in comparison with WT and ΔG-immunized groups (Figure 6A). In accordance with the absence of detectable virus (Table 2) and the decreased histopathological scores (Figure 5C), the level of most of the measured cytokines lowered five days post-challenge (Figure 6A). In addition, we observed an important recruitment of leukocyte populations in rHMPV-immunized groups from day one after challenge, which persisted for at least five days later (Figure 6B). Of note, the ΔSH-immunized group

showed significant enhanced infiltration of leukocytes in lungs five days post-challenge, particularly T CD4+, T CD8+ and B cell populations (Figure 6B).



**Figure 6.** HMPV-immunized mice showed distinct cytokine/chemokine and immune cell infiltration profiles through time after viral challenge. BALB/c mice were intranasally immunized with  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> of  $\Delta$ SH-C-85473,  $\Delta$ G-C-85473 or WT rC85473 viruses (immunization control), as previously described. Three weeks after immunization, animals were inoculated with  $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> (LD<sub>50</sub>) of rC-85473 (viral challenge). (A) Pulmonary inflammatory cytokine/chemokine levels in HMPV-immunized challenged mice were determined from lung homogenates on days one and five post-challenge, using a multiplex bead-based assay. Six cytokines/chemokines (IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-6, RANTES, G-CSF, TNF- $\alpha$ ) were selected considering both their detection levels and significance in HMPV-related disease. (B) Immune cell infiltration in lung homogenates was evaluated by flow cytometry on days one and five post challenge. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  comparing each group using repeated measures two-way ANOVA.

Overall, our results suggested that deleted rC-85473 viruses harbored distinct but attenuated and protective properties in the BALB/c model against a lethal HMPV viral challenge, together with reduced disease severity, weaker inflammatory responses and a balanced stimulation of the immune response, especially in the case of the  $\Delta$ SH-C-85473 virus.

#### 4. Discussion

Despite the necessity to develop vaccination strategies to prevent ARTI, neither FDA-approved vaccine nor specific antiviral against HMPV are currently available [38,39]. Considering the major burden of this virus in infants and young children, HMPV live-attenuated vaccines offer interesting properties to protect this specific population [8]. In that regard, while the first and only phase I clinical trial based on human-to-avian HMPV P substitution was non-conclusive [40], attenuation approaches based on gene deletion showed promising results in animals [27,41]. Nevertheless, previous studies on HMPV LAV were mainly restricted to the A2/CAN97-83 strain and did not take into account the genetic variability of HMPV viruses between and within subgroups, especially regarding the poorly conserved G and SH glycoproteins [42,43]. In fact, the limited knowledge on HMPV virulence factors and their putative roles still hampers the development of efficient therapeutic and prophylactic strategies against severe HMPV disease. In this study, we sought to address the problem of the impact of viral background on the differential effect of G and SH deletions by using two patient-derived HMPV strains, A1/C-85473 and B2/CAN98-75. We demonstrated that G- or SH-deleted A1/C-85473 viruses had unchanged replicative capacity *in vitro* compared to their WT counterpart (Figure 1), in line with a previous study advocating the putative “accessory role” of these two gene-products [27]. However, we observed that viral replication in LLC-MK2 cells was significantly decreased when G and, to a lesser extent SH, were deleted from the B2/CAN98-75 virus (Figure 1). Such a distinct replication phenotype between A and B viruses (A1/C-85473 and A2/CAN97-83 vs. B2/CAN98-75) suggests that the HMPV genetic background might influence the impact of gene deletions on viral fitness. This is of particular importance if we consider efficient production yield (i.e., comparable to that of the WT virus) as a major requirement for the development of a LAV candidate.

We also previously showed that C-85473 and CAN98-75 strains induce very different fusogenic phenotypes *in vitro* and pathogenicity *in vivo*, thanks to the specific characteristics of their respective F glycoproteins [29,30]. Besides its major role in viral fusion, the F protein may also retain importance for viral binding and entry into cell [17,20,21]. In this way, the C-85473 virus appeared to be less dependent on the G protein to perform virus-to-cell binding than the CAN98-75 virus (Figure 2). It seems therefore possible that the lack of the G protein could be compensated by the hyperfusogenic activity of the C-85473 F protein. In our study, the differential profiles exhibited by the two strains strengthen this hypothesis, as illustrated by the enhanced entry kinetics of the rC-85473 virus in comparison to the rCAN98-75 virus, despite the improved capacity of the latter to bind LLC-MK2 cells (Figure 2). Alternatively, although its specific function is still debated, SH is presumed to be a putative cofactor of some F proteins and therefore it could participate in the viral entry [26]. In this way, SH deletion could lead to mild viral attenuation *in vitro*, as reported for the  $\Delta$ SH-CAN98-75 virus in Figure 1.

Contrasting with the LLC-MK2 model, the replication and spread of both  $\Delta$ G viruses was more limited in the HAE model, whereas the  $\Delta$ SH viruses showed efficient infectivity, notably in the case of the  $\Delta$ SH-CAN98-75 virus (Figure 3). Such divergent phenotypes between deleted viruses was previously shown with HRSV, for which the G protein differently contributes to virus-cell binding depending on both the cell lines and the virus strains studied [36]. In light of our results, we therefore propose that the stratified nature and surface receptor configuration of the physiological HAE model, combined with the presence of cilia and mucus, lead to a more limiting environment for effective infection with a G-deleted HMPV virus. Taken together, our data show for the first time the importance of HMPV background and experimental models which must be considered in the study of G and SH protein functions.

Based on their specific characteristics in the LLC-MK2 and HAE models, we focused on the two deleted ( $\Delta$ SH and  $\Delta$ G) viruses issued from the C-85473 strain for further investigation in BALB/c mice. At the difference of other small animal models previously used, the murine model allows the monitoring of weight loss, lung viral replication/inflammation and other clinical signs during the time course of HMPV infection [44]. In our study, the  $\Delta$ SH-C-85473 and  $\Delta$ G-C-85473 viruses replicated

in mice lungs similarly to their WT counterpart at 5 dpi while inducing no weight loss or mortality and lesser tissue inflammation (Figure 4). Accordingly, we recently showed that the SH deletion in the C-85473 backbone limits the virus-induced activation of NLRP3-inflammasome both in vitro and in vivo, and subsequently reduces inflammation and pathogenicity in HMPV infected mice [34].

Moreover, immunization with  $\Delta$ SH-C-85473 and  $\Delta$ G-C-85473 fully protected mice against viral challenge with rC-85473 (Figure 5, Table 2). Remarkably, the post-challenge antibody response induced in both vaccinated groups was also effective against a heterologous HMPV B strain (Table 2), contrary to what was observed for the mock-immunized yet challenged group. Evaluation of the real cross-protection potential of immunization with  $\Delta$ SH-C-85473 and  $\Delta$ G-C-85473 candidates is needed. Additionally,  $\Delta$ SH-C-85473-immunized mice showed a distinct pulmonary cytokine/chemokine profile after viral challenge, with a significant increasing expression of several HMPV-response related markers compared to the WT and  $\Delta$ G-C-85473 immunized groups (Figure 6A). Interestingly, a high expression of IL-10 cytokine [45] and G-CSF chemokine, which were reported as T-cell activators [46], was concomitant with an enhanced recruitment of immune cells (T CD4+, T CD8+, B cells) in lungs of  $\Delta$ SH-C-85473-immunized mice at five days post-challenge (Figure 6B). Moreover, such a production of anti-inflammatory cytokine/chemokine counteracts the observed increased production of TNF- $\alpha$  and IL-6 pro-inflammatory (Figure 6A).

## 5. Conclusions

Given the significant clinical burden of HMPV [1,2] and some pitfalls in the development of vaccine candidates [7,40,47], we considered it important to reexamine the gene deletion-based attenuation approach [6,27,41]. Our study provides compelling evidence on the so far overlooked variable function of HMPV G and SH proteins relative to the viral background, the differential effects resulting from their deletion and the potential implications for the design of LAV candidates. In line with this rationale, the attenuated and broad protective properties displayed by the  $\Delta$ SH-C-85473-engineered virus, yet not inducing enhanced disease markers, in addition to its efficient replication in cell-based system, make it a promising live-attenuated HMPV vaccine candidate.

## 6. Patents

The authors declare a patent submission (FR1856801, PCT FR2019/051759) about HMPV LAV candidates.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-393X/7/4/164/s1>, Figure S1: HMPV-immunized mice showed significant differences in histopathology five days after viral challenge.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.D., M.R.-C. and G.B.; methodology, J.D. and M.-H.C.; validation, J.D. and M.-È.H.; formal analysis, J.D. and C.N.d.L.; investigation, J.D., B.P., O.U., M.-C.V., J.C., A.T., T.J., A.P., S.L. and C.C.; resources, J.C. and A.T.; writing—original draft preparation, J.D.; writing—review and editing, A.P., O.T., M.-È.H., M.R.-C. and G.B.; visualization, J.D. and C.N.d.L.; supervision, B.L., G.B. and M.R.-C.; project administration, J.D., G.B. and M.R.-C.; funding acquisition, G.B. and M.R.-C.

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

**Acknowledgments:** We thank the microscopy and flow cytometry services of the Plateforme of Bio-Imagerie of CRI in Québec and the Centre d'Imagerie Quantitative Lyon-Est (CIQLE) in Lyon, as well as the animal care services of the Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris in Lyon.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Van den Hoogen, B.G.; Herfst, S.; Sprong, L.; Cane, P.A.; Forleo-Neto, E.; de Swart, R.L.; Osterhaus, A.D.; Fouchier, R.A. Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. *Emerg. Infect. Dis.* **2004**, *10*, 658–666. [[CrossRef](#)]
2. Feuillet, F.; Lina, B.; Rosa-Calatrava, M.; Boivin, G. Ten years of human metapneumovirus research. *J. Clin. Virol.* **2012**, *53*, 97–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Papenburg, J.; Boivin, G. The distinguishing features of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus. *Rev. Med. Virol.* **2010**, *20*, 245–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Rima, B.; Collins, P.; Easton, A.; Fouchier, R.; Kurath, G.; Lamb, R.A.; Lee, B.; Maisner, A.; Rota, P.; Wang, L.; et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Pneumoviridae. *J. Gen. Virol.* **2017**, *98*, 2912–2913. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Mazur, N.I.; Higgins, D.; Nunes, M.C.; Melero, J.A.; Langedijk, A.C.; Horsley, N.; Buchholz, U.J.; Openshaw, P.J.; McLellan, J.S.; Englund, J.A.; et al. The respiratory syncytial virus vaccine landscape: lessons from the graveyard and promising candidates. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, e295–e311. [[CrossRef](#)]
6. Marquez-Escobar, V.A. Current developments and prospects on human metapneumovirus vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **2017**, *16*, 419–431. [[CrossRef](#)]
7. Hamelin, M.E.; Couture, C.; Sackett, M.K.; Boivin, G. Enhanced lung disease and Th<sub>2</sub> response following human metapneumovirus infection in mice immunized with the inactivated virus. *J. Gen. Virol.* **2007**, *88*, 3391–3400. [[CrossRef](#)]
8. Karron, R.A.; Buchholz, U.J.; Collins, P.L. Live-attenuated respiratory syncytial virus vaccines. *Curr Top Microbiol. Immunol.* **2013**, *372*, 259–284.
9. Papenburg, J.; Carbonneau, J.; Isabel, S.; Bergeron, M.G.; Williams, J.V.; De Serres, G.; Hamelin, M.E.; Boivin, G. Genetic diversity and molecular evolution of the major human metapneumovirus surface glycoproteins over a decade. *J. Clin. Virol.* **2013**, *58*, 541–547. [[CrossRef](#)]
10. Huck, B.; Scharf, G.; Neumann-Haefelin, D.; Puppe, W.; Weigl, J.; Falcone, V. Novel human metapneumovirus sublineage. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 147–150. [[CrossRef](#)]
11. Peret, T.C.; Boivin, G.; Li, Y.; Couillard, M.; Humphrey, C.; Osterhaus, A.D.; Erdman, D.D.; Anderson, L.J. Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. *J. Infect. Dis.* **2002**, *185*, 1660–1663. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Hamelin, M.E.; Abed, Y.; Boivin, G. Human metapneumovirus: a new player among respiratory viruses. *Clin. Infect. Dis.* **2004**, *38*, 983–990. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Nidaira, M.; Taira, K.; Hamabata, H.; Kawaki, T.; Gushi, K.; Mahoe, Y.; Maeshiro, N.; Azama, Y.; Okano, S.; Kyan, H.; et al. Molecular epidemiology of human metapneumovirus from 2009 to 2011 in Okinawa, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* **2012**, *65*, 337–340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Biacchesi, S.; Skiadopoulos, M.H.; Boivin, G.; Hanson, C.T.; Murphy, B.R.; Collins, P.L.; Buchholz, U.J. Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups. *Virology* **2003**, *315*, 1–9. [[CrossRef](#)]
15. Van den Hoogen, B.G.; Bestebroer, T.M.; Osterhaus, A.D.; Fouchier, R.A. Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology* **2002**, *295*, 119–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Skiadopoulos, M.H.; Biacchesi, S.; Buchholz, U.J.; Amaro-Carambot, E.; Surman, S.R.; Collins, P.L.; Murphy, B.R. Individual contributions of the human metapneumovirus F, G, and SH surface glycoproteins to the induction of neutralizing antibodies and protective immunity. *Virology* **2006**, *345*, 492–501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Cox, R.G.; Williams, J.V. Breaking in: Human metapneumovirus fusion and entry. *Viruses* **2013**, *5*, 192–210. [[CrossRef](#)]
18. Adamson, P.; Thammawat, S.; Muchondo, G.; Sadlon, T.; Gordon, D. Diversity in glycosaminoglycan binding amongst hMPV G protein lineages. *Viruses* **2012**, *4*, 3785–3803. [[CrossRef](#)]
19. Cox, R.G.; Livesay, S.B.; Johnson, M.; Ohi, M.D.; Williams, J.V. The human metapneumovirus fusion protein mediates entry via an interaction with RGD-binding integrins. *J. Virol.* **2012**, *86*, 12148–12160. [[CrossRef](#)]
20. Chang, A.; Masante, C.; Buchholz, U.J.; Dutch, R.E. Human metapneumovirus (HMPV) binding and infection are mediated by interactions between the HMPV fusion protein and heparan sulfate. *J. Virol.* **2012**, *86*, 3230–3243. [[CrossRef](#)]
21. Cseke, G.; Maginnis, M.S.; Cox, R.G.; Tollefson, S.J.; Podsiad, A.B.; Wright, D.W.; Dermody, T.S.; Williams, J.V. Integrin  $\alpha\beta 1$  promotes infection by human metapneumovirus. *PNAS* **2009**, *106*, 1566–1571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Bao, X.; Liu, T.; Shan, Y.; Li, K.; Garofalo, R.P.; Casola, A. Human metapneumovirus glycoprotein G inhibits innate immune responses. *PLoS Pathog.* **2008**, *4*, e1000077. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kolli, D.; Bao, X.; Liu, T.; Hong, C.; Wang, T.; Garofalo, R.P.; Casola, A. Human metapneumovirus glycoprotein G inhibits TLR4-dependent signaling in monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* **2011**, *187*, 47–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Bao, X.; Kolli, D.; Ren, J.; Liu, T.; Garofalo, R.P.; Casola, A. Human Metapneumovirus Glycoprotein G Disrupts Mitochondrial Signaling in Airway Epithelial Cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e62568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Bao, X.; Kolli, D.; Liu, T.; Shan, Y.; Garofalo, R.P.; Casola, A. Human metapneumovirus small hydrophobic protein inhibits NF- $\kappa$ B transcriptional activity. *J. Virol.* **2008**, *82*, 8224–8229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Masante, C.; El Najjar, F.; Chang, A.; Jones, A.; Moncman, C.L.; Dutch, R.E. The human metapneumovirus small hydrophobic protein has properties consistent with those of a viroporin and can modulate viral fusogenic activity. *J. Virol.* **2014**, *88*, 6423–6433. [[CrossRef](#)]
27. Biacchesi, S.; Skiadopoulos, M.H.; Yang, L.; Lamirande, E.W.; Tran, K.C.; Murphy, B.R.; Collins, P.L.; Buchholz, U.J. Recombinant human Metapneumovirus lacking the small hydrophobic SH and/or attachment G glycoprotein: Deletion of G yields a promising vaccine candidate. *J. Virol.* **2004**, *78*, 12877–12887. [[CrossRef](#)]
28. Biacchesi, S.; Skiadopoulos, M.H.; Tran, K.C.; Murphy, B.R.; Collins, P.L.; Buchholz, U.J. Recovery of human metapneumovirus from cDNA: Optimization of growth in vitro and expression of additional genes. *Virology* **2004**, *321*, 247–259. [[CrossRef](#)]
29. Aerts, L.; Cavanagh, M.H.; Dubois, J.; Carbonneau, J.; Rheaume, C.; Lavigne, S.; Couture, C.; Hamelin, M.E.; Boivin, G. Effect of in vitro syncytium formation on the severity of human metapneumovirus disease in a murine model. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0120283. [[CrossRef](#)]
30. Dubois, J.; Cavanagh, M.H.; Terrier, O.; Hamelin, M.E.; Lina, B.; Shi, R.; Rosa-Calatrava, M.; Boivin, G. Mutations in the fusion protein heptad repeat domains of human metapneumovirus impact on the formation of syncytia. *J. Gen. Virol.* **2017**, *98*, 1174–1180. [[CrossRef](#)]
31. Nao, N.; Sato, K.; Yamagishi, J.; Tahara, M.; Nakatsu, Y.; Seki, F.; Katoh, H.; Ohnuma, A.; Shirogane, Y.; Hayashi, M.; et al. Consensus and variations in cell line specificity among human metapneumovirus strains. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0215822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Mas, V.; Herfst, S.; Osterhaus, A.D.; Fouchier, R.A.; Melero, J.A. Residues of the human metapneumovirus fusion (F) protein critical for its strain-related fusion phenotype: Implications for the virus replication cycle. *J. Virol.* **2011**, *85*, 12650–12661. [[CrossRef](#)]
33. Herfst, S.; Mas, V.; Ver, L.S.; Wierda, R.J.; Osterhaus, A.D.; Fouchier, R.A.; Melero, J.A. Low-pH-induced membrane fusion mediated by human metapneumovirus F protein is a rare, strain-dependent phenomenon. *J. Virol.* **2008**, *82*, 8891–8895. [[CrossRef](#)]
34. Le, V.B.; Dubois, J.; Couture, C.; Cavanagh, M.H.; Uyar, O.; Pizzorno, A.; Rosa-Calatrava, M.; Hamelin, M.E.; Boivin, G. Human metapneumovirus activates NOD-like receptor protein 3 inflammasome via its small hydrophobic protein which plays a detrimental role during infection in mice. *PLoS Pathog.* **2019**, *15*, e1007689. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Hamelin, M.E.; Yim, K.; Kuhn, K.H.; Cragin, R.P.; Boukhvalova, M.; Blanco, J.C.; Prince, G.A.; Boivin, G. Pathogenesis of human metapneumovirus lung infection in BALB/c mice and cotton rats. *J. Virol.* **2005**, *79*, 8894–8903. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Meng, J.; Hotard, A.L.; Currier, M.G.; Lee, S.; Stobart, C.C.; Moore, M.L. Respiratory Syncytial Virus Attachment Glycoprotein Contribution to Infection Depends on the Specific Fusion Protein. *J. Virol.* **2015**, *90*, 245–253. [[CrossRef](#)]
37. Nicolas de Lamballerie, C.; Pizzorno, A.; Dubois, J.; Julien, T.; Padey, B.; Bouveret, M.; Traversier, A.; Legras-Lachuer, C.; Lina, B.; Boivin, G.; et al. Characterization of cellular transcriptomic signatures induced by different respiratory viruses in human reconstituted airway epithelia. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 11493. [[CrossRef](#)]
38. Mayor, S. Acute respiratory infections are world's third leading cause of death. *BMJ* **2010**, *341*, c6360. [[CrossRef](#)]
39. Vekemans, J.; Moorthy, V.; Giersing, B.; Friede, M.; Hombach, J.; Arora, N.; Modjarrad, K.; Smith, P.G.; Karron, R.; Graham, B.; et al. Respiratory syncytial virus vaccine research and development: World Health Organization technological roadmap and preferred product characteristics. *Vaccine* **2018**. [[CrossRef](#)]
40. Karron, R.A.; San Mateo, J.; Wanionek, K.; Collins, P.L.; Buchholz, U.J. Evaluation of a Live Attenuated Human Metapneumovirus Vaccine in Adults and Children. *J. Pediatr. Infect. Dis. Soc.* **2017**, *7*, 86–89. [[CrossRef](#)]

41. Biacchesi, S.; Pham, Q.N.; Skiadopoulos, M.H.; Murphy, B.R.; Collins, P.L.; Buchholz, U.J. Infection of nonhuman primates with recombinant human metapneumovirus lacking the SH, G, or M2-2 protein categorizes each as a nonessential accessory protein and identifies vaccine candidates. *J. Virol.* **2005**, *79*, 12608–12613. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Bastien, N.; Liu, L.; Ward, D.; Taylor, T.; Li, Y. Genetic variability of the G glycoprotein gene of human metapneumovirus. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 3532–3537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Piyaratna, R.; Tollefson, S.J.; Williams, J.V. Genomic analysis of four human metapneumovirus prototypes. *Virus Res.* **2011**, *160*, 200–205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Schildgen, O.; Simon, A.; Williams, J. Animal models for human metapneumovirus (HMPV) infections. *Veterinary research* **2007**, *38*, 117–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Sun, L.; Cornell, T.T.; LeVine, A.; Berlin, A.A.; Hinkovska-Galcheva, V.; Fleszar, A.J.; Lukacs, N.W.; Shanley, T.P. Dual role of interleukin-10 in the regulation of respiratory syncytial virus (RSV)-induced lung inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* **2013**, *172*, 263–279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Malashchenko, V.V.; Meniailo, M.E.; Shmarov, V.A.; Gazatova, N.D.; Melashchenko, O.B.; Goncharov, A.G.; Seledtsova, G.V.; Seledtsov, V.I. Direct anti-inflammatory effects of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on activation and functional properties of human T cell subpopulations in vitro. *Cell. Immunol.* **2018**, *325*, 23–32. [[CrossRef](#)]
47. Kim, H.W.; Canchola, J.G.; Brandt, C.D.; Pyles, G.; Chanock, R.M.; Jensen, K.; Parrott, R.H. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am. J. Epidemiol.* **1969**, *89*, 422–434. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



1.2. *Transcriptional profiling of immune and inflammatory responses in the context of SARS-CoV-2 fungal superinfection in a human airway epithelial model*

1 **Transcriptional profiling of immune and inflammatory responses in the context of**  
2 **SARS-CoV-2 fungal superinfection in a human airway epithelial model**

3

4 Claire Nicolas de Lamballerie<sup>a#</sup>, Andrés Pizzorno<sup>a#</sup>, Julien Fouré<sup>b</sup>, Lea Szpiro<sup>a</sup>, Blandine  
5 Padey<sup>a,b</sup>, Julia Dubois<sup>a</sup>, Thomas Julien<sup>a,c</sup>, Aurélien Traversier<sup>a</sup>, Victoria Dulière<sup>a,c</sup>, Pauline  
6 Bruna<sup>a,c</sup>, Bruno Lina<sup>a,d</sup>, Manuel Rosa-Calatrava<sup>a,c&</sup>, Olivier Terrier<sup>a&\*</sup>

7

8 <sup>a</sup> CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, (Team VirPath), Univ Lyon, Inserm, U1111,  
9 Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, F-69007, Lyon, France.

10 <sup>b</sup> Signia Therapeutics SAS, Lyon, France.

11 <sup>c</sup> VirNext, Faculté de Médecine RTH Laennec, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon,  
12 Lyon, France.

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

15

16 \*Correspondence to: [olivier.terrier@univ-lyon1.fr](mailto:olivier.terrier@univ-lyon1.fr) (OT)

17 #CNdL and AP are co-first authors

18 & MRC and OT are co-last authors

19

20 **Abstract**

21 An increasing number of evidence indicate a relatively high prevalence of superinfections  
22 associated with COVID-19, including invasive aspergillosis, but the underlying mechanisms  
23 remain to be characterized. In the present study, to better understand the biological impact of  
24 superinfection we determine and compare the host transcriptional response to SARS-CoV-2  
25 versus *Aspergillus* superinfection, using a model of reconstituted human airway epithelium.  
26 Our analyses reveal that both simple infection and superinfection induce a strong deregulation  
27 of core components of innate immune and inflammatory responses, with a stronger response  
28 to superinfection in the bronchial epithelial model compared to its nasal counterpart. Our  
29 results also highlight unique transcriptional footprints of SARS-CoV-2 *Aspergillus*  
30 superinfection, such as an imbalanced type I/type III IFN, and an induction of several monocyte  
31 and neutrophil associated chemokines, that could be useful for the understanding of  
32 *Aspergillus*-associated COVID-19 and but also management of severe forms of aspergillosis  
33 in this specific context.

34 **INTRODUCTION**

35

36 The current pandemic of novel coronavirus disease 2019 (COVID-19), caused by severe acute  
37 respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) began in Wuhan, Hubei province, China,  
38 in December 2019. As of May 18, 2020, there have been more than 4,628,903 confirmed  
39 COVID-19 cases in the world as reported by the WHO, including 312,009 deaths (WHO).  
40 SARS-CoV-2 is a beta-coronavirus closely related to the severe acute respiratory syndrome  
41 coronavirus-1 (SARS-CoV-1) and the Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-  
42 CoV) that emerged in 2003 and 2012, respectively.

43

44 In a short period of time, significant effort has been devoted to understanding the molecular  
45 basis of the pathology associated with SARS-CoV-2 infection in an attempt to guide work on  
46 treatment, vaccine and diagnostic test development. Numerous clinical studies have reported  
47 the pathophysiology of COVID-19 has similar aspects to that initially described for SARS-CoV,  
48 *i.e.* acute lung injury due to over-inflammation following early stages driven by infection and  
49 viral replication [1–5]. Nevertheless, the underlying mechanisms of these exuberant  
50 inflammatory responses in SARS-CoV-2 infection remain largely unknown and there is a need  
51 to expand our knowledge of the host's response. In this context, several recent omics-based  
52 approaches, including *in vivo* and *in vitro* transcriptional profiling studies, have highlighted  
53 specific aspects of the signature of infection that could contribute to COVID-19 [6–9]. Blanco-  
54 Melo and colleagues, using transcriptional and serum profiling of COVID-19 patients, have  
55 notably shown that the SARS-CoV-2 infection signature was defined by low levels of Type I  
56 and III interferons juxtaposed to elevated chemokines and high expression of IL-6 [6].

57

58 It is now well known that superinfections of bacterial/fungal origin can affect the course and  
59 severity of respiratory viral infections. For example, the co-pathogenesis of viruses and  
60 bacteria into the lung has been extensively studied, notably in the context of influenza  
61 superinfection by bacteria such as *S. pneumoniae* [10–13]. To date, there are limited data  
62 available on superinfections associated with COVID-19 [14], though superinfections were  
63 reported in 10%-20% of SARS-CoV-2-infected adults admitted to Wuhan hospitals through the  
64 end of January 2020, and notably in 50%-100% of those who died [15]. In intensive care units,  
65 COVID-19 patients are at high risk of developing secondary infections, including fungal  
66 infections *e.g.* invasive pulmonary aspergillosis [16]. Indeed, a recent study on the French  
67 COVID-19 cohort reported that 33% of critically ill COVID-19 patients also showed invasive  
68 aspergillosis [17]. However, while the reasons for increased vulnerability to *Aspergillus* in  
69 COVID-19 patients remain undetermined, the putative contribution of *Aspergillus* to SARS-

70 CoV-2 related lung inflammation and COVID-19 pathophysiology also constitutes a major  
71 unanswered question.

72

73 To better understand the biological impact of superinfection in the SARS-CoV-2 context we  
74 sought to determine and compare the host transcriptional response to SARS-CoV-2 versus a  
75 SARS-CoV-2 + *Aspergillus* superinfection. To reach this goal, we established a model of  
76 SARS-CoV-2 infection and superinfection in reconstituted human airway epithelia (HAE),  
77 based on previously published works [18–20]. Our analysis reveals that both simple infection  
78 and superinfection induce a strong deregulation of core components of innate immune and  
79 inflammatory responses, however, it also highlights unique transcriptional footprints of the  
80 SARS-CoV-2 + *Aspergillus* superinfection that provide valuable insight for the understanding  
81 not only of *Aspergillus*-associated COVID-19 but also for the management of severe forms of  
82 aspergillosis.

83

## 84 **METHODS**

85

### 86 **Reconstituted human airway epithelial model**

87 MucilAir™ HAE reconstituted from human primary cells obtained from nasal or bronchial  
88 biopsies, were provided by Epithelix SARL (Geneva, Switzerland) and maintained in air-liquid  
89 interphase, according to the manufacturer's instructions. For infection experiments, apical  
90 poles were gently washed twice with warm OptiMEM medium (Gibco, ThermoFisher Scientific)  
91 and then infected directly with 150 µl dilution of virus in OptiMEM medium, at a multiplicity of  
92 infection (MOI) of 0.1 (i.e. 5.10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>/epithelium) [20]. For mock infection, the same  
93 procedure was followed using OptiMEM as inoculum. Superinfection was performed in SARS-  
94 CoV-2 infected cells at 48h post-infection, with apical inoculation of 10 µl of *Aspergillus* in  
95 OptiMEM at a MOI of 1. Samples were collected from apical washes or basolateral medium at  
96 72h post infection. Variations in transepithelial electrical resistance (TEER) were measured  
97 using a dedicated volt-ohm meter (EVOM2, Epithelial Volt/Ohm Meter for TEER) and  
98 expressed as Ohm/cm<sup>2</sup>.

99

### 100 **Pathogens**

101 All experiments involving clinical samples and the manipulation of infectious SARS-CoV-2  
102 were performed in biosafety level 3 (BSL-3) facilities, using appropriate protocols. The  
103 BetaCoV/France/IDF0571/2020 SARS-CoV-2 strain used in this study was isolated directly  
104 from a patient sample as described elsewhere [20]. Viral stocks were prepared and quantified  
105 in Vero E6 cells (TCID<sub>50</sub>/mL). *Aspergillus niger* (ATCC 16404) was maintained on potato  
106 dextrose agar for 5–7 d at 37 °C. Conidia were then harvested by washing culture flask with

107 sterile PBS supplemented with 0.1% Tween 20 and quantified on maltose extract agar plates  
108 (CFU/ml).

109

#### 110 **mRNA sequencing**

111 Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN, ref 74104) with DNase  
112 treatment, following the manufacturer's instruction. 500 µg total RNA was used to prepare  
113 polyA-enriched RNA-seq libraries using the KAPA mRNA Hyper Prep Kit (Roche, ref.  
114 KK8581/KK8581). Those libraries were prepared separately for each sample with 11  
115 amplification cycles, then all libraries were equimolar-pooled before sequencing. Paired-end  
116 sequencing (2×100bp) was performed with Illumina NovaSeq 6000 sequencing platform on a  
117 SP flowcell (Illumina, ref: 20040326). Raw reads were first cleaned with Cutadapt 2.8 [21] to  
118 trim adapters ( AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA and  
119 AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT respectively for the first and the second  
120 reads) and low-quality ends (i.e terminal bases with phred quality score below 30). Only reads  
121 longer than 75bp and with less than 20% of N (undetermined base) after trimming were kept  
122 for further analysis. The Kallisto 0.46.1 software was used for reference-indexing and transcript  
123 abundance estimation [22]. The reference transcriptome based on NCBI RefSeq annotation  
124 release 109.20191205 and genome assembly build GRCh37.p13 were chosen for this analysis  
125 [23]. The **Supplementary Data Table 2** provides a summary statistics of the pseudo-alignment  
126 process.

127

#### 128 **Differential expression analysis**

129 Differential expression analysis was performed with R 3.6.3. First, abundances at transcript-  
130 level were imported using tximport 1.14.0 [24]. Only coding mRNA transcripts were considered.  
131 Gene-level effective lengths were obtained by weighted mean with their expression values in  
132 FPKM (Fragment Per Kilobase Million) weights. Raw counts were also computed at gene-level  
133 by sum and used as input for DESeq2 1.26.0 [25]. Normalization within DESeq2 used first  
134 gene-level effective length and then the size factor was estimated using the function  
135 'estimateSizeFactors'. Differential expression testing was performed using default parameters.  
136 P-values were adjusted using the Benjamini-Hochberg method (Benjamini and Hochberg,  
137 1995) after the independent filtering implemented by default in DESeq2. A gene was  
138 considered differentially expressed if both its adjusted p-value was below 0.01 and its induced  
139 change in expression was at least a two-fold increase (for up-regulated genes) or a two-fold  
140 decrease (for down-regulated genes) compared to the control condition. Finally, the NCBI gene  
141 IDs were mapped to Uniprot IDs using Uniprot cross-references  
142 (<https://www.uniprot.org/database/DB-0118>) [23,26]. First, Uniprot entries associated to  
143 several gene IDs were removed. Indeed, we were not focused on gene fusion products or

144 read-through transcripts in this study. The protein-protein interaction (PPI) network was  
145 analyzed with STRING 11.0 and visualized with Cytoscape 3.8.0.

146

#### 147 **In silico functional analysis**

148 Based on mapped Uniprot IDs, gene set enrichment was performed using the parent-child  
149 union method as previously described [27]. In this method each functional term, called child,  
150 is considered relatively to its parents to compute the probability of enrichment (p-value). We  
151 considered three functional databases with parent-child relations: Reactome (Fabregat et al.,  
152 2018), Uniprot Keyword (restricted to “Biological process” and “Disease”) (Breuza et al., 2016)  
153 and Gene ontology (Restricted to “Biological process”) (Ashburner et al., 2000; The Gene  
154 Ontology Consortium, 2015). Different files (available online: URLs were all accessed the  
155 04/02/2020) were parsed to define Uniprot ID associations with terms and identify child to  
156 parent relations within each functional database; URLs are specified in **Supplementary Data**  
157 **Table 1.**

158

## 159 **RESULTS**

160

### 161 **Simple infection and superinfection induce a strong deregulation of core components** 162 **of innate immune and inflammatory responses.**

163 In order to identify similarities and differences between the host response to SARS-CoV-2  
164 simple infection and *Aspergillus* superinfection, we sought to investigate the transcriptome of  
165 human respiratory epithelial cells during infection, in comparison with non-infected cells. Aware  
166 of the inherent limitations of experimental models using cell lines, we set up a model of  
167 infection/superinfection in a physiological model of reconstituted human airway epithelium  
168 (HAE). Developed from biopsies of nasal or bronchial cells differentiated in the air/liquid  
169 interphase, these HAE models, that we previously used with different respiratory viruses  
170 including SARS-CoV-2 [18–20] reproduce with high fidelity most of the main structural,  
171 functional and innate immune features of the human respiratory epithelium that play a central  
172 role during infection, hence constituting an interesting surrogate to study airway disease  
173 mechanisms. We infected nasal or bronchial HAE with SARS-CoV-2, and superinfection with  
174 *Aspergillus* was performed at 48 hours post-infection (hpi), which we had previously defined  
175 as the peak of acute SARS-CoV-2 infection in the HAE model [20]. Mock-infected, infected  
176 (CoV) and superinfected samples (CoV+Asp) were harvested at 72 hpi (24 h after  
177 superinfection) to perform mRNA-seq analysis (**Fig. 1A**). Both nasal and bronchial HAE  
178 models of superinfection were further characterized and validated in terms of viral production,  
179 impact on trans-epithelial resistance and apical release of IL-6, which we used as hallmarks of  
180 infection (**Fig. 1A**). Interestingly, in contrast with nasal HAE, we observed a significative

6

181 increase on the relative viral production in the context of superinfection in bronchial HAE,  
182 associated with higher IL-6 levels and a stronger negative impact on trans-epithelial resistance  
183 (**Fig. 1B**).

184

185 **CoV+Asp superinfection transcriptomic signature recapitulates the signature CoV**  
186 **infection, but with a distinct regulation of the inflammatory response.**

187 Differential expression analysis of mRNA-seq data compared to the mock-infected condition  
188 identified 1638 and 454 differentially expressed genes (DEGs) in SARS-CoV-2-infected nasal  
189 and bronchial HAE, respectively ( $FC \geq 2$ , Benjamini-Hochberg adjusted p-value  $< 0.01$ ). In the  
190 context of CoV+Asp superinfection, the number of DEGs was notably higher, with 2979 and  
191 3235 genes in nasal and bronchial HAE, respectively (**Supplementary Data File 1**).  
192 Interestingly, there was an important overlap between CoV infection and CoV+Asp  
193 superinfection associated DEGs in both nasal and bronchial models. As illustrated in the Venn  
194 diagrams (**Fig. 1C**), more than 96% (nasal HAE) and 99% (bronchial HAE) of DEGs of the  
195 CoV signature were also part of the CoV+Asp signature. To provide further functional  
196 interpretation of the global transcriptional signatures, we performed a functional enrichment  
197 analysis on the CoV and CoV+Asp nasal and bronchial models. Gene Ontology (GO), UniProt  
198 (KW) and Reactome (RC) terms were considered enriched when their Bonferroni-adjusted  
199 corrected enrichment p-value was  $< 0.05$  (**Fig. 1D**). As anticipated, a large part of the most  
200 enriched and shared terms between all experimental conditions was related to the host  
201 response to infection (Regulation of response to cytokine stimulus, regulation of defense  
202 response, regulation of response to biotic stimulus) and also to cornification, which regroups  
203 genes mostly involved in cell-death mechanisms (**Fig. 1D**). Interestingly, functional  
204 enrichments specific to CoV infection or CoV+Asp superinfection were also highlighted. For  
205 example, gene clusters harboring terms associated with epithelium physiology and cilium  
206 movements (regulation of cellular component movements, cell projection assembly,  
207 intraflagellar transport) but also with intra and extra-cellular signaling (post-translational protein  
208 phosphorylation, protein localization to extracellular membrane, peptide secretion) were  
209 exclusively enriched in the context of CoV+Asp superinfection (**Fig. 1D**). In parallel, given the  
210 importance of the exacerbated immune response observed mainly in severe COVID-19 cases,  
211 we further analyzed the inflammation-related terms and identified similar, yet to a different  
212 extent, regulation patterns for genes involved in the positive regulation of inflammatory  
213 response (GO:0050729) between nasal and bronchial HAE. As exemplified in the heatmap  
214 (**Fig. 1D**), deregulated genes such as calgranulin coding genes S100A12 and S100A9/A8 and  
215 downregulated genes such as Vesicle-associated membrane protein coding genes VAMP7 or  
216 VAMP8 were identified as a hallmark of CoV+Asp superinfection, in contrast to CoV infection  
217 (**Fig. 1D**). Similar observations were performed using different terms related to inflammation

7

218 (**Supplementary Data Fig. 1**), hence suggesting a very different inflammation signature  
219 resulting from superinfection. Altogether, our results indicate that the CoV+Asp superinfection  
220 presents a transcriptomic signature that recapitulates the overall signature of a simple CoV  
221 infection, but with both a particularly distinct regulation of the inflammatory response and the  
222 additional regulation of many biological processes related to the physiology of epithelia. Of  
223 note, we observed a relatively similar global pattern of regulation between the nasal and  
224 bronchial HAE models, differing primarily in the magnitude rather than the nature of the  
225 responses to CoV and CoV+Asp superinfection.

226

#### 227 **Transcriptional footprints of SARS-CoV-2 *Aspergillus* superinfection.**

228 In order to explore in more depth, the transcriptomic signature of the superinfection, we then  
229 performed a differential analysis of CoV+Asp signature using that of CoV infection as baseline.  
230 This focused analysis highlighted 248 and 769 DEGs in the CoV+Asp nasal and bronchial  
231 HAE, respectively ( $FC \geq 2$ , adjusted p-value  $< 0.01$ ), which allowed us to spot finer differences  
232 between the two epithelium models. Indeed, the volcano plots in **Fig. 2A** and **B** representing  
233 all DEGs induced by the CoV+Asp versus the CoV condition show interesting differences in  
234 both the scale of deregulation and the nature of the most deregulated genes between the  
235 upper and lower respiratory tract tissues. Interestingly, many genes involved in the regulation  
236 of the inflammatory response such as HOX1, IL1B, IL1A, IL17C are found amongst the most  
237 upregulated genes in the nasal HAE model (**Fig. 2A**). These genes are also upregulated in the  
238 bronchial HAE model (**Supplementary Data File 2**). To provide further functional interpretation  
239 of the superinfection signature, we performed a functional enrichment analysis, using the same  
240 strategy previously described. We only observed a limited number of enriched clusters of  
241 downregulated genes, mostly in bronchial HAE, all of them being related to epithelial  
242 physiology and cell movement (e.g. cytoskeleton-dependent intracellular transport, protein  
243 localization to cilium, cilium movement GO terms, **Fig. 2C**). In line with this observation, our  
244 analysis highlighted several clusters of enriched upregulated genes related to epithelial  
245 physiology (e.g. locomotion, movement of cell or subcellular component GO terms, **Fig. 2C**).  
246 On the other hand, terms related to signaling, host response and immunity were markedly  
247 more upregulated in the bronchial HAE model (**Fig. 2C & Supplementary Data Fig. 2**). In  
248 addition to the gene enrichment profile shared between the nasal and bronchial models, our  
249 study also highlighted several overlapping biological processes such as the cytokine signaling  
250 and IL10 signaling pathways (**Fig. 2C**), which is consistent with the most upregulated DEGs  
251 shown in **Fig. 2A and Supplementary Data File 2**. To better visualize these observations, we  
252 applied a protein-protein interactions analysis using the STRING database to investigate the  
253 DEGs corresponding to several Reactome and GO terms (immune system process, cytokine  
254 signaling in immune system, inflammatory response, interleukin-10 signaling) enriched in the

255 bronchial and nasal superinfection signatures along with their functional interactions (**Fig. 3A**  
256 **and 3B**). The two interactome maps with mostly upregulated DEGs illustrate the strong  
257 functional interconnections among several cytokines/chemokines (blue) and receptors (yellow)  
258 involved in the immune and inflammatory responses occurring in the context of a SARS-CoV-  
259 2 + *Aspergillus* superinfection. Interestingly, our analysis underlined the role of type III IFN  
260 (IFNL1, INFL2 and INFL3) and several cytokine-coding genes such as CXCL2/CXCL8 (**Fig.**  
261 **3A and 3B**) that are upregulated following simple SARS-CoV-2 infection and even more  
262 upregulated in the context of superinfection, arguably illustrating an enhanced specific  
263 response to control infection in both models.

264

265

## 266 **DISCUSSION**

267

268 Invasive pulmonary aspergillosis (IPA), which typically occurs in an immunocompromised host,  
269 represents an important cause of morbidity and mortality worldwide [28]. Superinfections were  
270 extensively documented in the case of influenza infections, with the latter being usually  
271 described to “pave the way” for bacterial superinfections, but several severe influenza cases  
272 have also been reported to develop invasive pulmonary aspergillosis 8/4/2020 4:10:00 PM. An  
273 increasing amount of evidence points towards a relatively high prevalence of superinfections,  
274 including invasive aspergillosis, to be associated with COVID-19 [15–17]. However, the  
275 underlying mechanisms remain to be characterized. In the present study, we sought to better  
276 understand the biological impact of superinfections by determining and comparing the host  
277 transcriptional response to SARS-CoV-2 versus SARS-CoV-2 + *Aspergillus* superinfection.  
278 Collectively, our results show a much stronger host response to superinfection in the bronchial  
279 epithelial model compared to its nasal counterpart. In both models, functional analyses show  
280 that the SARS-CoV-2 + *Aspergillus* superinfection signature reflects important changes in the  
281 expression regulation of genes involved not only in epithelium physiology but also in the  
282 regulation of host immune and inflammatory responses compared to that of the simple SARS-  
283 CoV-2 infection.

284

285 The reconstituted HAE model of infection/superinfection appears as a valuable support for the  
286 study of respiratory viral infections and virus-host interactions in highly biologically relevant  
287 experimental conditions. Previous results by our group using this model, constituted of fully  
288 differentiated and functional human primary cells, have provided meaningful contributions to  
289 the characterization of the kinetics of viral infection as well as on the tissue-level remodeling  
290 of the cellular ultrastructure and local innate immune responses induced by SARS-CoV-2, in  
291 line with our present observation [20]. Whereas no major differences in terms of global

292 superinfection signatures were observed between HAE models of nasal or bronchial origin,  
293 the second part of our study highlighted more subtle differences between the two models in  
294 terms of scale of deregulation (fold change and p-value), as well as in the nature of the most  
295 deregulated genes (**Fig. 2C**). Ziegler and colleagues have recently reported that differences  
296 of infectivity and consecutive host responses between different cell subsets (type II  
297 pneumocytes, nasal goblet secretory cells) are linked to varying ACE2/TMPRSS2 levels,  
298 ACE2 expression being linked to the IFN response [29]. The discrepancies we observed in the  
299 two HAE models could be explained by differences of cell type composition that could be  
300 interesting to further explore using combinations of additional experimental models, including  
301 ACE2/TMPRSS3 expression and single cell RNA-seq approaches.

302

303 Our analysis of the superinfection signature revealed an important role of physiology and  
304 cilium-related genes, which could reflect an additional negative impact of *Aspergillus* infection  
305 on the epithelium integrity (trans-epithelial resistance, **Fig. 1B**) and mucociliary clearance, in  
306 good agreement with previous observations by our group following different types of viral  
307 infection in HAE [18]. In the specific context of SARS-CoV-2 infection, the additional  
308 deleterious effect on epithelium integrity induced by aspergillosis might contribute to the  
309 enhanced disease severity reported in the clinic while arguably increasing the risk of additional  
310 bacterial or fungal superinfections, similarly to what has been described in the case of other  
311 respiratory viral infections [30,31].

312

313 Another major finding of our study relates to the impact of infection/superinfections on  
314 interferon and inflammatory responses, notably when compared to the limited transcriptomic  
315 data available in literature to date. Using primary cells, Blanco-Melo and colleagues recently  
316 reported that SARS-CoV-2 induces limited IFN-I and III responses [6]. Our data are not entirely  
317 consistent with these findings. Whereas we also demonstrate a very limited involvement of the  
318 type I interferon response in the context of simple SARS-CoV-2 infection - in contrast with data  
319 previously obtained with other viruses [18] -, our analysis highlights an important upregulation  
320 of crucial genes involved in the type III interferon response. This response is even more  
321 pronounced in the context of superinfection (**Fig. 3A** and **3B**). Type III interferon (IFN- $\lambda$ ) is  
322 known to play a key role in innate and adaptive mucosal immune responses to infection [32].  
323 Interestingly, IFN- $\lambda$  has been identified as a critical regulator of neutrophil activation to prevent  
324 fungal infection such as invasive pulmonary aspergillosis [33]. Our data suggest a divergence  
325 between type I and type III interferon responses, with enhanced activation of the latter in the  
326 context of fungal superinfection. This characteristic response could be associated with  
327 increased neutrophil activation as an important first line of adaptive defense against these two  
328 pathogens. This hypothesis is further supported by the observed induction of several

329 monocyte-and neutrophil associated chemokines, such as CCL2, CXCL2 and CXCL3 (**Fig. 3A**  
330 and **B**). Interestingly, our results suggest a strong activation of adaptive immune response in  
331 the context of SARS-CoV-2 infection, in line with currently available clinical data from COVID-  
332 19 patients, which generally present high levels of circulating neutrophils [1,34]. These  
333 observations support an important role of neutrophil recruitment in the response to COVID-19,  
334 more particularly in the context of fungal superinfection with an exacerbation of pro-  
335 inflammatory response. In that sense, the upregulation of key genes belonging to the IL-10  
336 pathway observed in our analysis (**Fig. 2C**), previously demonstrated to play a deleterious role  
337 in innate resistance to systemic aspergillosis [35], constitutes an illustration of how such  
338 “enhanced” state of inflammation could contribute to increase severity.

339

340 In conclusion, our transcriptional profiling approach revealed unique features of the SARS-  
341 CoV-2 + *Aspergillus* superinfection signature, characterized on one side by an “enhanced”  
342 version of that induced by SARS-CoV infection, but also by specific changes on respiratory  
343 tissue physiology, a distinct regulation of type I and type III interferons, and an over-induction  
344 of inflammatory response. While we acknowledge that it would be rather bold to make a  
345 statement on the possible severity associated with *Aspergillus* superinfection in a pre-existing  
346 COVID-19 pathological context based solely on our results, our observations suggest that the  
347 immunomodulation induced by SARS-CoV-2 infection could establish a favorable context for  
348 the development of severe forms of aspergillosis. This could constitute an important aspect to  
349 be considered for the immunological follow-up of COVID-19 patients with aspergillosis. On top  
350 of that, the characteristic infection signatures described in this study provide valuable insight  
351 in the perspective of possible future treatments targeting the COVID-19 inflammatory response,  
352 which could result in counter-productive effects for the management of aspergillosis.

353

#### 354 **Author contribution statement**

355 CNdL, AP, JF, LS, BP, JD, TJ, AT, VD, PB, BL, MRC and OT carried out the experiments and  
356 analysis of the results. CNdL, AP, BL, OT and MRC participated to conception and  
357 coordination of the study. CNdL, AP, OT and MRC designed the study and wrote the  
358 manuscript.

359

#### 360 **Acknowledgments**

361 The authors would like to thank Epithelix (Switzerland) and IGENSEQ sequencing core facility  
362 (Institut du Cerveau ICM, Paris) for their help. This study was funded by CNRS, and Mérieux  
363 research grants. The sponsors had no role in study design, collection, analysis and  
364 interpretation of data, manuscript writing, or in the decision to submit the article for publication.  
365 The authors declare that they have no conflict of interest.

366 REFERENCES

367

368 1. Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99  
369 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study.  
370 *The Lancet. Elsevier*; 2020; 395(10223):507–513.

371 2. Guan W, Ni Z, Hu Y, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in  
372 China. *N Engl J Med. Massachusetts Medical Society*; 2020; 382(18):1708–1720.

373 3. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel  
374 coronavirus in Wuhan, China. *Lancet Lond Engl*. 2020; 395(10223):497–506.

375 4. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ. COVID-19:  
376 consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *The Lancet*.  
377 *Elsevier*; 2020; 395(10229):1033–1034.

378 5. Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia  
379 in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020; 382(8):727–733.

380 6. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu W-C, et al. Imbalanced Host Response to  
381 SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell [Internet]*. 2020 [cited 2020 May  
382 19]; Available from:  
383 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009286742030489X>

384 7. Gordon DE, Jang GM, Bouhaddou M, et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map  
385 reveals targets for drug repurposing. *Nature. Nature Publishing Group*; 2020; :1–  
386 13.

387 8. Messina F, Giombini E, Agrati C, et al. COVID-19: Viral-host interactome analyzed  
388 by network based-approach model to study pathogenesis of SARS-CoV-2 infection.  
389 *bioRxiv. Cold Spring Harbor Laboratory*; 2020; :2020.05.07.082487.

390 9. Xiong Y, Liu Y, Cao L, et al. Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar  
391 lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. *Emerg*  
392 *Microbes Infect*. 2020; 9(1):761–770.

393 10. Bosch AATM, Biesbroek G, Trzcinski K, Sanders EAM, Bogaert D. Viral and  
394 Bacterial Interactions in the Upper Respiratory Tract. *PLOS Pathog*. 2013;  
395 9(1):e1003057.

396 11. McCullers JA. The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung.  
397 *Nat Rev Microbiol*. 2014; 12(4):252–262.

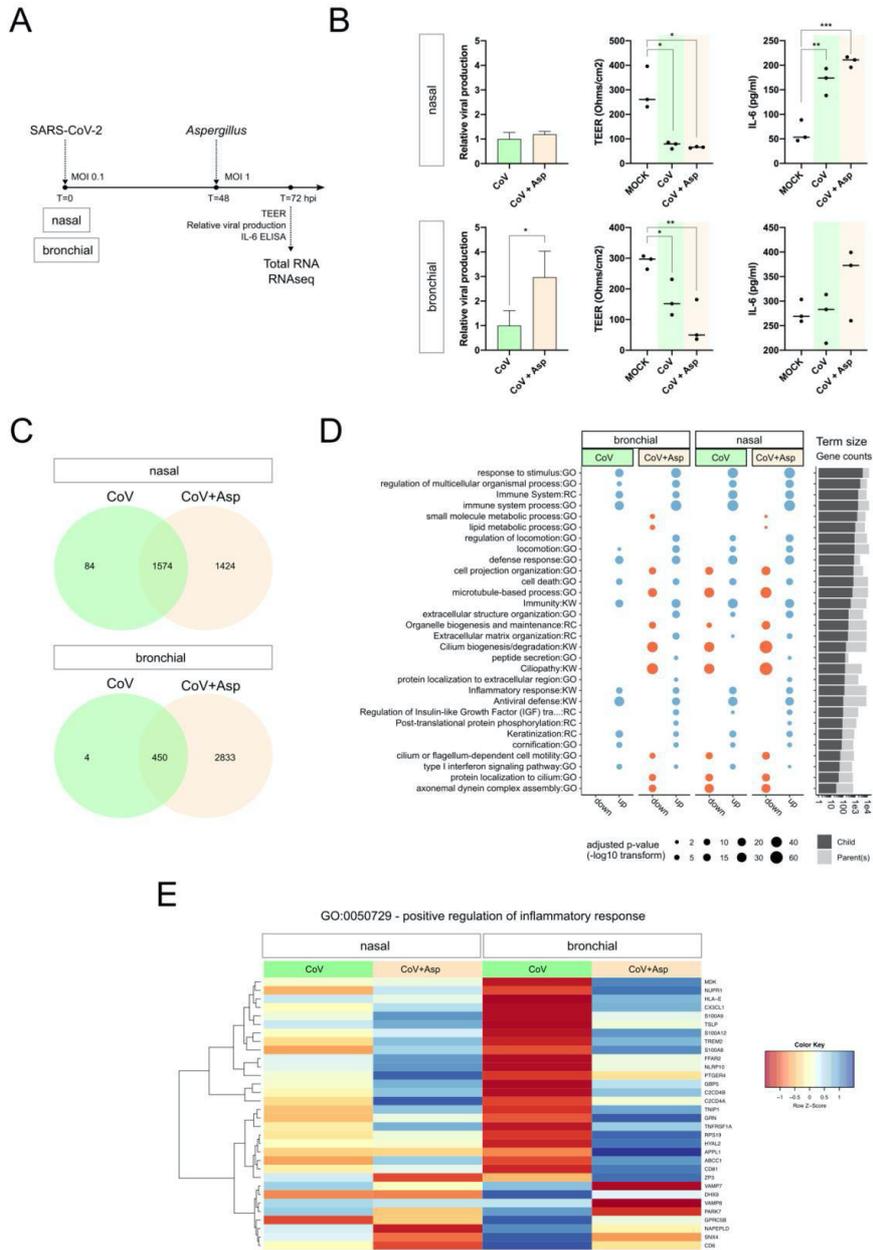
398 12. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant role of bacterial pneumonia  
399 as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza  
400 preparedness. *J Infect Dis*. 2008; 198(7):962–970.

401 13. Paget C, Trottein F. Mechanisms of Bacterial Superinfection Post-influenza: A Role  
402 for Unconventional T Cells. *Front Immunol [Internet]*. 2019 [cited 2020 May 19]; 10.  
403 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6405625/>

404 14. Bengoechea JA, Bamford CG. SARS-CoV-2, bacterial co-infections, and AMR: the  
405 deadly trio in COVID-19? *EMBO Mol Med*. 2020; 12(7):e12560.

- 406 15. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult  
407 inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*  
408 *Lond Engl.* 2020; 395(10229):1054–1062.
- 409 16. Lescure F-X, Bouadma L, Nguyen D, et al. Clinical and virological data of the first  
410 cases of COVID-19 in Europe: a case series. *Lancet Infect Dis.* 2020; .
- 411 17. Alanio A, Delliere S, Fodil S, Bretagne S, Megarbane B. High prevalence of putative  
412 invasive pulmonary aspergillosis in critically ill COVID-19 patients. *medRxiv. Cold*  
413 *Spring Harbor Laboratory Press;* 2020; :2020.04.21.20064915.
- 414 18. Nicolas de Lamballerie C, Pizzorno A, Dubois J, et al. Characterization of cellular  
415 transcriptomic signatures induced by different respiratory viruses in human  
416 reconstituted airway epithelia. *Sci Rep.* 2019; 9(1):11493.
- 417 19. Pizzorno A, Terrier O, Nicolas de Lamballerie C, et al. Repurposing of Drugs as  
418 Novel Influenza Inhibitors From Clinical Gene Expression Infection Signatures.  
419 *Front Immunol [Internet].* 2019 [cited 2019 Feb 10]; 10. Available from:  
420 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00060/full>
- 421 20. Pizzorno A, Padey B, Julien T, et al. Characterization and treatment of SARS-CoV-  
422 2 in nasal and bronchial human airway epithelia. *bioRxiv. Cold Spring Harbor*  
423 *Laboratory;* 2020; :2020.03.31.017889.
- 424 21. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing  
425 reads. *EMBnetjournal.* 2011; 17(1):10–12.
- 426 22. Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L. Near-optimal probabilistic RNA-seq  
427 quantification. *Nat Biotechnol.* 2016; 34(5):525–527.
- 428 23. Maglott D, Ostell J, Pruitt KD, Tatusova T. Entrez Gene: gene-centered information  
429 at NCBI *Nucleic Acids Res.* 2005; 33(Database Issue):D54–D58.
- 430 24. Sonesson C, Love MI, Robinson MD. Differential analyses for RNA-seq: transcript-  
431 level estimates improve gene-level inferences. *F1000Research.* 2015; 4:1521.
- 432 25. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion  
433 for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014; 15(12):550.
- 434 26. Breuza L, Poux S, Estreicher A, et al. The UniProtKB guide to the human proteome.  
435 *Database J Biol Databases Curation.* 2016; 2016.
- 436 27. Grossmann S, Bauer S, Robinson PN, Vingron M. Improved detection of  
437 overrepresentation of Gene-Ontology annotations with parent child analysis.  
438 *Bioinforma Oxf Engl.* 2007; 23(22):3024–3031.
- 439 28. Clancy CJ, Nguyen MH. COVID-19, superinfections and antimicrobial development:  
440 What can we expect? *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2020; .
- 441 29. Ziegler CGK, Allon SJ, Nyquist SK, et al. SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an  
442 Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in  
443 Specific Cell Subsets across Tissues. *Cell [Internet].* 2020 [cited 2020 May 19]; .  
444 Available from:  
445 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420305006>

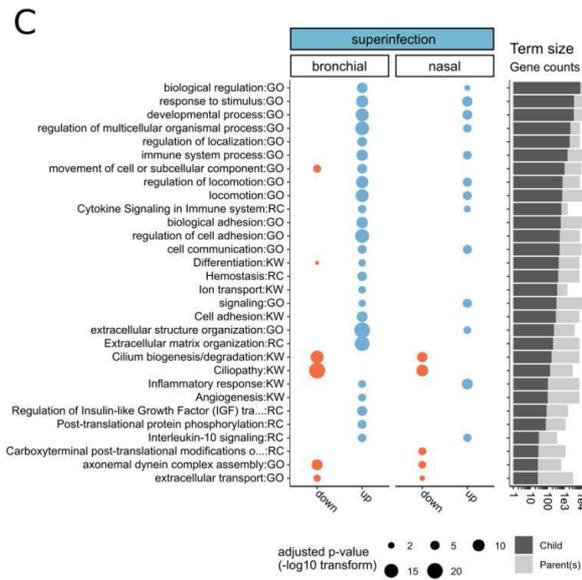
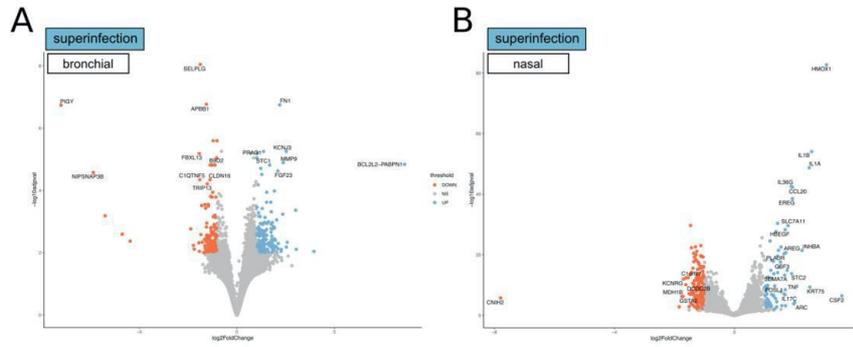
- 446 30. Smith C, Kulkarni H, Robert H, et al. Influenza virus infection of human ciliated  
447 respiratory epithelial cells in culture. *Eur Respir J*. 2013; 42(Suppl 57):P4406.
- 448 31. Wu N-H, Yang W, Beineke A, et al. The differentiated airway epithelium infected by  
449 influenza viruses maintains the barrier function despite a dramatic loss of ciliated  
450 cells. *Sci Rep*. 2016; 6:39668.
- 451 32. Ye L, Schnepf D, Staeheli P. Interferon- $\lambda$  orchestrates innate and adaptive mucosal  
452 immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2019; 19(10):614–625.
- 453 33. Espinosa V, Dutta O, McElrath C, et al. Type III interferon is a critical regulator of  
454 innate antifungal immunity. *Sci Immunol*. 2017; 2(16).
- 455 34. Qin C, Zhou L, Hu Z, et al. Dysregulation of immune response in patients with  
456 COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2020; .
- 457 35. Clemons KV, Grunig G, Sobel RA, Mirels LF, Rennick DM, Stevens DA. Role of IL-  
458 10 in invasive aspergillosis: increased resistance of IL-10 gene knockout mice to  
459 lethal systemic aspergillosis. *Clin Exp Immunol*. 2000; 122(2):186–191.
- 460



462  
463

464 **Figure 1**

465 (A) Overview of experimental strategy (B) At 72h post-infection, for both nasal and bronchial  
466 HAE model, the relative viral production (intracellular) was determined using RTqPCR, and  
467 the impact of infection on epithelium integrity was monitored by measure of the transepithelial  
468 resistance (TEER Ohms/cm<sup>2</sup>). IL-6 was measured at the apical using a specific ELISA assay.  
469 (C) Nasal and bronchial gene signature overlap for SARS-CoV2 or SARS-CoV-2+*Aspergillus*  
470 infected conditions vs. Mock. We contrasted the significantly differentially expressed gene lists  
471 corresponding to CoV vs. Mock and CoV+Asp vs. Mock in nasal and bronchial HAE. Only  
472 genes above threshold ( $\log_2(\text{FC}) > 1$  or  $< -1$  compared to the mock-infected condition and  
473 Benjamini-Hochberg adjusted p value  $< 0.01$ ) were considered. (D) Overview of functional  
474 enrichment results for SARS-CoV2 or SARS-CoV-2+*Aspergillus* infected conditions vs. Mock.  
475 Considering (CoV vs. Mock) and (CoV+Asp vs. Mock) for both bronchial and nasal HAE,  
476 significantly up- or down- regulated gene lists (x-axis) were tested for significant enrichment  
477 using the parent-child strategy (see methods). If below the threshold, the adjusted p-values  
478 corresponding to different terms (y-axis) are represented by point sizes (see legend). After  
479 clustering terms based on gene occurrences (binary distance & Ward algorithm) in 15  
480 metagroups, only the top 2 (lowest adjusted p-value) were represented here. For the complete  
481 list of significant terms, see **Supplementary Data Fig. 1**. The bar plot on the right represents  
482 the sizes of enriched terms (called child) in comparison to the size of their parents (see  
483 methods for definitions). (E) Positive regulation of the inflammatory response in nasal and  
484 bronchial HAE. We extracted the list of proteins associated with the term GO:0050729 and  
485 visualized the scaled log transformed expression results in a heatmap. Each row represents a  
486 gene and each column is an experimental condition. The color key indicates the scaled  
487 expression levels vs. Mock (red, low; blue, high).



489 **Figure 2**

490 (A) & (B) Volcano plots of differentially expressed genes from (A) nasal and (B) bronchial tissue  
491 superinfected by *Aspergillus*. We considered significantly modulated genes (CoV+Asp vs. CoV)  
492 for both bronchial and nasal HAE ( $\log_2(\text{FC}) > 1$  or  $< -1$  compared to the CoV condition and  
493 Benjamini-Hochberg adjusted p-value  $< 0.01$ ). The color scale represents the log-transformed  
494 fold change values and ranges from low (red) to high (blue). (C) Overview of functional  
495 enrichment results of SARS-CoV-2+*Aspergillus* superinfection vs. SARS-CoV-2 infection.  
496 Considering CoV+Asp vs. CoV for both bronchial and nasal epithelium type, significantly up-  
497 or down- regulated gene lists (x-axis) were tested for significant enrichment using the parent-  
498 child strategy (see methods). If below the threshold (0.05), the adjusted p-values  
499 corresponding to different terms (y-axis) are represented by point sizes (see legend). After  
500 clustering terms based on gene occurrences (binary distance & Ward algorithm) in 15  
501 metagroups, the 2 terms with the lowest p-value are represented here. For the complete list of  
502 significant terms, see **Supplementary Data File 2**. The bar plot on the right represents the  
503 sizes of enriched terms (called child) in comparison to the size of their parents (see methods  
504 for definitions).



507 **Figure 3**

508 (A) & (B) Network visualization of immunity-associated proteins in superinfected HAE. We  
509 selected the 76 and 191 genes significantly differentially expressed (vs. CoV) in our study  
510 (respectively in nasal (A) and bronchial (B) HAE) associated with the Reactome "Interleukin-  
511 10 signaling" (R-HSA-6783783) and "cytokine signaling in immune system" pathways (R-HAS-  
512 1280215), the Uniprot keyword "inflammatory response" (KW-0395) and the Gene Ontology  
513 term "immune system process" (GO:0002376). The circles indicate genes modulated in our  
514 study in the superinfection context. The predicted associations are materialized by the dark  
515 lines. Cytokines/chemokines are highlighted in blue and receptors in yellow.

516 **Supplementary Data**

517

518 **Supplementary Figure 1**

519 Complete view of functional enrichment results for SARS-CoV2 or SARS-CoV-2+*Aspergillus*  
520 infected conditions vs. Mock. Considering CoV vs. Mock and CoV+Asp vs. Mock for both  
521 bronchial and nasal epithelium type, significantly up- or down- regulated gene lists (x-axis)  
522 were tested for significant enrichment using the parent-child strategy (see methods). If below  
523 the threshold (0.05), the adjusted p-values corresponding to different terms (y-axis) are  
524 represented by point sizes (see legend). Terms were clustered based on gene occurrences  
525 (binary distance & Ward algorithm) in 15 metagroups. The bar plot on the right represents the  
526 sizes of enriched terms (called child) in comparison to the size of their parents (see methods  
527 for definitions).

528

529 **Supplementary Figure 2**

530 Complete view of functional enrichment results of SARS-CoV-2+*Aspergillus* superinfection vs.  
531 SARS-CoV2 infection. Considering CoV+Asp vs. CoV for both bronchial and nasal epithelium  
532 type, significantly up- or down- regulated gene lists (x-axis) were tested for significant  
533 enrichment using the parent-child strategy (see methods). If below the threshold (0.05), the  
534 adjusted p-values corresponding to different terms (y-axis) are represented by point sizes (see  
535 legend). Terms were clustered based on gene occurrences (binary distance & Ward algorithm)  
536 in 10 metagroups. The bar plot on the right represents the sizes of enriched terms (called child)  
537 in comparison to the size of their parents (see methods for definitions).

538

539 **Supplementary Data File 1.** Complete list of deregulated genes in SARS-CoV2 or SARS-  
540 CoV-2+*Aspergillus* infected conditions vs. Mock

541

542 **Supplementary Data File 2.** Complete list of deregulated genes in SARS-CoV-2+*Aspergillus*  
543 superinfection vs. SARS-CoV2 infection.

| Database                | Information type               | URLs  |
|-------------------------|--------------------------------|---|
| <b>Reactome</b>         | Details (name,Id)              | <a href="https://reactome.org/download/current/ReactomePathways.txt">https://reactome.org/download/current/ReactomePathways.txt</a>   |
| <b>Reactome</b>         | gene-term associations         | <a href="https://www.uniprot.org/uniprot/?sort=score&amp;desc=&amp;compress=no&amp;query=organism:%22Homo%20sapiens%20[9606]%22&amp;fil=&amp;format=tab&amp;force=yes&amp;columns=id,entry%20name,length,genes(PREFERRED),reviewed,database(Reactome)">https://www.uniprot.org/uniprot/?sort=score&amp;desc=&amp;compress=no&amp;query=organism:%22Homo%20sapiens%20[9606]%22&amp;fil=&amp;format=tab&amp;force=yes&amp;columns=id,entry%20name,length,genes(PREFERRED),reviewed,database(Reactome)</a>   |
| <b>Reactome</b>         | Topology                       | <a href="https://reactome.org/download/current/ReactomePathwaysRelation.txt">https://reactome.org/download/current/ReactomePathwaysRelation.txt</a>   |
| <b>Uniprot Keywords</b> | Topology                       | <a href="http://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/interpro/ParentChildTreeFile.txt">http://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/interpro/ParentChildTreeFile.txt</a>   |
| <b>Uniprot Keywords</b> | Details (name,Id)              | <a href="http://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/interpro/entry.list">http://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/interpro/entry.list</a>   |
| <b>Uniprot Keywords</b> | gene-term associations         | <a href="https://www.uniprot.org/uniprot/?sort=score&amp;desc=&amp;compress=yes&amp;query=organism:%22Homo%20sapiens%20[9606]%22&amp;fil=&amp;format=tab&amp;force=yes&amp;columns=id,entry%20name,length,database(InterPro),genes(PREFERRED),reviewed">https://www.uniprot.org/uniprot/?sort=score&amp;desc=&amp;compress=yes&amp;query=organism:%22Homo%20sapiens%20[9606]%22&amp;fil=&amp;format=tab&amp;force=yes&amp;columns=id,entry%20name,length,database(InterPro),genes(PREFERRED),reviewed</a> |
| <b>Gene Ontology</b>    | Topology and Details (name,Id) | <a href="https://www.uniprot.org/keywords/?sort=&amp;desc=&amp;compress=yes&amp;query=&amp;fil=&amp;format=obo&amp;force=yes' &gt; keywords/uniprot_keywords.obo.gz">https://www.uniprot.org/keywords/?sort=&amp;desc=&amp;compress=yes&amp;query=&amp;fil=&amp;format=obo&amp;force=yes' &gt; keywords/uniprot_keywords.obo.gz</a>   |
| <b>Gene Ontology</b>    | gene-term associations         | <a href="https://www.uniprot.org/uniprot/?query=organism%3A%22Homo%20sapiens%20%5B9606%5D%22&amp;sort=score&amp;columns=id%2Centry%20name%2Ckeywords%2Cgenes(PREFERRED)%2Cdatabase(GeneID)%2Creviewed&amp;format=tab">https://www.uniprot.org/uniprot/?query=organism%3A%22Homo%20sapiens%20%5B9606%5D%22&amp;sort=score&amp;columns=id%2Centry%20name%2Ckeywords%2Cgenes(PREFERRED)%2Cdatabase(GeneID)%2Creviewed&amp;format=tab</a>   |

545

546 **Supplementary Data Table 1**

547 List of URLs parsed to build the databases used for enrichment analysis. Three types  
548 of information were used (i) details about terms meaning term ID, complete name and  
549 contingent category (e.g Biological process or Molecular function for Gene Ontology);  
550 (ii) gene-term associations; (iii) topology and especially child to parent's relations to  
551 apply the parent-child method.

| Epithelium model | Sample  | Percentage of pseudo-aligned fragments | Millions of pseudo-aligned fragments |
|------------------|---------|--|--------------------------------------|
| <b>Bronchial</b> | CoV+Asp | 22,30%                                 | 9,6                                  |
|                  | CoV+Asp | 25,60%                                 | 5,7                                  |
|                  | CoV+Asp | 25,20%                                 | 7,1                                  |
|                  | CoV     | 61,50%                                 | 13,8                                 |
|                  | CoV     | 66,30%                                 | 15,9                                 |
|                  | CoV     | 46,00%                                 | 11,5                                 |
|                  | Mock    | 80,30%                                 | 19,1                                 |
|                  | Mock    | 78,60%                                 | 20,9                                 |
|                  | Mock    | 79,20%                                 | 18,5                                 |
| <b>Nasal</b>     | CoV+Asp | 45,40%                                 | 10,8                                 |
|                  | CoV+Asp | 47,00%                                 | 15,1                                 |
|                  | CoV+Asp | 40,90%                                 | 9,5                                  |
|                  | CoV     | 53,00%                                 | 15,2                                 |
|                  | CoV     | 53,00%                                 | 14,4                                 |
|                  | CoV     | 57,10%                                 | 15,7                                 |
|                  | Mock    | 82,20%                                 | 21,7                                 |
|                  | Mock    | 80,70%                                 | 22,1                                 |
|                  | Mock    | 80,40%                                 | 19,2                                 |

552

553

554 **Supplementary Data Table 2**

555 Statistics of RNA-Seq fragment pseudo-alignment to the human transcriptome.



## Bibliographie

1. Conly, J. M., Pessoa Silva, C. L., Malik, M., Eremin, S. & Seto, W. H. Infection prevention and control measures for acute respiratory infections in healthcare settings: an update. *East. Mediterr. Heal. J.* **19**, S39–S47 (2013).
2. Meissner, H. C. Viral Bronchiolitis in Children. *N. Engl. J. Med.* **374**, 62–72 (2016).
3. Nair, H. *et al.* Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* **378**, 1917–1930 (2011).
4. McAllister, D. A. *et al.* Global, regional, and national estimates of pneumonia morbidity and mortality in children younger than 5 years between 2000 and 2015: a systematic analysis. *Lancet Glob. Heal.* **7**, e47–e57 (2019).
5. *La santé respiratoire en Europe Faits et chiffres.* (2013).
6. Falsey, A. R. Respiratory viral infections. in *Genomic and Precision Medicine: Infectious and Inflammatory Disease* 117–139 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-801496-7.00009-5
7. Zaki, A. M., van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D. M. E. & Fouchier, R. A. M. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1814–1820 (2012).
8. Drosten, C. *et al.* Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1967–1976 (2003).
9. Wuhan seafood market pneumonia virus isolate Wuhan-Hu-1, complete geno - Nucleotide - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MN908947>. (Accessed: 17th January 2020)
10. Novel Coronavirus 2019 | CDC. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/novel-coronavirus-2019.html>. (Accessed: 16th January 2020)
11. Zhou, F. *et al.* Articles Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* **395**, 1054–1062 (2020).
12. Ratnamohan, V. M. *et al.* Pandemic clinical case definitions are non-specific: multiple respiratory viruses circulating in the early phases of the 2009 influenza pandemic in New South Wales, Australia. *Viol. J.* **11**, 113 (2014).
13. Martin, E. T., Kuypers, J., Wald, A. & Englund, J. A. Multiple versus single virus respiratory infections: viral load and clinical disease severity in hospitalized children. *Influenza Other Respi. Viruses* **6**, 71–7 (2012).
14. Goka, E. A., Vallery, P. J., Mutton, K. J. & Klapper, P. E. Single, dual and multiple respiratory virus infections and risk of hospitalization and mortality. *Epidemiol. Infect.* **143**, 37–47 (2015).
15. Zhang, G. *et al.* High incidence of multiple viral infections identified in upper respiratory tract infected children under three years of age in Shanghai, China. *PLoS One* **7**, e44568 (2012).

16. Roquilly, A. & Trottein, F. La grippe et les surinfections bactériennes. *médecine/sciences* **33**, 528–533 (2017).
17. Brundage, J. F. Interactions between influenza and bacterial respiratory pathogens: implications for pandemic preparedness. *Lancet Infect. Dis.* **6**, 303–312 (2006).
18. McCullers, J. A. The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 252–262 (2014).
19. Metzger, D. W. & Sun, K. Immune dysfunction and bacterial coinfections following influenza. *J. Immunol.* **191**, 2047–52 (2013).
20. Paddock, C. D. *et al.* Myocardial injury and bacterial pneumonia contribute to the pathogenesis of fatal influenza B virus infection. *J. Infect. Dis.* **205**, 895–905 (2012).
21. Cillóniz, C. *et al.* Bacterial co-infection with H1N1 infection in patients admitted with community acquired pneumonia. *J. Infect.* **65**, 223–230 (2012).
22. Blyth, C. C. *et al.* The impact of bacterial and viral co-infection in severe influenza. *Influenza Other Respi. Viruses* **7**, 168–176 (2013).
23. Masiá, M. *et al.* Predictors of pneumococcal co-infection for patients with pandemic (H1N1) 2009. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 1475–1478 (2011).
24. Hodinka, R. L. Respiratory RNA Viruses. in *Diagnostic Microbiology of the Immunocompromised Host, Second Edition* 233–271 (American Society of Microbiology, 2016). doi:10.1128/microbiolspec.DMIH2-0028-2016
25. Burrell, C. J. *et al.* Orthomyxoviruses. *Fenner White's Med. Virol.* 355–365 (2017). doi:10.1016/B978-0-12-375156-0.00025-4
26. Krammer, F. *et al.* Influenza. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **4**, 3 (2018).
27. Yoon, S. W., Webby, R. J. & Webster, R. G. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **385**, 359–375 (2014).
28. Fouchier, R. A. M. *et al.* Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J. Virol.* **79**, 2814–22 (2005).
29. Tong, S. *et al.* New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. *PLoS Pathog.* **9**, e1003657 (2013).
30. Kreijtz, J. H. C. M., Fouchier, R. A. M. & Rimmelzwaan, G. F. Immune responses to influenza virus infection. *Virus Res.* **162**, 19–30 (2011).
31. Ma, W., García-Sastre, A. & Schwemmler, M. Expected and Unexpected Features of the Newly Discovered Bat Influenza A-like Viruses. *PLoS Pathog.* **11**, e1004819 (2015).
32. Kosik, I. & Yewdell, J. W. Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase: Yin-Yang Proteins Coevolving to Thwart Immunity. *Viruses* **11**, (2019).
33. World Health Organization. Influenza Nomenclature. *Wkly Epidemiol. Rec.* **38**, (1980).
34. Hay, A. J., Gregory, V., Douglas, A. R. & Yi, P. L. The evolution of human influenza viruses. in

- Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **356**, 1861–1870 (Royal Society, 2001).
35. Koutsakos, M., Nguyen, T. H., Barclay, W. S. & Kedzierska, K. Knowns and unknowns of influenza B viruses. *Future Microbiology* **11**, 119–135 (2016).
  36. Belshe, R. B. The need for quadrivalent vaccine against seasonal influenza. *Vaccine* **28**, (2010).
  37. Su, S., Fu, X., Li, G., Kerlin, F. & Veit, M. Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. *Virulence* **8**, 1580–1591 (2017).
  38. Hause, B. M. *et al.* Characterization of a Novel Influenza Virus in Cattle and Swine: Proposal for a New Genus in the Orthomyxoviridae Family. *MBio* **5**, e00031-14 (2014).
  39. Ferguson, L. *et al.* Influenza D virus infection in Mississippi beef cattle. *Virology* **486**, 28–34 (2015).
  40. Hause, B. M. *et al.* Isolation of a novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses. *PLoS Pathog.* **9**, e1003176 (2013).
  41. Taylor, R. M. Studies on survival of influenza virus between epidemics and antigenic. *Am. J. Public Health Nations. Health* **39**, 171–178 (1949).
  42. Killingley, B. & Nguyen-Van-Tam, J. Routes of influenza transmission. *Influenza Other Respi. Viruses* **7**, 42–51 (2013).
  43. Steel, J., Palese, P. & Lowen, A. C. Transmission of a 2009 Pandemic Influenza Virus Shows a Sensitivity to Temperature and Humidity Similar to That of an H3N2 Seasonal Strain. *J. Virol.* **85**, 1400–1402 (2011).
  44. Lowen, A. C., Steel, J., Mubareka, S. & Palese, P. High Temperature (30 C) Blocks Aerosol but Not Contact Transmission of Influenza Virus. *J. Virol.* **82**, 5650–5652 (2008).
  45. Lowen, A. C., Mubareka, S., Steel, J. & Palese, P. Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. *PLoS Pathog.* **3**, 1470–1476 (2007).
  46. Brownstein, J. S., Wolfe, C. J. & Mandl, K. D. Empirical evidence for the effect of airline travel on inter-regional influenza spread in the United States. *PLoS Med.* **3**, 1826–1835 (2006).
  47. Eccles, R. An explanation for the seasonality of acute upper respiratory tract viral infections. *Acta Otolaryngol.* **122**, 183–191 (2002).
  48. Hammond, G. W., Raddatz, R. L. & Gelskey, D. E. Impact of atmospheric dispersion and transport of viral aerosols on the epidemiology of influenza. *Rev. Infect. Dis.* **11**, 494–497 (1989).
  49. Tsang, T. K., Lau, L. L. H., Cauchemez, S. & Cowling, B. J. Household Transmission of Influenza Virus. *Trends Microbiol.* **24**, 123–133 (2016).
  50. Biere, B., Bauer, B. & Schweiger, B. Differentiation of influenza b virus lineages yamagata and victoria by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 1425–1427 (2010).
  51. WHO | FluNet. *WHO* (2017).

52. Schulman, J. L. & Kilbourne, E. D. Experimental Transmission of Influenza Virus Infection in Mice. *J. Exp. Med.* **118**, 267–275 (1963).
53. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, D. B. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. (Elsevier, 2015).
54. Nicholson, K. G. Clinical features of influenza. *Semin. Respir. Infect.* **7**, 26–37 (1992).
55. Palese, P. & Shaw, M. *Fields Virology* 5th edition. (2006).
56. Josset, L., Frobert, E. & Rosa-Calatrava, M. Influenza A replication and host nuclear compartments: Many changes and many questions. *J. Clin. Virol.* **43**, 381–390 (2008).
57. Fields, B. N., Knipe, D. M. (David M. & Howley, P. M. *Fields virology*. (Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2007).
58. Bouvier, N. M. & Palese, P. The biology of influenza viruses. *Vaccine* **26**, D49–D53 (2008).
59. Ferhadian, D. *et al.* Structural and Functional Motifs in Influenza Virus RNAs. *Front. Microbiol.* **9**, 559 (2018).
60. Fournier, E. *et al.* A supramolecular assembly formed by influenza A virus genomic RNA segments. *Nucleic Acids Res* 2197–2209 (2012).
61. Belser, J. A. & Terrence, M. The 1918 flu, 100 years later. *Science* **359**, 255 (2018).
62. Taubenberger, J. K. & Morens, D. M. 1918 Influenza: The mother of all pandemics. *Emerging Infectious Diseases* **12**, 15–22 (2006).
63. Viboud, C., Grais, R. F., Lafont, B. A. P., Miller, M. A. & Simonsen, L. Multinational Impact of the 1968 Hong Kong Influenza Pandemic: Evidence for a Smoldering Pandemic. *J. Infect. Dis.* **192**, 233–248 (2005).
64. Shrestha, S. S. *et al.* Estimating the Burden of 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) in the United States (April 2009–April 2010). *Clin. Infect. Dis.* **52**, S75–S82 (2011).
65. Tumpey, T. M. *et al.* Characterization of the Reconstructed 1918 Spanish Influenza Pandemic Virus. *Science (80-. )*. **310**, 77–80 (2005).
66. Pappas, C. *et al.* Single gene reassortants identify a critical role for PB1, HA, and NA in the high virulence of the 1918 pandemic influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 3064–3069 (2008).
67. Taubenberger, J. K. & Morens, D. M. The Pathology of Influenza Virus Infections. *Annu Rev Pathol.* (2008).
68. Glezen, W. P., Taber, L. H., Frank, A. L. & Kasel, J. A. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am. J. Dis. Child.* **140**, 543–6 (1986).
69. Kilbourne, E. D. Influenza pandemics of the 20th century. *Emerging Infectious Diseases* **12**, 9–14 (2006).
70. Kim, H., Webster, R. G. & Webby, R. J. Influenza Virus: Dealing with a Drifting and Shifting Pathogen. *Viral Immunol.* **31**, 174–183 (2018).
71. Kilbourne, E. D. What are the prospects for a universal influenza vaccine? *Nature Medicine* **5**,

- 1119–1120 (1999).
72. Boni, M. F. Vaccination and antigenic drift in influenza. *Vaccine* **26**, (2008).
  73. Gamblin, S. J. & Skehel, J. J. Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase Membrane Glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **285**, 28403 (2010).
  74. Sieczkarski, S. B. & Whittaker, G. R. Viral entry. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **285**, 1–23 (2005).
  75. Stegmann, T. Membrane fusion mechanisms: the influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion. *Traffic* **1**, 598–604 (2000).
  76. Harrison, S. C. Viral membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 690–8 (2008).
  77. Martin, K. & Helenius, A. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *J. Virol.* **65**, 232–44 (1991).
  78. Boulo, S., Akarsu, H., Ruigrok, R. W. H. & Baudin, F. Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Research* **124**, 12–21 (2007).
  79. Cros, J. F. & Palese, P. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Res.* **95**, 3–12 (2003).
  80. Dou, D., Revol, R., Östbye, H., Wang, H. & Daniels, R. Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. *Front. Immunol.* **9**, 1581 (2018).
  81. Samji, T. Influenza A: understanding the viral life cycle. *Yale J. Biol. Med.* **82**, 153–9 (2009).
  82. Terrier, O. *et al.* Nucleolin interacts with influenza A nucleoprotein and contributes to viral ribonucleoprotein complexes nuclear trafficking and efficient influenza viral replication. *Sci. Rep.* **6**, 29006 (2016).
  83. Ayllon, J. & García-Sastre, A. The NS1 Protein: A Multitasking Virulence Factor. in 73–107 (Springer, Cham, 2014). doi:10.1007/82\_2014\_400
  84. Dubois, J., Terrier, O. & Rosa-Calatrava, M. Influenza viruses and mRNA splicing: doing more with less. *MBio* **5**, e00070-14 (2014).
  85. Fujii, Y., Goto, H., Watanabe, T., Yoshida, T. & Kawaoka, Y. Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 2002–2007 (2003).
  86. Nayak, D. P., Balogun, R. A., Yamada, H., Zhou, Z. H. & Barman, S. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Res.* **143**, 147–61 (2009).
  87. Monto, A. S. Epidemiology of viral respiratory infections. *Am. J. Med.* **112**, 4–12 (2002).
  88. Ralston, S. L. *et al.* Clinical Practice Guideline: The Diagnosis, Management, and Prevention of Bronchiolitis. *Pediatrics* **134**, e1474–e1502 (2014).
  89. Rima, B. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Pneumoviridae. *J. Gen. Virol.* **98**, 2912–2913 (2017).
  90. van den Hoogen, B. G. *et al.* A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat. Med.* **7**, 719–724 (2001).

91. Afonso, C. L. *et al.* Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Arch. Virol.* **161**, 2351–2360 (2016).
92. Taleb, S. A., Al Thani, A. A., Al Ansari, K. & Yassine, H. M. Human respiratory syncytial virus: pathogenesis, immune responses, and current vaccine approaches. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **37**, 1817–1827 (2018).
93. Melero, J. A., Mas, V. & McLellan, J. S. Structural, antigenic and immunogenic features of respiratory syncytial virus glycoproteins relevant for vaccine development. *Vaccine* **35**, 461–468 (2017).
94. Collins, P. L. & Graham, B. S. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *J. Virol.* **82**, 2040–55 (2008).
95. Thongpan, I. *et al.* Respiratory syncytial virus genotypes NA1, ON1, and BA9 are prevalent in Thailand, 2012-2015. *PeerJ* **2017**, (2017).
96. Rodriguez-Fernandez, R. *et al.* Respiratory syncytial virus genotypes, host immune profiles, and disease severity in young children hospitalized with bronchiolitis. *J. Infect. Dis.* **217**, 24–34 (2018).
97. Arbiza, J., Delfraro, A. & Frabasile, S. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus in Uruguay: 1985-2001 - A review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **100**, 221–230 (2005).
98. Peret, T. C., Golub, J. A., Anderson, L. J., Hall, C. B. & Schnabel, K. C. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *J. Gen. Virol.* **79**, 2221–2229 (1998).
99. Rodriguez-Fernandez, R. *et al.* Respiratory Syncytial Virus Genotypes, Host Immune Profiles, and Disease Severity in Young Children Hospitalized With Bronchiolitis. *J. Infect. Dis.* **217**, 24–34 (2017).
100. Katzov-Eckert, H. *et al.* Phylodynamics and Dispersal of HRSV Entails Its Permanence in the General Population in between Yearly Outbreaks in Children. *PLoS One* **7**, (2012).
101. Frabasile, S. *et al.* Antigenic and genetic variability of human respiratory syncytial viruses (group A) isolated in Uruguay and Argentina: 1993-2001. *J. Med. Virol.* **71**, 305–312 (2003).
102. Matheson, J. W. *et al.* Distinct patterns of evolution between respiratory syncytial virus subgroups A and B From New Zealand isolates collected over thirty-seven years. *J. Med. Virol.* **78**, 1354–1364 (2006).
103. Reiche, J. & Schweiger, B. Genetic variability of group A human respiratory syncytial virus strains circulating in Germany from 1998 to 2007. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 1800–1810 (2009).
104. Huck, B. *et al.* Novel human metapneumovirus sublineage. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 147–50 (2006).
105. van den Hoogen, B. G. *et al.* Prevalence and Clinical Symptoms of Human Metapneumovirus

- Infection in Hospitalized Patients. *J. Infect. Dis.* **188**, 1571–1577 (2003).
106. Peret, T. C. T. *et al.* Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. *J. Infect. Dis.* **185**, 1660–3 (2002).
  107. Boivin, G. *et al.* Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J. Infect. Dis.* **186**, 1330–4 (2002).
  108. Biacchesi, S. *et al.* Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups. *Virology* **315**, 1–9 (2003).
  109. Boivin, G. *et al.* Global Genetic Diversity of Human Metapneumovirus Fusion Gene. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 1154–1157 (2004).
  110. Yang, C. F. *et al.* Genetic diversity and evolution of human metapneumovirus fusion protein over twenty years. *Viol. J.* **6**, (2009).
  111. van den Hoogen, B. G. *et al.* Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 658–66 (2004).
  112. Reiche, J. *et al.* Human Metapneumovirus: Insights from a Ten-Year Molecular and Epidemiological Analysis in Germany. *PLoS One* **9**, e88342 (2014).
  113. Chow, W. Z. *et al.* Genetic diversity, seasonality and transmission network of human metapneumovirus: Identification of a unique sub-lineage of the fusion and attachment genes. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
  114. Hogan, A. B., Glass, K., Moore, H. C. & Anderssen, R. S. Exploring the dynamics of respiratory syncytial virus (RSV) transmission in children. *Theor. Popul. Biol.* **110**, 78–85 (2016).
  115. Piedimonte, G. & Perez, M. K. Respiratory syncytial virus infection and bronchiolitis. *Pediatr. Rev.* **35**, 519–530 (2014).
  116. Mullins, J. A., Lamonte, A. C., Bresee, J. S. & Anderson, L. J. Substantial variability in community respiratory syncytial virus season timing. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **22**, 857–863 (2003).
  117. Cane, P. A. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Rev. Med. Virol.* **11**, 103–116 (2001).
  118. Freymuth, F., Petitjean, J., Pothier, P., Brouard, J. & Norrby, E. Prevalence of respiratory syncytial virus subgroups A and B in France from 1982 to 1990. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 653–5 (1991).
  119. Zhou, H. *et al.* Hospitalizations Associated With Influenza and Respiratory Syncytial Virus in the United States, 1993–2008. *Clin. Infect. Dis.* **54**, 1427–1436 (2012).
  120. Taylor, S. *et al.* Modelling estimates of the burden of respiratory syncytial virus infection in children in the UK. *BMJ Open* **6**, (2016).
  121. Heikkinen, T. Respiratory viruses and children. *J. Infect.* **72**, S29–S33 (2016).

122. Szabo, S. M. *et al.* The risk of mortality among young children hospitalized for severe respiratory syncytial virus infection. *Paediatr. Respir. Rev.* **13**, (2013).
123. Reeves, R. M. *et al.* Estimating the burden of respiratory syncytial virus (RSV) on respiratory hospital admissions in children less than five years of age in England, 2007-2012. *Influenza Other Respi. Viruses* **11**, 122–129 (2017).
124. Nair, H. *et al.* Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* (2010). doi:10.1016/S0140-6736(10)60206-1
125. Falsey, A. R., Hennessey, P. A., Formica, M. A., Cox, C. & Walsh, E. E. Respiratory Syncytial Virus Infection in Elderly and High-Risk Adults. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1749–1759 (2005).
126. Thompson, W. W. *et al.* Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *J. Am. Med. Assoc.* **289**, 179–186 (2003).
127. Falsey, A. R. & Walsh, E. E. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clinical Microbiology Reviews* **13**, 371–384 (2000).
128. Hall, C. B. *et al.* The Burden of Respiratory Syncytial Virus Infection in Young Children. *N. Engl. J. Med.* **360**, 588–598 (2009).
129. Hall, C. B. *et al.* Respiratory syncytial virus-associated hospitalizations among children less than 24 months of age. *Pediatrics* **132**, (2013).
130. Guilan, L. *et al.* Human Metapneumovirus Associated With Community-Acquired Pneumonia in Children in Beijing, China. *J. Med. Virol.* (2013). doi:10.1002/jmv.23438
131. Turner, P. *et al.* Respiratory virus surveillance in hospitalised pneumonia patients on the Thailand-Myanmar border. *BMC Infect. Dis.* **13**, 434 (2013).
132. Freymuth, F. *et al.* Métapneumovirus humain. *Pathol. Biol.* **57**, 133–141 (2009).
133. Boivin, G., Serres, G. De, Côté, S., ... R. G.-E. infectious & 2003, U. Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerg Infect Dis* (2003).
134. Haas, L. E. M., Thijsen, S. F. T., van Elden, L. & Heemstra, K. A. Human metapneumovirus in adults. *Viruses* **5**, 87–110 (2013).
135. Sloan, C., Moore, M. L. & Hartert, T. Impact of pollution, climate, and sociodemographic factors on spatiotemporal dynamics of seasonal respiratory viruses. *Clinical and Translational Science* **4**, 48–54 (2011).
136. Panozzo, C. A., Stockman, L. J., Curns, A. T. & Anderson, L. J. Use of respiratory syncytial virus surveillance data to optimize the timing of immunoprophylaxis. *Pediatrics* **126**, (2010).
137. Bloom-Feshbach, K. *et al.* Latitudinal Variations in Seasonal Activity of Influenza and Respiratory Syncytial Virus (RSV): A Global Comparative Review. *PLoS ONE* **8**, (2013).
138. Freymuth, F. *et al.* Comparison of multiplex PCR assays and conventional techniques for the diagnostic of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute

- respiratory illness. *J. Med. Virol.* **78**, 1498–1504 (2006).
139. Freymuth, F., Vabret, A., ... L. L.-T. P. & 2003, U. Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J* (2003).
  140. Manoha, C., Espinosa, S., Aho, S., ... F. H.-J. of C. & 2007, U. Epidemiological and clinical features of hMPV, RSV and RVs infections in young children. *Elsevier* (2007).
  141. Viazov, S., Ratjen, F., ... R. S.-J. of clinical & 2003, U. High prevalence of human metapneumovirus infection in young children and genetic heterogeneity of the viral isolates. *Am Soc Microbiol* (2003).
  142. Nair, H. *et al.* Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* **375**, 1545–1555 (2010).
  143. Griffiths, C., Drews, S. J. & Marchant, D. J. Respiratory Syncytial Virus: Infection, Detection, and New Options for Prevention and Treatment. *Clin. Microbiol. Rev.* **30**, 277–319 (2017).
  144. Varga, S. M. & Braciale, T. J. The Adaptive Immune Response to Respiratory Syncytial Virus. in *Current topics in microbiology and immunology* **372**, 155–171 (2013).
  145. Thompson, W. W. *et al.* Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA* **289**, 179–86 (2003).
  146. Collins, P. L., Fearn, R. & Graham, B. S. Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **372**, 3–38 (2013).
  147. Tawar, R. G. *et al.* Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. *Science (80-. )*. **326**, 1279–1283 (2009).
  148. Carter, S. D. *et al.* Direct visualization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus reveals the structural basis for membrane permeability. *FEBS Lett.* **584**, 2786–90 (2010).
  149. Piyaratna, R., Tollefson, S. J. & Williams, J. V. Genomic analysis of four human metapneumovirus prototypes. *Virus Res.* **160**, 200–5 (2011).
  150. Collins, P. L. & Graham, B. S. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *J. Virol.* **82**, 2040–55 (2008).
  151. Battles, M. B. & McLellan, J. S. Respiratory syncytial virus entry and how to block it. *Nature Reviews Microbiology* **17**, 233–245 (2019).
  152. Song, J. *et al.* Sequence Analysis of the Fusion Protein Gene of Human Respiratory Syncytial Virus Circulating in China from 2003 to 2014. *Sci. Rep.* **8**, (2018).
  153. Teng, M. N., Whitehead, S. S. & Collins, P. L. Contribution of the Respiratory Syncytial Virus G Glycoprotein and Its Secreted and Membrane-Bound Forms to Virus Replication in Vitro and in Vivo. *Virology* **289**, 283–296 (2001).
  154. Meng, J. *et al.* Respiratory Syncytial Virus Attachment Glycoprotein Contribution to Infection

- Depends on the Specific Fusion Protein. *J. Virol.* **90**, 245–253 (2016).
155. Dubois, J. *et al.* Strain-Dependent Impact of G and SH Deletions Provide New Insights for Live-Attenuated HMPV Vaccine Development. *Vaccines* **7**, 164 (2019).
  156. Collins, P. L., Hill, M. G., Cristina, J. & Grosfeld, H. Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 81–5 (1996).
  157. Blondot, M.-L. *et al.* Structure and functional analysis of the RNA- and viral phosphoprotein-binding domain of respiratory syncytial virus M2-1 protein. *PLoS Pathog.* **8**, e1002734 (2012).
  158. Mazur, N. I. *et al.* Lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus: current management and new therapeutics. *Lancet Respir. Med.* **3**, 888–900 (2015).
  159. Feuillet, F., Lina, B., Rosa-Calatrava, M. & Boivin, G. Ten years of human metapneumovirus research. *J. Clin. Virol.* **53**, 97–105 (2012).
  160. Ghildyal, R., Ho, A. & Jans, D. A. Central role of the respiratory syncytial virus matrix protein in infection. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 692–705 (2006).
  161. Mitra, R., Baviskar, P., Duncan-Decocq, R. R., Patel, D. & Oomens, A. G. P. The human respiratory syncytial virus matrix protein is required for maturation of viral filaments. *J. Virol.* **86**, 4432–43 (2012).
  162. Nieva, J. L., Madan, V. & Carrasco, L. Viroporins: structure and biological functions. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 563–574 (2012).
  163. Gan, S.-W. *et al.* The small hydrophobic protein of the human respiratory syncytial virus forms pentameric ion channels. *J. Biol. Chem.* **287**, 24671–89 (2012).
  164. Bukreyev, A., Whitehead, S. S., Murphy, B. R. & Collins, P. L. Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse. *J. Virol.* **71**, 8973–82 (1997).
  165. Soto, J. A. *et al.* Human Metapneumovirus: Mechanisms and Molecular Targets Used by the Virus to Avoid the Immune System. *Front. Immunol.* **9**, 2466 (2018).
  166. Groskreutz, D. J., Babor, E. C., Monick, M. M., Varga, S. M. & Hunninghake, G. W. Respiratory syncytial virus limits alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2alpha) phosphorylation to maintain translation and viral replication. *J. Biol. Chem.* **285**, 24023–31 (2010).
  167. Graham, B. S. & Anderson, L. J. Challenges and Opportunities for Respiratory Syncytial Virus Vaccines. in *Current topics in microbiology and immunology* **372**, 391–404 (2013).
  168. Swedan, S., Andrews, J., Majumdar, T., Musiyenko, A. & Barik, S. Multiple functional domains and complexes of the two nonstructural proteins of human respiratory syncytial virus contribute to interferon suppression and cellular location. *J. Virol.* **85**, 10090–100 (2011).

169. Spann, K. M., Tran, K. C. & Collins, P. L. Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and proinflammatory cytokines. *J. Virol.* **79**, 5353–62 (2005).
170. Atreya, P. L., Peeples, M. E. & Collins, P. L. The NS1 protein of human respiratory syncytial virus is a potent inhibitor of minigenome transcription and RNA replication. *J. Virol.* **72**, 1452–61 (1998).
171. Lifland, A. W. *et al.* Human respiratory syncytial virus nucleoprotein and inclusion bodies antagonize the innate immune response mediated by MDA5 and MAVS. *J. Virol.* **86**, 8245–58 (2012).
172. Segondy, M. Novel respiratory viruses and their diagnosis. *Médecine thérapeutique / Pédiatrie* **15**, 123–132 (2012).
173. Chkhaidze, I., Manjavidze, N. & Nemsadze, K. Serodiagnosis of acute respiratory infections in children in Georgia. *Indian J. Pediatr.* **73**, 569–72 (2006).
174. SMART - Servier Medical ART. Available at: <https://smart.servier.com/>. (Accessed: 4th May 2020)
175. Andrieu, A.-G., Paute, J., Glomot, L., Jarlier, V. & Belmin, J. Épidémie de grippe nosocomiale dans un service de gériatrie Efficacité des mesures de prévention. *Presse Med.* **35**, 1419–1426 (2006).
176. Uyeki, T. M. *et al.* Update on Diagnosis, Treatment, Chemoprophylaxis, and Institutional Outbreak Management of Seasonal Influenza. *Clin. Infect. Dis.* **68**, 1–47 (2018).
177. Kuypers, J. *et al.* Comparison of real-time PCR assays with fluorescent-antibody assays for diagnosis of respiratory virus infections in children. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 2382–8 (2006).
178. Roingear, P. Viral detection by electron microscopy: past, present and future. *Biol. Cell* **100**, 491–501 (2008).
179. Nagler, F. P. & Rake, G. The Use of the Electron Microscope in Diagnosis of Variola, Vaccinia, and Varicella. *J. Bacteriol.* **55**, 45–51 (1948).
180. Goldsmith, C. S. & Miller, S. E. Modern uses of electron microscopy for detection of viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 552–63 (2009).
181. Zhang, Y., Hung, T., Song, J. & He, J. Electron microscopy: essentials for viral structure, morphogenesis and rapid diagnosis. *Sci. China Life Sci.* **56**, 421–430 (2013).
182. Dilnessa, T. & Zeleke, H. Cell culture, cytopathic effect and immunofluorescence diagnosis of viral infection. *J. Microbiol. Mod.* (2017).
183. Das, S., Dunbar, S. & Tang, Y.-W. Laboratory Diagnosis of Respiratory Tract Infections in Children – the State of the Art. *Front. Microbiol.* **9**, 2478 (2018).
184. Olsen, M. A. *et al.* Isolation of seven respiratory viruses in shell vials: a practical and highly sensitive method. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 422–5 (1993).

185. Matthey, S. *et al.* Rapid detection of respiratory viruses by shell vial culture and direct staining by using pooled and individual monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 540–4 (1992).
186. Hematian, A. *et al.* Traditional and Modern Cell Culture in Virus Diagnosis. *Osong public Heal. Res. Perspect.* **7**, 77–82 (2016).
187. Leland, D. S. & Ginocchio, C. C. Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 49 (2007).
188. Webster, R., Cox, N. & Stohr, K. *WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. WHO/CDS/CDR/2002.5 Rev. 1* (2002).
189. Hirst, G. K. The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination. *J. Exp. Med.* **75**, 49–64 (1942).
190. Slinger, R., Milk, R., Gaboury, I. & Diaz-Mitoma, F. Evaluation of the QuickLab RSV Test, a New Rapid Lateral-Flow Immunoassay for Detection of Respiratory Syncytial Virus Antigen. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 3731–3733 (2004).
191. Englund, J. A. *et al.* Rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infections in immunocompromised adults. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 1649–53 (1996).
192. Chartrand, C., Tremblay, N., Renaud, C. & Papenburg, J. Diagnostic Accuracy of Rapid Antigen Detection Tests for Respiratory Syncytial Virus Infection: Systematic Review and Meta-analysis. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 3738–3749 (2015).
193. Ginocchio, C. C. Detection of respiratory viruses using non-molecular based methods. *J. Clin. Virol.* **40**, S11–S14 (2007).
194. Kim, D.-K. & Poudel, B. Tools to detect influenza virus. *Yonsei Med. J.* **54**, 560–6 (2013).
195. Mahony, J. B. Detection of Respiratory Viruses by Molecular Methods. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 716–747 (2008).
196. Drews, S. J., Branche, A. R., Falsey, A. R. & Lee, N. What is the role of rapid molecular testing for seniors and other at-risk adults with respiratory syncytial virus infections? *J. Clin. Virol.* **117**, 27–32 (2019).
197. Caliendo, A. M. *et al.* Better tests, better care: improved diagnostics for infectious diseases. *Clin. Infect. Dis.* **57 Suppl 3**, S139-70 (2013).
198. Ginocchio, C. C. & McAdam, A. J. Current Best Practices for Respiratory Virus Testing. *J. Clin. Microbiol.* **49**, S44–S48 (2011).
199. Chen, J. H. K. *et al.* Clinical Evaluation of the New High-Throughput Luminex NxTAG Respiratory Pathogen Panel Assay for Multiplex Respiratory Pathogen Detection. *J. Clin. Microbiol.* **54**, 1820–1825 (2016).
200. Caliendo, A. M. Multiplex PCR and Emerging Technologies for the Detection of Respiratory Pathogens. *Clin. Infect. Dis.* **52**, S326–S330 (2011).
201. Popowitch, E. B., O’Neill, S. S. & Miller, M. B. Comparison of the Biofire FilmArray RP,

- Genmark eSensor RVP, Luminex xTAG RVPv1, and Luminex xTAG RVP fast multiplex assays for detection of respiratory viruses. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 1528–33 (2013).
202. Hayden, R. T. *et al.* Comparison of two broadly multiplexed PCR systems for viral detection in clinical respiratory tract specimens from immunocompromised children. *J. Clin. Virol.* **53**, 308–313 (2012).
203. Hammond, S. P. *et al.* Respiratory virus detection in immunocompromised patients with FilmArray respiratory panel compared to conventional methods. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 3216–21 (2012).
204. Rand, K. H., Rampersaud, H. & Houck, H. J. Comparison of two multiplex methods for detection of respiratory viruses: FilmArray RP and xTAG RVP. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 2449–53 (2011).
205. Salez, N. *et al.* No Title. **10**, e0130378 (2015).
206. Chaussabel, D. Analysis of Significance Patterns Identifies Ubiquitous and Disease-Specific Gene-Expression Signatures in Patient Peripheral Blood Leukocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1062**, 146–154 (2005).
207. Ramilo, O. & Mejias, A. Host transcriptomics for diagnosis of infectious diseases: one step closer to clinical application. *The European respiratory journal* **49**, (2017).
208. Grohskopf, L. A. *et al.* Prevention and Control of Seasonal Influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices—United States, 2018–19 Influenza Season. *MMWR. Recomm. Reports* **67**, 1–20 (2018).
209. Flu News Europe | Virus characteristics. Available at: <https://flunewseurope.org/VirusCharacteristics>. (Accessed: 19th November 2019)
210. Fulvini, A. A. *et al.* Gene Constellation of Influenza A Virus Reassortants with High Growth Phenotype Prepared as Seed Candidates for Vaccine Production. *PLoS One* **6**, e20823 (2011).
211. Poehling, K. A. *et al.* 2015–2016 Vaccine Effectiveness of Live Attenuated and Inactivated Influenza Vaccines in Children in the United States. *Clin. Infect. Dis.* **66**, 665–672 (2018).
212. McLean, H. Q. *et al.* Association of Prior Vaccination With Influenza Vaccine Effectiveness in Children Receiving Live Attenuated or Inactivated Vaccine. *JAMA Netw. Open* **1**, e183742 (2018).
213. Chua, J. V & Chen, W. H. Bench-to-bedside review: vaccine protection strategies during pandemic flu outbreaks. *Crit. Care* **14**, 218 (2010).
214. Chan, C. Y.-Y. & Tambyah, P. A. Preflucel®: a Vero-cell culture-derived trivalent influenza vaccine. *Expert Rev. Vaccines* **11**, 759–773 (2012).
215. Mandelboim, M. *et al.* Ineffectiveness of the 2014–2015 H3N2 influenza vaccine. *Oncotarget* **7**, 1185–92 (2016).
216. Principi, N., Senatore, L. & Esposito, S. Protection of young children from influenza through

- universal vaccination. *Hum. Vaccin. Immunother.* **11**, 2350–8 (2015).
217. Wen, S. C. & Williams, J. V. New Approaches for Immunization and Therapy against Human Metapneumovirus. *Clin. Vaccine Immunol.* **22**, 858–66 (2015).
218. Karron, R. A., Mateo, J. S., Wanionek, K., Collins, P. L. & Buchholz, U. J. Evaluation of a live attenuated human metapneumovirus vaccine in adults and children. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* **7**, 86–89 (2018).
219. Kou, M., Hwang, V. & Ramkellawan, N. Bronchiolitis. *Emerg. Med. Clin. North Am.* **36**, 275–286 (2018).
220. Casper, C., Englund, J. & Boeckh, M. How I treat influenza in patients with hematologic malignancies. *Blood* **115**, 1331 (2010).
221. Chemaly, R. F., Shah, D. P. & Boeckh, M. J. Management of Respiratory Viral Infections in Hematopoietic Cell Transplant Recipients and Patients With Hematologic Malignancies. *Clin. Infect. Dis. An Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **59**, S344 (2014).
222. Shahani, L., Ariza-Heredia, E. J. & Chemaly, R. F. Antiviral therapy for respiratory viral infections in immunocompromised patients. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **15**, 401–415 (2017).
223. Waghmare, A., Englund, J. A. & Boeckh, M. How I treat respiratory viral infections in the setting of intensive chemotherapy or hematopoietic cell transplantation. *Blood* **127**, 2682–92 (2016).
224. Jackson, G. G., Muldoon, R. L. & Akers, L. W. Serological evidence for prevention of influenzal infection in volunteers by an anti-influenzal drug adamantanamine hydrochloride. *Antimicrob. Agents Chemother.* **161**, 703–7 (1963).
225. Rabinovich, S., Baldini, J. T. & Bannister, R. Treatment of influenza. The therapeutic efficacy of rimantadine HC1 in a naturally occurring influenza A2 outbreak. *Am. J. Med. Sci.* **257**, 328–335 (1969).
226. Kim, C. U. *et al.* Structure-activity relationship studies of novel carbocyclic influenza neuraminidase inhibitors. *J. Med. Chem.* **41**, 2451–2460 (1998).
227. Von Itzstein, M. *et al.* Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature* **363**, 418–423 (1993).
228. Takahashi, K. *et al.* In vitro and in vivo activities of T-705 and oseltamivir against influenza virus. *Antivir. Chem. Chemother.* **14**, 235–241 (2003).
229. Noshi, T. *et al.* In vitro characterization of baloxavir acid, a first-in-class cap-dependent endonuclease inhibitor of the influenza virus polymerase PA subunit. *Antiviral Res.* **160**, 109–117 (2018).
230. Toledo-Rueda, W. *et al.* Antiviral resistance markers in influenza virus sequences in Mexico, 2000–2017. *Infect. Drug Resist.* **11**, 1751–1756 (2018).

231. Hurt, A. C. The epidemiology and spread of drug resistant human influenza viruses. *Current Opinion in Virology* **8**, 22–29 (2014).
232. McKimm-Breschkin, J. L. Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance. *Influenza Other Respi. Viruses* **7 Suppl 1**, 25–36 (2013).
233. Dobson, J., Whitley, R. J., Pocock, S. & Monto, A. S. Oseltamivir treatment for influenza in adults: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet* **385**, 1729–1737 (2015).
234. Venkatesan, S. *et al.* Impact of Outpatient Neuraminidase Inhibitor Treatment in Patients Infected With Influenza A(H1N1)pdm09 at High Risk of Hospitalization: An Individual Participant Data Metaanalysis. *Clin. Infect. Dis.* **64**, 1328–1334 (2017).
235. Kiso, M. *et al.* Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. *Lancet* **364**, 759–765 (2004).
236. Stephenson, I. *et al.* Neuraminidase Inhibitor Resistance after Oseltamivir Treatment of Acute Influenza A and B in Children. *Clin. Infect. Dis.* **48**, 389–396 (2009).
237. Esposito, S. *et al.* Oseltamivir-induced resistant pandemic A/H1N1 influenza virus in a child with cystic fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J. Clin. Virol.* **48**, 62–65 (2010).
238. Hurt, A. C. *et al.* Emergence and spread of oseltamivir-resistant A(H1N1) influenza viruses in Oceania, South East Asia and South Africa. *Antiviral Res.* **83**, 90–93 (2009).
239. Dharan, N. J. *et al.* Infections With Oseltamivir-Resistant Influenza A(H1N1) Virus in the United States. *JAMA* **301**, 1034 (2009).
240. Hatakeyama, S. *et al.* Enhanced expression of an alpha2,6-linked sialic acid on MDCK cells improves isolation of human influenza viruses and evaluation of their sensitivity to a neuraminidase inhibitor. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4139–46 (2005).
241. Webster, R. G. & Govorkova, E. A. Continuing challenges in influenza. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1323**, 115–39 (2014).
242. Ciancio, B. C. *et al.* Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses detected in Europe during season 2007-8 had epidemiologic and clinical characteristics similar to co-circulating susceptible A(H1N1) viruses. *Euro Surveill.* **14**, (2009).
243. McKimm-Breschkin, J. L. *et al.* Prevention and treatment of respiratory viral infections: Presentations on antivirals, traditional therapies and host-directed interventions at the 5th ISIRV Antiviral Group conference. *Antiviral Res.* **149**, 118–142 (2018).
244. Furuta, Y. *et al.* Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Res.* **100**, 446–54 (2013).
245. Furuta, Y., Komeno, T. & Nakamura, T. Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* **93**, 449–463 (2017).
246. Sleeman, K. *et al.* In vitro antiviral activity of favipiravir (T-705) against drug-resistant influenza and 2009 A(H1N1) viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 2517–24 (2010).

247. Sidwell, R. W. *et al.* Efficacy of Orally Administered T-705 on Lethal Avian Influenza A (H5N1) Virus Infections in Mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 845 (2007).
248. Marathe, B. M. *et al.* Combinations of Oseltamivir and T-705 Extend the Treatment Window for Highly Pathogenic Influenza A(H5N1) Virus Infection in Mice. *Sci. Rep.* **6**, 26742 (2016).
249. Delang, L., Abdelnabi, R. & Neyts, J. Favipiravir as a potential countermeasure against neglected and emerging RNA viruses. *Antiviral Res.* **153**, 85–94 (2018).
250. Hayden, F. G. *et al.* Baloxavir Marboxil for Uncomplicated Influenza in Adults and Adolescents. *N. Engl. J. Med.* **379**, 913–923 (2018).
251. Takashita, E. *et al.* Influenza A(H3N2) virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a polymerase acidic subunit I38T substitution detected from a hospitalised child without prior baloxavir treatment, Japan, January 2019. *Eurosurveillance* **24**, (2019).
252. de Haas, E. C. & Luijendijk, H. J. Baloxavir for influenza: Enrichment obscured lack of effect in North-American adults. *Eur. J. Intern. Med.* (2019). doi:10.1016/J.EJIM.2018.12.002
253. Checkmahomed, L. *et al.* Impact of the baloxavir-resistant polymerase acid (PA) I38T substitution on the fitness of contemporary influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) strains. *J. Infect. Dis.* (2019). doi:10.1093/infdis/jiz418
254. Clark, M. P. *et al.* Discovery of a Novel, First-in-Class, Orally Bioavailable Azaindole Inhibitor (VX-787) of Influenza PB2. *J. Med. Chem.* **57**, 6668–6678 (2014).
255. Smee, D. F., Barnard, D. L. & Jones, S. M. Activities of JNJ63623872 and oseltamivir against influenza A H1N1pdm and H3N2 virus infections in mice. *Antiviral Res.* **136**, 45–50 (2016).
256. Trevejo, J. M. *et al.* JNJ-63623872 treatment in adult volunteers experimentally inoculated with live influenza virus: a Phase IIa, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Antivir. Ther.* **23**, 335–344 (2017).
257. Finberg, R. W. *et al.* Phase 2b Study of Pimodivir (JNJ-63623872) as Monotherapy or in Combination With Oseltamivir for Treatment of Acute Uncomplicated Seasonal Influenza A: TOPAZ Trial. *J. Infect. Dis.* **219**, 1026–1034 (2019).
258. Shi, L. *et al.* Antiviral activity of arbidol against influenza A virus, respiratory syncytial virus, rhinovirus, coxsackie virus and adenovirus in vitro and in vivo. *Arch. Virol.* **152**, 1447–1455 (2007).
259. Principi, N. *et al.* Drugs for Influenza Treatment: Is There Significant News? *Front. Med.* **6**, 109 (2019).
260. Chatterjee, S. *et al.* Identification of novel genes and pathways regulating SREBP transcriptional activity. *PLoS One* **4**, (2009).
261. Chiang, A. P. & Butte, A. J. Systematic evaluation of drug-disease relationships to identify leads for novel drug uses. *Clin. Pharmacol. Ther.* **86**, 507–510 (2009).
262. Oprea, T. I. *et al.* Associating drugs, targets and clinical outcomes into an integrated network

- affords a new platform for computer-aided drug repurposing. in *Molecular Informatics* **30**, 100–111 (2011).
263. Davidson, S. Treating influenza infection, from now and into the future. *Frontiers in Immunology* **9**, (2018).
264. Belardo, G., Cenciarelli, O., Frazia, S. La, Rossignol, J. F. & Santoroa, M. G. Synergistic effect of nitazoxanide with neuraminidase inhibitors against influenza a viruses in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 1061–1069 (2015).
265. Gamiño-Arroyo, A. E. *et al.* Efficacy and Safety of Nitazoxanide in Addition to Standard of Care for the Treatment of Severe Acute Respiratory Illness. *Clin. Infect. Dis.* **69**, 1903–1911 (2019).
266. Salvatore, M. *et al.* DAS181 for Treatment of Parainfluenza Virus Infections in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients at a Single Center. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **22**, 965–970 (2016).
267. Carey, M. A. *et al.* Pharmacologic inhibition of COX-1 and COX-2 in influenza a viral infection in mice. *PLoS One* **5**, (2010).
268. Marcelin, J. R., Wilson, J. W. & Razonable, R. R. Oral ribavirin therapy for respiratory syncytial virus infections in moderately to severely immunocompromised patients. *Transpl. Infect. Dis.* **16**, 242–250 (2014).
269. Ventura, F., Cheseaux, J. J., Cotting, J. & Guignard, J. P. [Is the use of ribavirin aerosols in respiratory syncytial virus infections justified? Clinical and economic evaluation]. *Arch. Pediatr.* **5**, 123–31 (1998).
270. DeVincenzo, J. P., Hirsch, R. L., Fuentes, R. J. & Top, F. H. Respiratory syncytial virus immune globulin treatment of lower respiratory tract infection in pediatric patients undergoing bone marrow transplantation - A compassionate use experience. *Bone Marrow Transplant.* **25**, 161–165 (2000).
271. Feltes, T. F. *et al.* Palivizumab prophylaxis reduces hospitalization due to respiratory syncytial virus in young children with hemodynamically significant congenital heart disease. *J. Pediatr.* **143**, 532–40 (2003).
272. Groothuis, J. R. & Simoes, E. A. Immunoprophylaxis and immunotherapy: role in the prevention and treatment of respiratory syncytial virus. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2**, 97–103 (1993).
273. Groothuis, J. R. *et al.* Prophylactic administration of respiratory syncytial virus immune globulin to high-risk infants and young children. The Respiratory Syncytial Virus Immune Globulin Study Group. *N. Engl. J. Med.* **329**, 1524–30 (1993).
274. Brady, M. T. *et al.* Updated guidance for palivizumab prophylaxis among infants and young children at increased risk of hospitalization for respiratory syncytial virus infection. *Pediatrics* **134**, 415–420 (2014).

275. de Fontbrune, F. S. *et al.* Palivizumab Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clin. Infect. Dis.* **45**, 1019–1024 (2007).
276. Ambrose, C. S. & McLaurin, K. K. The medicaid cost of palivizumab. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society* **4**, 83–84 (2015).
277. Domachowske, J. B. *et al.* Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of MEDI8897, an Extended Half-life Single-dose Respiratory Syncytial Virus Prefusion F-targeting Monoclonal Antibody Administered as a Single Dose to Healthy Preterm Infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **37**, 886–892 (2018).
278. Mejias, A., Garcia-Maurino, C., Rodriguez-Fernandez, R., Peeples, M. E. & Ramilo, O. Development and clinical applications of novel antibodies for prevention and treatment of respiratory syncytial virus infection. *Vaccine* **35**, 496–502 (2017).
279. DeVincenzo, J. P. *et al.* Activity of Oral ALS-008176 in a Respiratory Syncytial Virus Challenge Study. *N. Engl. J. Med.* **373**, 2048–2058 (2015).
280. Wyde, P. R., Chetty, S. N., Jewell, A. M., Boivin, G. & Piedra, P. A. Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin in vitro. *Antiviral Res.* **60**, 51–9 (2003).
281. Hamelin, M.-E., Prince, G. A. & Boivin, G. Effect of ribavirin and glucocorticoid treatment in a mouse model of human metapneumovirus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 774–7 (2006).
282. Shachor-Meyouhas, Y., Ben-Barak, A. & Kassis, I. Treatment with oral ribavirin and IVIG of severe human metapneumovirus pneumonia (HMPV) in immune compromised child. *Pediatr. Blood Cancer* **57**, 350–351 (2011).
283. Spetch, L., Bowlin, T. L. & Casola, A. Effect of NMSO3 treatment in a murine model of human metapneumovirus infection. *J. Gen. Virol.* **89**, 2709–2712 (2008).
284. Hamelin, M.-E. *et al.* Prophylactic and therapeutic benefits of a monoclonal antibody against the fusion protein of human metapneumovirus in a mouse model. *Antiviral Res.* **88**, 31–37 (2010).
285. Deffrasnes, C., Hamelin, M.-E., Prince, G. A. & Boivin, G. Identification and Evaluation of a Highly Effective Fusion Inhibitor for Human Metapneumovirus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 279–287 (2008).
286. Márquez-Escobar, V. A., Tirado-Mendoza, R., Noyola, D. E., Gutiérrez-Ortega, A. & Alpuche-Solís, Á. G. HRA2pl peptide: a fusion inhibitor for human metapneumovirus produced in tobacco plants by transient transformation. *Planta* **242**, 69–76 (2015).
287. Deffrasnes, C. *et al.* Inhibition of human metapneumovirus replication by small interfering RNA. *Antivir. Ther.* **13**, 821–32 (2008).
288. LEEM. *Les entreprises du médicament en France. Bilan économique.* (2018).

289. Zeng, X. *et al.* The methodological quality assessment tools for preclinical and clinical studies, systematic review and meta-analysis, and clinical practice guideline: a systematic review. *J. Evid. Based. Med.* **8**, 2–10 (2015).
290. Andrade, C. The Primary Outcome Measure and Its Importance in Clinical Trials. *J. Clin. Psychiatry* **76**, e1320–e1323 (2015).
291. Free Vectors, Stock Photos & PSD Downloads | Freepik. Available at: <https://www.freepik.com/>. (Accessed: 4th May 2020)
292. Mestre-Ferrandiz, J., Sussex, J. & Towse, A. The R&D Cost of a New Medicine. *Monographs* (2012).
293. Nosengo, N. Can you teach old drugs new tricks? *Nature* **534**, 314–316 (2016).
294. DiMasi, J. A., Grabowski, H. G. & Hansen, R. W. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *J. Health Econ.* **47**, 20–33 (2016).
295. Barratt, M. J. & Frail, D. *Drug repositioning : bringing new life to shelved assets and existing drugs.* (Wiley, 2012).
296. Paul, S. M. *et al.* How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 203–214 (2010).
297. Cressey, D. Traditional drug-discovery model ripe for reform. *Nature* **471**, 17–18 (2011).
298. Horrobin, D. F. Realism in drug discovery—could Cassandra be right? *Nat. Biotechnol.* **19**, 1099–1100 (2001).
299. Pammolli, F., Magazzini, L. & Riccaboni, M. The productivity crisis in pharmaceutical R&D. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 428–438 (2011).
300. Ashburn, T. T. & Thor, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 673–683 (2004).
301. Mullard, A. Drug repurposing programmes get lift off. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 505–6 (2012).
302. Padhy, B. & Gupta, Y. Drug repositioning: Re-investigating existing drugs for new therapeutic indications. *J. Postgrad. Med.* **57**, 153 (2011).
303. Chong, C. R. & Sullivan, D. J. New uses for old drugs. *Nature* **448**, 645–646 (2007).
304. Basso, J., Miranda, A., Sousa, J., Pais, A. & Vitorino, C. Repurposing drugs for glioblastoma: From bench to bedside. *Cancer Lett.* **428**, 173–183 (2018).
305. Kim, J. H. & Scialli, A. R. Thalidomide: The Tragedy of Birth Defects and the Effective Treatment of Disease. *Toxicol. Sci.* **122**, 1–6 (2011).
306. Ridings, J. E. The Thalidomide Disaster, Lessons from the Past. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **947**, 575–586 (2013).
307. Zhu, Z. *et al.* Thalidomide is a therapeutic agent that is effective in inducing and maintaining endoscopic remission in adult CD patients. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **41**, 210–216 (2017).

308. Stephens, T. D. & Brynner, R. *Dark remedy : the impact of thalidomide and its revival as a vital medicine*. (Perseus Pub, 2001).
309. Pizzorno, A., Padey, B., Terrier, O. & Rosa-Calatrava, M. Drug Repurposing Approaches for the Treatment of Influenza Viral Infection: Reviving Old Drugs to Fight Against a Long-Lived Enemy. *Front. Immunol.* **10**, 531 (2019).
310. Budd, A. *et al.* Increased survival after gemfibrozil treatment of severe mouse influenza. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 2965–2968 (2007).
311. Gopal, R. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) suppresses inflammation and bacterial clearance during influenza-bacterial super-infection. *Viruses* **11**, (2019).
312. Mehrbod, P. *et al.* Simvastatin modulates cellular components in influenza A virus-infected cells. *Int. J. Mol. Med.* **34**, 61–73 (2014).
313. Kwong, J. C., Li, P. & Redelmeier, D. A. Influenza Morbidity and Mortality in Elderly Patients Receiving Statins: A Cohort Study. *PLoS One* **4**, (2009).
314. Brett, S. J. *et al.* Pre-admission statin use and in-hospital severity of 2009 pandemic influenza A(H1N1) disease. *PLoS One* **6**, (2011).
315. Almog, Y. *et al.* Prior statin therapy is associated with a decreased rate of severe sepsis. *Circulation* **110**, 880–885 (2004).
316. Myles, P. R. *et al.* The impact of statins, ace inhibitors and gastric acid suppressants on pneumonia mortality in a UK general practice population cohorty. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* **18**, 697–703 (2009).
317. Chase, M. *et al.* Coenzyme Q10 in acute influenza. *Influenza Other Respi. Viruses* **13**, 64–70 (2019).
318. Rossignol, J. F., La Frazia, S., Chiappa, L., Ciucci, A. & Santoro, M. G. Thiazolides, a new class of anti-influenza molecules targeting viral hemagglutinin at the post-translational level. *J. Biol. Chem.* **284**, 29798–808 (2009).
319. Tilmanis, D., van Baalen, C., Oh, D. Y., Rossignol, J. F. & Hurt, A. C. The susceptibility of circulating human influenza viruses to tizoxanide, the active metabolite of nitazoxanide. *Antiviral Res.* **147**, 142–148 (2017).
320. Haffizulla, J. *et al.* Effect of nitazoxanide in adults and adolescents with acute uncomplicated influenza: A double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2b/3 trial. *Lancet Infect. Dis.* **14**, 609–618 (2014).
321. Scheuch, G. *et al.* Targeting intracellular signaling as an antiviral strategy: aerosolized LASAG for the treatment of influenza in hospitalized patients. *Emerg. Microbes Infect.* **7**, 1–8 (2018).
322. Hung, I. F. *et al.* O0815 Treatment of severe influenza A infection with celecoxib : a double-blind , randomised , controlled trial. **3**, 28–29 (2017).

323. Lejal, N. *et al.* Structure-based discovery of the novel antiviral properties of naproxen against the nucleoprotein of influenza A virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 2231–2242 (2013).
324. Santos, R. *et al.* A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 19–34 (2017).
325. Coleman, C. M. *et al.* Abelson Kinase Inhibitors Are Potent Inhibitors of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus and Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Fusion. *J. Virol.* **90**, 8924–8933 (2016).
326. Shin, J., Jung, E., Kim, M., Baric, R. & Go, Y. Saracatinib Inhibits Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus Replication In Vitro. *Viruses* **10**, 283 (2018).
327. Comer, J. *et al.* Filovirus Virulence in Interferon  $\alpha/\beta$  and  $\gamma$  Double Knockout Mice, and Treatment with Favipiravir. *Viruses* **11**, 137 (2019).
328. Kerber, R. *et al.* Laboratory findings, compassionate use of favipiravir, and outcome in patients with Ebola virus disease, Guinea, 2015 — a retrospective observational study. *J. Infect. Dis.* (2019). doi:10.1093/infdis/jiz078
329. Hopkins, A. L. Predicting promiscuity. *Nature* **462**, 167–168 (2009).
330. Hopkins, A. L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 682–690 (2008).
331. Reddy, A. S. & Zhang, S. Polypharmacology: drug discovery for the future. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **6**, 41–7 (2013).
332. Strating, J. R. P. M. *et al.* Itraconazole Inhibits Enterovirus Replication by Targeting the Oxysterol-Binding Protein. *Cell Rep.* **10**, 600–615 (2015).
333. Colson, P. & Raoult, D. Fighting viruses with antibiotics: an overlooked path. *Int. J. Antimicrob. Agents* **48**, 349–352 (2016).
334. Brehmer, D. *et al.* Cellular targets of gefitinib. *Cancer Res.* **65**, 379–82 (2005).
335. Moffat, J. G., Vincent, F., Lee, J. A., Eder, J. & Prunotto, M. Opportunities and challenges in phenotypic drug discovery: an industry perspective. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 531–543 (2017).
336. Zon, L. I. & Peterson, R. T. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 35–44 (2005).
337. Cousin, M. A. *et al.* Larval Zebrafish Model for FDA-Approved Drug Repositioning for Tobacco Dependence Treatment. *PLoS One* **9**, e90467 (2014).
338. Buckley, C. E. *et al.* Drug reprofiling using zebrafish identifies novel compounds with potential pro-myelination effects. *Neuropharmacology* **59**, 149–159 (2010).
339. Compston, A. & Coles, A. Multiple sclerosis. *Lancet* **372**, 1502–1517 (2008).
340. Zheng, W., Thorne, N. & McKew, J. C. Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery. *Drug Discovery Today* **18**, 1067–1073 (2013).

341. Haeberle, S. & Zengerle, R. Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications. *Lab Chip* **7**, 1094 (2007).
342. Clouser, C. L., Patterson, S. E. & Mansky, L. M. Exploiting Drug Repositioning for Discovery of a Novel HIV Combination Therapy. *J. Virol.* **84**, 9301–9309 (2010).
343. Miller, S. C. *et al.* Identification of known drugs that act as inhibitors of NF-kappaB signaling and their mechanism of action. *Biochem. Pharmacol.* **79**, 1272–80 (2010).
344. Schöffski, P. *et al.* Clinical impact of trabectedin (ecteinascidin-743) in advanced/metastatic soft tissue sarcoma. *Expert Opin. Pharmacother.* **9**, 1609–1618 (2008).
345. Shen, L. *et al.* High-throughput Screening and Identification of Potent Broad-spectrum Inhibitors of Coronaviruses. *J. Virol.* (2019). doi:10.1128/JVI.00023-19
346. Lengauer, T., Lemmen, C., Rarey, M. & Zimmermann, M. Novel technologies for virtual screening. *Drug Discov. Today* **9**, 27–34 (2004).
347. Oprea, T. I. & Matter, H. Integrating virtual screening in lead discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 349–358 (2004).
348. Tanrikulu, Y., Krüger, B. & Proschak, E. The holistic integration of virtual screening in drug discovery. *Drug Discov. Today* **18**, 358–364 (2013).
349. Keiser, M. J. *et al.* Predicting new molecular targets for known drugs. *Nature* **462**, 175–181 (2009).
350. Hieronymus, H. *et al.* Gene expression signature-based chemical genomic prediction identifies a novel class of HSP90 pathway modulators. *Cancer Cell* **10**, 321–330 (2006).
351. Zeng, H., Qiu, C. & Cui, Q. Drug-Path: a database for drug-induced pathways. *Database (Oxford)*. **2015**, bav061 (2015).
352. Dudley, J. T., Deshpande, T. & Butte, A. J. Exploiting drug-disease relationships for computational drug repositioning. *Brief. Bioinform.* **12**, 303–11 (2011).
353. Velez, G., Bassuk, A. G., Colgan, D., Tsang, S. H. & Mahajan, V. B. Therapeutic drug repositioning using personalized proteomics of liquid biopsies. *JCI Insight* **2**, (2017).
354. Rognan, D. *Criblage virtuel par docking moléculaire.*
355. Wishart, D. S. *et al.* DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res.* **46**, D1074–D1082 (2018).
356. Wishart, D. S. *et al.* DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic Acids Res.* **36**, D901-6 (2008).
357. Dakshanamurthy, S. *et al.* Predicting new indications for approved drugs using a proteochemometric method. *J. Med. Chem.* **55**, 6832–48 (2012).
358. Sanseau, P. *et al.* Use of genome-wide association studies for drug repositioning. *Nat. Biotechnol.* **30**, 317–320 (2012).
359. Moschen, A. R. *et al.* The RANKL/OPG system is activated in inflammatory bowel disease and

- relates to the state of bone loss. *Gut* **54**, 479 (2005).
360. Franke, A. *et al.* Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat. Genet.* **42**, 1118–25 (2010).
361. Willyard, C. New human gene tally reignites debate. *Nat.* 2018 5587710 (2018).
362. Pertea, M. *et al.* Thousands of large-scale RNA sequencing experiments yield a comprehensive new human gene list and reveal extensive transcriptional noise. *bioRxiv* 332825 (2018).  
doi:10.1101/332825
363. Yue, Z. *et al.* Repositioning drugs by targeting network modules: a Parkinson's disease case study. *BMC Bioinformatics* **18**, 532 (2017).
364. Currie, L. J., Harrison, M. B., Trugman, J. M., Bennett, J. P. & Wooten, G. F. Postmenopausal Estrogen Use Affects Risk for Parkinson Disease. *Arch. Neurol.* **61**, 886 (2004).
365. Sawada, H. *et al.* Estradiol protects dopaminergic neurons in a MPP+Parkinson's disease model. *Neuropharmacology* **42**, 1056–64 (2002).
366. Smith, S. B., Dampier, W., Tozeren, A., Brown, J. R. & Magid-Slav, M. Identification of common biological pathways and drug targets across multiple respiratory viruses based on human host gene expression analysis. *PLoS One* **7**, e33174 (2012).
367. Jensen, P. B., Jensen, L. J. & Brunak, S. Mining electronic health records: towards better research applications and clinical care. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 395–405 (2012).
368. Hurdle, J. F., Smith, K. R. & Mineau, G. P. Mining electronic health records: an additional perspective. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 75 (2013).
369. Yao, L., Zhang, Y., Li, Y., Sanseau, P. & Agarwal, P. Electronic health records: Implications for drug discovery. *Drug Discov. Today* **16**, 594–599 (2011).
370. Simmons, M., Singhal, A. & Lu, Z. Text Mining for Precision Medicine: Bringing Structure to EHRs and Biomedical Literature to Understand Genes and Health. *Adv. Exp. Med. Biol.* **939**, 139–166 (2016).
371. Leventhal, J. C., Cummins, J. A., Schwartz, P. H., Martin, D. K. & Tierney, W. M. Designing a System for Patients Controlling Providers' Access to their Electronic Health Records: Organizational and Technical Challenges. *J. Gen. Intern. Med.* **30**, 17 (2015).
372. Paik, H. *et al.* Repurpose terbutaline sulfate for amyotrophic lateral sclerosis using electronic medical records. *Sci. Rep.* **5**, 8580 (2015).
373. Pundir, S., Martin, M. J., O'Donovan, C. & UniProt Consortium, T. U. UniProt Tools. *Curr. Protoc. Bioinforma.* **53**, 1.29.1-15 (2016).
374. The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **45**, D158–D169 (2017).
375. Pundir, S., Martin, M. J. & O'Donovan, C. UniProt Protein Knowledgebase. *Methods Mol. Biol.* **1558**, 41–55 (2017).

376. Cameron, C. M. *et al.* Gene Expression Analysis of Host Innate Immune Responses during Lethal H5N1 Infection in Ferrets †. *J. Virol.* **82**, 11308–11317 (2008).
377. Apweiler, R. *et al.* UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **32**, D115–9 (2004).
378. Sboner, A., Mu, X., Greenbaum, D., Auerbach, R. K. & Gerstein, M. B. The real cost of sequencing: higher than you think! *Genome Biol.* **12**, 125 (2011).
379. Knudsen, M. & Wiuf, C. The CATH database. *Hum. Genomics* **4**, 207–12 (2010).
380. Dawson, N. L. *et al.* CATH: an expanded resource to predict protein function through structure and sequence. *Nucleic Acids Res.* **45**, D289–D295 (2017).
381. Sigrist, C. J. A. *et al.* PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. *Nucleic Acids Res.* **38**, D161–6 (2010).
382. Hulo, N. *et al.* The PROSITE database. *Nucleic Acids Res.* **34**, D227 (2006).
383. Servant, F. *et al.* ProDom: automated clustering of homologous domains. *Brief. Bioinform.* **3**, 246–51 (2002).
384. Corpet, F., Gouzy, J. & Kahn, D. The ProDom database of protein domain families. *Nucleic Acids Res.* **26**, 323–6 (1998).
385. Renxiao Wang, Xueliang Fang, Yipin Lu, and & Wang\*, S. The PDBbind Database: Collection of Binding Affinities for Protein–Ligand Complexes with Known Three-Dimensional Structures. (2004). doi:10.1021/JM030580L
386. Wishart, D. S. *et al.* DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res.* **34**, D668–72 (2006).
387. Gaulton, A. *et al.* The ChEMBL database in 2017. *Nucleic Acids Res.* **45**, D945–D954 (2017).
388. Novick, P. A., Ortiz, O. F., Poelman, J., Abdulhay, A. Y. & Pande, V. S. SWEETLEAD: an in silico database of approved drugs, regulated chemicals, and herbal isolates for computer-aided drug discovery. *PLoS One* **8**, e79568 (2013).
389. Sterling, T. & Irwin, J. J. ZINC 15--Ligand Discovery for Everyone. *J. Chem. Inf. Model.* **55**, 2324–37 (2015).
390. Oughtred, R. *et al.* The BioGRID interaction database: 2019 update. *Nucleic Acids Res.* **47**, D529 (2019).
391. Wang, C. *et al.* PDID: Database of molecular-level putative protein-drug interactions in the structural human proteome. *Bioinformatics* **32**, 579–586 (2016).
392. Kuhn, M., von Mering, C., Campillos, M., Jensen, L. J. & Bork, P. STITCH: interaction networks of chemicals and proteins. *Nucleic Acids Res.* **36**, D684–8 (2008).
393. Ursu, O. *et al.* DrugCentral: Online drug compendium. *Nucleic Acids Res.* **45**, D932–D939 (2017).
394. Taboureau, O. *et al.* ChemProt: A disease chemical biology database. *Nucleic Acids Res.* **39**,

- (2011).
395. Davis, A. P. *et al.* Comparative Toxicogenomics Database: A knowledgebase and discovery tool for chemical-gene-disease networks. *Nucleic Acids Res.* **37**, (2009).
  396. Kim, S. *et al.* PubChem substance and compound databases. *Nucleic Acids Res.* **44**, D1202–D1213 (2016).
  397. Griffith, M. *et al.* DGIdb: Mining the druggable genome. *Nat. Methods* **10**, 1209–1210 (2013).
  398. Kuhn, M., von Mering, C., Campillos, M., Jensen, L. J. & Bork, P. STITCH: Interaction networks of chemicals and proteins. *Nucleic Acids Res.* **36**, 684–688 (2008).
  399. Zhang, Y. S. *et al.* [The BIG Data Center’s database resources]. *Yi chuan = Hered.* **40**, 1039–1043 (2018).
  400. Brunak, S. *et al.* Nucleotide Sequence Database Policies. *Science (80-. )*. **298**, 1333b – 1333 (2002).
  401. Fabregat, A. *et al.* The Reactome Pathway Knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **46**, D649–D655 (2018).
  402. The Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Res.* **47**, D330–D338 (2019).
  403. Ashburner, M. *et al.* Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* **25**, 25–9 (2000).
  404. Romero, P. *et al.* Computational prediction of human metabolic pathways from the complete human genome. *Genome Biol.* **6**, R2 (2004).
  405. Caspi, R. *et al.* The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes. *Nucleic Acids Res.* **46**, D633–D639 (2018).
  406. Carbon, S. *et al.* AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics* **25**, 288–9 (2009).
  407. Mi, H. *et al.* PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Res.* **45**, D183–D189 (2017).
  408. Day-Richter, J., Harris, M. A., Haendel, M. & Lewis, S. OBO-Edit an ontology editor for biologists. *Bioinformatics* **23**, 2198–2200 (2007).
  409. Drăghici, S., Khatri, P., Martins, R. P., Ostermeier, G. C. & Krawetz, S. A. Global functional profiling of gene expression. *Genomics* **81**, 98–104 (2003).
  410. Curtis, R. K., Orešič, M. & Vidal-Puig, A. Pathways to the analysis of microarray data. *Trends Biotechnol.* **23**, 429–435 (2005).
  411. Ashburner, M. *et al.* Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* **25**, 25–29 (2000).
  412. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large

- gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **4**, 44–57 (2009).
413. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* (2009). doi:10.1093/nar/gkn923
414. Beissbarth, T. & Speed, T. P. Gostat: find statistically overrepresented Gene Ontologies within a group of genes. *Bioinformatics* **20**, 1464–1465 (2004).
415. Maere, S., Heymans, K. & Kuiper, M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks. *Bioinformatics* **21**, 3448–3449 (2005).
416. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 15545–15550 (2005).
417. Grossmann, S., Bauer, S., Robinson, P. N. & Vingron, M. Improved detection of overrepresentation of Gene-Ontology annotations with parent child analysis. *Bioinformatics* **23**, 3024–3031 (2007).
418. Alexa, A., Rahnenfuhrer, J. & Lengauer, T. Improved scoring of functional groups from gene expression data by decorrelating GO graph structure. *Bioinformatics* **22**, 1600–1607 (2006).
419. Dennis, G. *et al.* DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* **4**, P3 (2003).
420. Khatri, P. & Draghici, S. Ontological analysis of gene expression data: current tools, limitations, and open problems. *Bioinformatics* **21**, 3587–3595 (2005).
421. Ji, Z. L. *et al.* Drug Adverse Reaction Target Database (DART). *Drug Saf.* **26**, 685–690 (2003).
422. Huang, L.-H. *et al.* ADReCS-Target: target profiles for aiding drug safety research and application. *Nucleic Acids Res.* **46**, D911–D917 (2018).
423. Cami, A., Arnold, A., Manzi, S. & Reis, B. Predicting adverse drug events using pharmacological network models. *Sci. Transl. Med.* **3**, 114ra127 (2011).
424. Kuhn, M., Letunic, I., Jensen, L. J. & Bork, P. The SIDER database of drugs and side effects. *Nucleic Acids Res.* **44**, D1075–9 (2016).
425. Avery, O. T., Macleod, C. M. & McCarty, M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types : induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.* **79**, 137–58 (1944).
426. WATSON, J. D. & CRICK, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **171**, 737–738 (1953).
427. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5463–5467 (1977).
428. Sanger, F. & Coulson, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed

- synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **94**, (1975).
429. Brachet, J. The localization and the role of ribonucleic acid in the cell. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **50**, 861–869 (1950).
430. Jacob, F. & Monod, J. Genes of structure and genes of regulation in the biosynthesis of proteins. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **249**, 1282–4 (1959).
431. Lockhart, D. J. & Winzler, E. A. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* **405**, 827–836 (2000).
432. ENCODE Project Consortium, T. E. P. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* **489**, 57–74 (2012).
433. Davis, C. A. *et al.* The Encyclopedia of DNA elements (ENCODE): data portal update. *Nucleic Acids Res.* **46**, D794–D801 (2018).
434. Jacquier, A. The complex eukaryotic transcriptome: unexpected pervasive transcription and novel small RNAs. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 833–844 (2009).
435. Byron, S. A., Van Keuren-Jensen, K. R., Engelthaler, D. M., Carpten, J. D. & Craig, D. W. Translating RNA sequencing into clinical diagnostics: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Genet.* **17**, 257–271 (2016).
436. San Segundo-Val, I. & Sanz-Lozano, C. S. Introduction to the Gene Expression Analysis. in 29–43 (2016). doi:10.1007/978-1-4939-3652-6\_3
437. Saiki, R. K. *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350–4 (1985).
438. Adams, M. D. *et al.* Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* **252**, 1651–6 (1991).
439. Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Serial analysis of gene expression. *Science* **270**, 484–7 (1995).
440. Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. & Brown, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467–70 (1995).
441. Christie, J. D. Microarrays. *Crit. Care Med.* **33**, S449-52 (2005).
442. Katagiri, F. & Glazebrook, J. Overview of mRNA Expression Profiling Using DNA Microarrays. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **85**, 22.4.1-22.4.13 (2009).
443. Gabert, J. *et al.* Standardization and quality control studies of ‘real-time’ quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program. *Leukemia* **17**, 2318–2357 (2003).
444. Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. & Williams, P. M. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6**, 986–94 (1996).
445. Metzker, M. L. Sequencing technologies — the next generation. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 31–46 (2010).

446. Morey, M. *et al.* A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. *Mol. Genet. Metab.* **110**, 3–24 (2013).
447. Wold, B. & Myers, R. M. Sequence census methods for functional genomics. *Nat. Methods* **5**, 19–21 (2008).
448. Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* **10**, 57–63 (2009).
449. Margulies, M. *et al.* Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**, 376–380 (2005).
450. van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y. & Thermes, C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet.* **30**, 418–426 (2014).
451. Wilhelm, B. T. & Landry, J.-R. RNA-Seq—quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing. *Methods* **48**, 249–257 (2009).
452. Costa, V., Angelini, C., De Feis, I. & Ciccodicola, A. Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-Seq. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 853916 (2010).
453. Conesa, A. *et al.* A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol.* **17**, 1–19 (2016).
454. Casamassimi, A., Federico, A., Rienzo, M., Esposito, S. & Ciccodicola, A. Transcriptome Profiling in Human Diseases: New Advances and Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
455. Tang, B. M. P., McLean, A. S., Dawes, I. W., Huang, S. J. & Lin, R. C. Y. Gene-expression profiling of peripheral blood mononuclear cells in sepsis. *Crit. Care Med.* **37**, 882–888 (2009).
456. Sutherland, A. *et al.* Development and validation of a novel molecular biomarker diagnostic test for the early detection of sepsis. *Crit. Care* **15**, (2011).
457. Bos, L. D. J., de Jong, M. D., Sterk, P. J. & Schultz, M. J. How integration of global omics-data could help preparing for pandemics - a scent of influenza. *Front. Genet.* **5**, 80 (2014).
458. Cox, F. E. G. History of human parasitology. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 595–612 (2002).
459. Burel, J. G. *et al.* Host Transcriptomics as a Tool to Identify Diagnostic and Mechanistic Immune Signatures of Tuberculosis. *Front. Immunol.* **10**, 221 (2019).
460. Berry, M. P. R. *et al.* An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature* **466**, 973–7 (2010).
461. Maertzdorf, J. *et al.* Concise gene signature for point-of-care classification of tuberculosis. *EMBO Mol. Med.* **8**, 86–95 (2016).
462. Sweeney, T. E., Braviak, L., Tato, C. M. & Khatri, P. Genome-wide expression for diagnosis of pulmonary tuberculosis: a multicohort analysis. *Lancet. Respir. Med.* **4**, 213–24 (2016).
463. Bloom, C. I. *et al.* Transcriptional blood signatures distinguish pulmonary tuberculosis, pulmonary sarcoidosis, pneumonias and lung cancers. *PLoS One* **8**, e70630 (2013).
464. Maertzdorf, J. *et al.* Common patterns and disease-related signatures in tuberculosis and

- sarcoidosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 7853–8 (2012).
465. Roe, J. K. *et al.* Blood transcriptomic diagnosis of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis. *JCI insight* **1**, e87238 (2016).
466. Verhagen, L. M. *et al.* A predictive signature gene set for discriminating active from latent tuberculosis in Warao Amerindian children. *BMC Genomics* **14**, 74 (2013).
467. Zak, D. E. *et al.* A blood RNA signature for tuberculosis disease risk: a prospective cohort study. *Lancet (London, England)* **387**, 2312–2322 (2016).
468. Zaas, A. K. *et al.* Gene Expression Signatures Diagnose Influenza and Other Symptomatic Respiratory Viral Infection in Humans. *Cell Host Microbe* **6**, 207–217 (2009).
469. Jong, V. L. *et al.* Transcriptome assists prognosis of disease severity in respiratory syncytial virus infected infants. *Nat. Publ. Gr.* (2016). doi:10.1038/srep36603
470. Petitprez, F. *et al.* Transcriptomic analysis of the tumor microenvironment to guide prognosis and immunotherapies. *Cancer Immunol. Immunother.* **67**, 981–988 (2018).
471. Martínez-Romero, J., Bueno-Fortes, S., Martín-Merino, M., Molina, A. R. de & Rivas, J. D. Las. Survival marker genes of colorectal cancer derived from consistent transcriptomic profiling. *BMC Genomics* **19**, (2018).
472. Zhang, W., Edwards, A., Fang, Z., Flemington, E. K. & Zhang, K. Integrative Genomics and Transcriptomics Analysis Reveals Potential Mechanisms for Favorable Prognosis of Patients with HPV-Positive Head and Neck Carcinomas. *Sci. Rep.* **6**, 24927 (2016).
473. Martínez-Canales, S. *et al.* Transcriptomic immunologic signature associated with favorable clinical outcome in basal-like breast tumors. *PLoS One* **12**, e0175128 (2017).
474. Vasquez-Canizares, N., Wahezi, D. & Putterman, C. Diagnostic and prognostic tests in systemic lupus erythematosus. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **31**, 351–363 (2017).
475. Aran, D. *et al.* Reference-based analysis of lung single-cell sequencing reveals a transitional profibrotic macrophage. *Nat. Immunol.* **20**, 163–172 (2019).
476. Chambers, D. C., Carew, A. M., Lukowski, S. W. & Powell, J. E. Transcriptomics and single-cell RNA-sequencing. *Respirology* **24**, 29–36 (2019).
477. Qu, X. A., Freudenberg, J. M., Sanseau, P. & Rajpal, D. K. Integrative clinical transcriptomics analyses for new therapeutic intervention strategies: a psoriasis case study. *Drug Discov. Today* **19**, 1364–1371 (2014).
478. Lee, K.-H., Lo, H.-L., Tang, W.-C., Hsiao, H. H. & Yang, P.-M. A gene expression signature-based approach reveals the mechanisms of action of the Chinese herbal medicine berberine. *Sci. Rep.* **4**, 6394 (2014).
479. Lamb, J. *et al.* The Connectivity Map: Using Gene-Expression Signatures to Connect Small Molecules, Genes, and Disease. *Science (80-. )*. **313**, 1929–1935 (2006).
480. Pizzorno, A. *et al.* Repurposing of Drugs as Novel Influenza Inhibitors From Clinical Gene

- Expression Infection Signatures. *Front. Immunol.* **10**, 60 (2019).
481. Wagner, A. *et al.* Drugs that reverse disease transcriptomic signatures are more effective in a mouse model of dyslipidemia. *Mol. Syst. Biol.* **11**, 791 (2015).
482. Sirota, M. *et al.* Discovery and preclinical validation of drug indications using compendia of public gene expression data. *Sci. Transl. Med.* **3**, 96ra77 (2011).
483. Josset, L. *et al.* Gene expression signature-based screening identifies new broadly effective influenza A antivirals. *PLoS One* **5**, (2010).
484. Zerbin, L. F. *et al.* Computational repositioning and preclinical validation of pentamidine for renal cell cancer. *Mol. Cancer Ther.* **13**, 1929–1941 (2014).
485. Jahchan, N. S. *et al.* A drug repositioning approach identifies tricyclic antidepressants as inhibitors of small cell lung cancer and other neuroendocrine tumors. *Cancer Discov.* **3**, 1364–77 (2013).
486. Chang, M., Smith, S., Thorpe, A., Barratt, M. J. & Karim, F. Evaluation of phenoxybenzamine in the CFA model of pain following gene expression studies and connectivity mapping. *Mol. Pain* **6**, 56 (2010).
487. Crockett, S. D., Schectman, R., Stürmer, T. & Kappelman, M. D. Topiramate use does not reduce flares of inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* **59**, 1535–43 (2014).
488. van der Vries, E., Schutten, M., Fraaij, P., Boucher, C. & Osterhaus, A. Influenza Virus Resistance to Antiviral Therapy. in *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)* **67**, 217–246 (2013).
489. Irwin, K. K., Renzette, N., Kowalik, T. F. & Jensen, J. D. Antiviral drug resistance as an adaptive process. *Virus Evol.* **2**, (2016).
490. Irwin, K. K., Renzette, N., Kowalik, T. F. & Jensen, J. D. Antiviral drug resistance as an adaptive process. *Virus Evol.* **2**, vew014 (2016).
491. Li, T. C. M., Chan, M. C. W. & Lee, N. Clinical Implications of Antiviral Resistance in Influenza. (2015). doi:10.3390/v7092850
492. Menéndez-Arias, L. Molecular basis of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance: Overview and recent developments. *Antiviral Research* (2013). doi:10.1016/j.antiviral.2013.01.007
493. Rao, P. K. S. CCR5 inhibitors: Emerging promising HIV therapeutic strategy. *Indian J. Sex. Transm. Dis. AIDS* **30**, 1–9 (2009).
494. Takaoka, A. *et al.* Integration of interferon- $\alpha/\beta$  signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature* **424**, 516–523 (2003).
495. Ehrhardt, C. *et al.* Interplay between influenza A virus and the innate immune signaling. *Microbes Infect.* **12**, 81–87 (2010).
496. Staples, K. J. *et al.* Viral Infection of Human Lung Macrophages Increases PDL1 Expression via

- IFN $\beta$ . (2015). doi:10.1371/journal.pone.0121527
497. Lamb, J. The Connectivity Map: a new tool for biomedical research.
498. Gilbert, B. E. & McLeay, M. T. MegaRibavirin aerosol for the treatment of influenza A virus infections in mice. *Antiviral Res.* **78**, 223–229 (2008).
499. Josset, L. *et al.* Gene expression signature-based screening identifies new broadly effective influenza A antivirals. *PLoS One* **5**, (2010).
500. McClellan, K. J., Wiseman, L. R. & Wilde, M. I. Midodrine. A review of its therapeutic use in the management of orthostatic hypotension. *Drugs Aging* **12**, 76–86 (1998).
501. Rosa-Calatrava, M., Terrier, O., Textoris, J., Boivin, G. & Pizzorno, M. Nouvelles compositions antivirales pour le traitement de la grippe. (2016). Available at: <https://bases-brevets.inpi.fr/en/document-en/FR3033701.html?s=1580111721470&p=5&cHash=7f0806686783279e39df21f9336c2ec2>. (Accessed: 27th January 2020)
502. Rosa-Calatrava, M., Terrier, O., Nicolas de Lamballerie, C., Boivin, G. & Pizzorno, M. A. Diltiazem pour son utilisation dans le traitement des infections microbiennes. (2019). Available at: <https://bases-brevets.inpi.fr/en/document-en/FR3081325.html?s=1580110834129&p=5&cHash=319eb8972f691714f2f0f02a0e324ff8>. (Accessed: 27th January 2020)
503. Escuret, V. *et al.* Oseltamivir-zanamivir bitherapy compared to oseltamivir monotherapy in the treatment of pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus infections. *Antiviral Res.* **96**, 130–7 (2012).
504. Degletagne, C. *et al.* Transcriptome analysis in non-model species: a new method for the analysis of heterologous hybridization on microarrays. *BMC Genomics* **11**, 344 (2010).
505. Alonso, F. V. & Compans, R. W. Differential effect of monensin on enveloped viruses that form at distinct plasma membrane domains. *J. Cell Biol.* **89**, 700–705 (1981).
506. Edwardson, J. M. Effects of monensin on the processing and intracellular transport of influenza virus haemagglutinin in infected MDCK cells | Journal of Cell Science. (1984).
507. Bron, R., Kendal, A. P., Klenk, H. D. & Wilschut, J. Role of the m2 protein in influenza virus membrane fusion: Effects of amantadine and monensin on fusion kinetics. *Virology* **195**, 808–811 (1993).
508. Fujioka, Y. *et al.* A Ca<sup>2+</sup>-dependent signalling circuit regulates influenza A virus internalization and infection. *Nat. Commun.* **4**, 2763 (2013).
509. Fujioka, Y. *et al.* A Sialylated Voltage-Dependent Ca<sup>2+</sup> Channel Binds Hemagglutinin and Mediates Influenza A Virus Entry into Mammalian Cells. *Cell Host Microbe* **23**, 809-818.e5 (2018).
510. Shabihkhani, M. *et al.* The procurement, storage, and quality assurance of frozen blood and

- tissue biospecimens in pathology, biorepository, and biobank settings. *Clin Biochem* **47**, 258–266 (2014).
511. Degletagne C, Keime C, Rey B, de Dinechin M, Forcheron F, Chuchana P, Jouventin P, Gautier C, D. C. Transcriptome analysis in non-model species: a new method for the analysis of heterologous hybridization on microarrays. *BMC Genomics* **11**, 344 (2010).
512. Khaznadar, Z. *et al.* Defective NK Cells in Acute Myeloid Leukemia Patients at Diagnosis Are Associated with Blast Transcriptional Signatures of Immune Evasion. *J. Immunol.* **195**, 2580–2590 (2015).
513. Durr, F. E. & Lindh, H. F. Efficacy of ribavirin against influenza virus in tissue culture and in mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **255**, 366–71 (1975).
514. Alonso, P. V & Compans, R. W. *Differential Effect of Monensin on Enveloped Viruses that Form at Distinct Plasma Membrane Domains.* (1981).
515. Pushpakom, S. *et al.* Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat. Rev. Drug Discov.* **18**, 41–58 (2018).
516. PhRMA. Biopharmaceuticals in Perspective. *PhRMA* 1–172 (2019).
517. MucilAir™: A unique 3D Human Airway Epithelia reconstituted in vitro. Available at: <http://www.epithelix.com/products/mucilair>. (Accessed: 20th January 2020)
518. Chen, S., Einspanier, R. & Schoen, J. Transepithelial electrical resistance (TEER): a functional parameter to monitor the quality of oviduct epithelial cells cultured on filter supports. *Histochem. Cell Biol.* **144**, 509–515 (2015).
519. Kimura, H., Yoshizumi, M., Ishii, H., Oishi, K. & Ryo, A. Cytokine production and signaling pathways in respiratory virus infection. *Front. Microbiol.* **4**, 276 (2013).
520. Hoffmann, J. *et al.* Viral and bacterial co-infection in severe pneumonia triggers innate immune responses and specifically enhances IP-10: A translational study. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
521. Bermejo-Martin, J. F. *et al.* Predominance of Th2 cytokines, CXC chemokines and innate immunity mediators at the mucosal level during severe respiratory syncytial virus infection in children. *Eur. Cytokine Netw.* **18**, 162–7 (2007).
522. Reus, A. A. *et al.* Feasibility of a 3D human airway epithelial model to study respiratory absorption. *Toxicol. Vitro.* **28**, 258–264 (2014).
523. Boda, B. *et al.* Antiviral drug screening by assessing epithelial functions and innate immune responses in human 3D airway epithelium model. *Antiviral Res.* **156**, 72–79 (2018).
524. Galani, I. E. *et al.* Interferon- $\lambda$  Mediates Non-redundant Front-Line Antiviral Protection against Influenza Virus Infection without Compromising Host Fitness. *Immunity* **46**, 875-890.e6 (2017).
525. Schneider, W. M., Chevillotte, M. D. & Rice, C. M. Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 513–545 (2014).

526. Sachs, N. *et al.* Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *EMBO J.* **38**, e100300 (2019).
527. Artzy-Schnirman, A. *et al.* Advanced in vitro lung-on-chip platforms for inhalation assays: From prospect to pipeline. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **144**, 11–17 (2019).
528. Chin, J., Magoffin, R. L., Shearer, L. A., Schieble, J. H. & Lennette, E. H. Field evaluation of a respiratory syncytial virus vaccine and a trivalent parainfluenza virus vaccine in a pediatric population. *Am. J. Epidemiol.* **89**, 449–463 (1969).
529. Durbin, J. E. *et al.* The role of IFN in respiratory syncytial virus pathogenesis. *J. Immunol.* **168**, 2944–52 (2002).
530. Dupinay, T. *et al.* Next-generation sequencing of ultra-low copy samples : from clinical FFPE samples to single-cell sequencing. *Curr. Top. Virol.* **10**, 63–83 (2012).
531. Irizarry, R. A. *et al.* Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**, 249–264 (2003).
532. Sboner, A. *et al.* Robust-Linear-Model Normalization To Reduce Technical Variability in Functional Protein Microarrays. *J. Proteome Res.* **8**, 5451–5464 (2009).
533. Li, C. & Wong, W. H. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: Expression index computation and outlier detection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 31–36 (2001).
534. Lazaridis, E. N., Sinibaldi, D., Bloom, G., Mane, S. & Jove, R. A simple method to improve probe set estimates from oligonucleotide arrays. *Math. Biosci.* **176**, 53–58 (2002).
535. McNamara, P. S., Flanagan, B. F., Hart, C. A. & Smyth, R. L. Production of Chemokines in the Lungs of Infants with Severe Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis. *J. Infect. Dis.* **191**, 1225–1232 (2005).
536. Ioannidis, I. *et al.* Plasticity and Virus Specificity of the Airway Epithelial Cell Immune Response during Respiratory Virus Infection. *J. Virol.* **86**, 5422–5436 (2012).
537. Brand, H. K. *et al.* Olfactomedin 4 serves as a marker for disease severity in pediatric respiratory syncytial virus (RSV) infection. *PLoS One* **10**, (2015).
538. Pennings, J. L. A. *et al.* Systemic Signature of the Lung Response to Respiratory Syncytial Virus Infection. *PLoS One* **6**, e21461 (2011).