HAL
open science

Etude des mécanismes d'export des ribonucléocapsides du Virus Respiratoire Syncytial

Gina Cosentino

To cite this version:

Gina Cosentino. Etude des mécanismes d'export des ribonucléocapsides du Virus Respiratoire Syncytial. Virologie. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASL023 . tel-03648525

HAL Id: tel-03648525

https://theses.hal.science/tel-03648525v1

Submitted on 21 Apr 2022

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.

université PARIS-SACLAY

Etude des mécanismes d'export des ribonucléocapsides du Virus Respiratoire Syncytial

Study of the export mechanisms of respiratory syncytial virus ribonucleocapsids

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 577, Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)
Spécialité de doctorat : Science de la vie et de la santé
Graduate School : Life Sciences and Health. Référent : Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Infection et Inflammation** (Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm), sous la direction de **Marie-Anne RAMEIX-WELTI**, MD-PhD, la co-direction de **Elyanne GAULT**, MD-PhD

Thèse soutenue à Montigny-le-Bretonneux, le 31 mars 2022, par

Gina COSENTINO

Composition du Jury

Cédric DELEVOYE DR PhD, CNRS Université Pierre et Marie Curie, Paris	Président
Raphaël GAUDIN CR PhD, CNRS Université Montpellier	Rapporteur & Examinateur
Sandie MUNIER MCF PhD, Institut Pasteur	Rapportrice & Examinatrice
Marie GALLOUX DR PhD, INRAE, Université Paris-Saclay	Examinatrice
Marie-Anne RAMEIX-WELTI PU-PH, ATIP-Avenir U1173 UVSQ	Directrice de thèse

THESE DE DOCTORAT

NNT : 2022UPASL023

ÉCOLE DOCTORALE
Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)

université PARIS-SACLAY

Titre : Etude des mécanismes d'export des ribonucléocapsides du Virus Respiratoire Syncytial

Mots clés : Virus Respiratoire Syncytial ; Ribonucléoprotéine ; Rab11 ; Endosome de recyclage

Principal agent de la bronchiolite du nourrisson, le virus respiratoire syncytial (RSV) est responsable d'infections respiratoires sévères chez les enfants mais aussi chez les sujets âgés ou fragilisés. En dépit de son importance en santé publique, il n'existe à ce jour aucun vaccin ni traitement antiviral curatif contre le RSV. Dans ce contexte, une meilleure connaissance de ses mécanismes de réplication est essentielle pour proposer de nouvelles stratégies antivirales. Le RSV est un virus enveloppé à ARN négatif simple brin dont le cycle de réplication est exclusivement cytoplasmique. Les étapes de synthèse des ARN viraux ont lieu au sein d'inclusions cytoplasmiques appelées corps d'inclusion ou IBs. Lors de la réplication, les génomes néosynthétisés sont encapsidés par les protéines N et associés au complexe polymérase formant ainsi les ribonucléoprotéines virales (RNP). Ces RNPs rejoignent ensuite la membrane plasmique où ont lieu les étapes d'assemblage et de bourgeonnement. Les RNPs sont des objets volumineux qui ne peuvent pas diffuser librement dans le cytoplasme, mais les voies cellulaires impliquées dans leur transport restent inconnues à ce jour. Pour étudier le trafic des RNPs néosynthétisées, nous avons produit un virus recombinant exprimant une N fluorescente ce qui permet de visualiser pour la première fois les RNPs dans des cellules vivantes et d'analyser leurs trajectoires. Une majorité des RNPs présentent des mouvements de type brownien mais d'autres sont animés de mouvements rectilignes et rapides de l'ordre de 2 µm/s évoquant un transport sur les microtubules. Nous avons en effet visualisé les mouvements des RNPs sur les microtubules marqués. La dépolymérisation des microtubules entraine un arrêt total des mouvements rapides des RNPs confirmant leur implication dans ces transports. De plus, lors de ces mouvements rapides les RNPs sont associées à Rab11, un marqueur de l'endosome de recyclage. L'observation des mouvements des RNPs et des vésicules Rab11 positives montrent en effet des RNPs animées de mouvement rapides qui semblent tirées par Rab11. La vitesse des RNPs et la distance qu'elles parcourent sont diminuées lors de l'inhibition transitoire de l'expression de Rab11a. Enfin des expériences d'immunoprécipitation mettent en évidence une interaction entre Rab11a et les RNPs. En conclusion, nos résultats démontrent que les RNPs du RSV utilisent les microtubules pour se déplacer en détournant la voie de recyclage des endosomes.

Title : Study of the export mechanisms of Respiratory Syncytial Virus ribonucleocapsids

Keywords : Respiratory Syncytial Virus ; Ribonucleoprotein ; Rab11 ; Recycling Endosome

Respiratory syncytial virus (RSV) is the main agent of infant bronchiolitis and is responsible for severe respiratory infections for children, but also for elderly or frail subjects. Despite its importance in public health, there is currently no vaccine or curative antiviral treatment against RSV. In this context, a better understanding of its replication mechanisms is essential to propose new antiviral strategies. RSV is an enveloped single-stranded negative RNA virus with an exclusively cytoplasmic replication cycle. The synthesis steps of viral RNAs take place within cytoplasmic inclusions called inclusion bodies or IBs. During replication, the neosynthesized genomes are encapsidated by N proteins and associated with the polymerase complex forming viral ribonucleoproteins (RNPs). These RNPs then reach the plasma membrane where the assembly and budding steps take place. RNPs are bulky objects that cannot freely diffuse into the cytoplasm, but the cellular pathways involved in their transport remain unknown to date. To study the trafficking of neosynthesized RNPs, we produced a recombinant virus expressing a fluorescent N, which allows us to visualize for the first time RNPs in living cells and to analyze their trajectories. A majority of RNPs show Brownian-like movements but others are animated by rectilinear and fast movements of the order of 2 µm/s evoking a transport on microtubules. We have indeed visualized the movements of RNPs on labeled microtubules. The depolymerization of microtubules leads to a total stop of the fast movements of RNPs confirming their involvement in these transports. Moreover, during these rapid movements, RNPs are associated with Rab11, a marker of the recycling endosome. The observation of RNPs movements and Rab11 positive vesicles show indeed RNPs animated by fast movements which seem to be pulled by Rab11. The speed of RNPs and the distance they travel at are decreased upon transient inhibition of Rab11a expression. Finally, immunoprecipitation experiments show an interaction between Rab11a and RNPs. In conclusion, our results demonstrate that RSV RNPs use microtubules to move by hijacking the endosome recycling pathway.

ÉCOLE DOCTORALE
Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)

université PARIS-SACLAY

Titre : Etude des mécanismes d'export des ribonucléocapsides du Virus Respiratoire Syncytial

Mots clés : Virus Respiratoire Syncytial ; Ribonucléoprotéine ; Rab11 ; Endosome de recyclage

Principal agent de la bronchiolite du nourrisson, le virus respiratoire syncytial (RSV) est responsable d'infections respiratoires sévères chez les enfants mais aussi chez les sujets âgés ou fragilisés. En dépit de son importance en santé publique, il n'existe à ce jour aucun vaccin ni traitement antiviral curatif contre le RSV. Dans ce contexte, une meilleure connaissance de ses mécanismes de réplication est essentielle pour proposer de nouvelles stratégies antivirales. Le RSV est un virus enveloppé à ARN négatif simple brin dont le cycle de réplication est exclusivement cytoplasmique. Les étapes de synthèse des ARN viraux ont lieu au sein d'inclusions cytoplasmiques appelées corps d'inclusion ou IBs. Lors de la réplication, les génomes néosynthétisés sont encapsidés par les protéines N et associés au complexe polymérase formant ainsi les ribonucléoprotéines virales (RNP). Ces RNPs rejoignent ensuite la membrane plasmique où ont lieu les étapes d'assemblage et de bourgeonnement. Les RNPs sont des objets volumineux qui ne peuvent pas diffuser librement dans le cytoplasme, mais les voies cellulaires impliquées dans leur transport restent inconnues à ce jour. Pour étudier le trafic des RNPs néosynthétisées, nous avons produit un virus recombinant exprimant une N fluorescente ce qui permet de visualiser pour la première fois les RNPs dans des cellules vivantes et d'analyser leurs trajectoires. Une majorité des RNPs présentent des mouvements de type brownien mais d'autres sont animés de mouvements rectilignes et rapides de l'ordre de 2 µm/s évoquant un transport sur les microtubules. Nous avons en effet visualisé les mouvements des RNPs sur les microtubules marqués. La dépolymérisation des microtubules entraine un arrêt total des mouvements rapides des RNPs confirmant leur implication dans ces transports. De plus, lors de ces mouvements rapides les RNPs sont associées à Rab11, un marqueur de l'endosome de recyclage. L'observation des mouvements des RNPs et des vésicules Rab11 positives montrent en effet des RNPs animées de mouvement rapides qui semblent tirées par Rab11. La vitesse des RNPs et la distance qu'elles parcourent sont diminuées lors de l'inhibition transitoire de l'expression de Rab11a. Enfin des expériences d'immunoprécipitation mettent en évidence une interaction entre Rab11a et les RNPs. En conclusion, nos résultats démontrent que les RNPs du RSV utilisent les microtubules pour se déplacer en détournant la voie de recyclage des endosomes.

Title : Study of the export mechanisms of Respiratory Syncytial Virus ribonucleocapsids

Keywords : Respiratory Syncytial Virus ; Ribonucleoprotein ; Rab11 ; Recycling Endosome

Respiratory syncytial virus (RSV) is the main agent of infant bronchiolitis and is responsible for severe respiratory infections for children, but also for elderly or frail subjects. Despite its importance in public health, there is currently no vaccine or curative antiviral treatment against RSV. In this context, a better understanding of its replication mechanisms is essential to propose new antiviral strategies. RSV is an enveloped single-stranded negative RNA virus with an exclusively cytoplasmic replication cycle. The synthesis steps of viral RNAs take place within cytoplasmic inclusions called inclusion bodies or IBs. During replication, the neosynthesized genomes are encapsidated by N proteins and associated with the polymerase complex forming viral ribonucleoproteins (RNPs). These RNPs then reach the plasma membrane where the assembly and budding steps take place. RNPs are bulky objects that cannot freely diffuse into the cytoplasm, but the cellular pathways involved in their transport remain unknown to date. To study the trafficking of neosynthesized RNPs, we produced a recombinant virus expressing a fluorescent N, which allows us to visualize for the first time RNPs in living cells and to analyze their trajectories. A majority of RNPs show Brownian-like movements but others are animated by rectilinear and fast movements of the order of 2 µm/s evoking a transport on microtubules. We have indeed visualized the movements of RNPs on labeled microtubules. The depolymerization of microtubules leads to a total stop of the fast movements of RNPs confirming their involvement in these transports. Moreover, during these rapid movements, RNPs are associated with Rab11, a marker of the recycling endosome. The observation of RNPs movements and Rab11 positive vesicles show indeed RNPs animated by fast movements which seem to be pulled by Rab11. The speed of RNPs and the distance they travel at are decreased upon transient inhibition of Rab11a expression. Finally, immunoprecipitation experiments show an interaction between Rab11a and RNPs. In conclusion, our results demonstrate that RSV RNPs use microtubules to move by hijacking the endosome recycling pathway.

Remerciements

Je tiens à remercier le Dr Sandie Munier et le Dr Raphaël Gaudin pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse ainsi que le Dr Marie Galloux et le Dr Cédric Delevoye d'avoir accepté de juger mes travaux.

Un grand merci à mes directrices de thèse. A Marie-Anne Rameix-Welti qui m'a soutenue et supportée durant toutes ces années. Qui a eu confiance en moi et m'a poussée lorsque je faisais ma « tête de mule ». Et surtout d'avoir eu le courage de lire et relire mes fautes, je sais qu'elles ont dues te donner de nombreuses migraines. A Elyanne Gault, de m'avoir aidé dans ma reprise d'études et soutenue jusqu'à la fin de ma thèse.

Merci à Françoise Lamy qui a accepté mon dossier pour reprendre mes études à l'université de Versailles Saint Quentin. A Marie Galloux, Cédric Delevoye et Nadia Naffakh pour leurs conseils scientifiques et techniques durant mes comités de thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement Jean-Louis Herrmann qui m'a accueilli dans son équipe et avec qui les discussions scientifiques prenaient une allure gaufrée (au chocolat).

Une pensée à tous les enseignants, chercheurs, doctorants, ingénieurs et techniciens avec qui j'ai échangé et partagé des moments précieux. Un remerciement particulier à Marion Lagune avec qui la prise de poids avançait plus rapidement que l'écriture de la thèse, dans les bons et dans les mauvais moments. A Elodie Lamy pour qui le meilleur de soi n'est jamais suffisant et que l'on peut se pousser (courir) toujours plus loin et plus vite, merci de nous avoir nourri. A Hamadoun Touré (Doudoune) pour ses longues discussions sur nos vies démoniaques et qui fait de nous des petits anges. A Katherine Marougka pour sa sagesse et ses conseils, tu as toujours été notre voix de raison dans ce bureau des plaintes. A Aurore Desquesnes pour son aide et son soutien que ce soit physiologique ou technique (oui la polymérisation des gels WB et moi ça fait deux). A Florent Le Guern qui a été présent pour m'aider, me rassurer et rigoler, mais que j'ai quand même tué sans pitié sur Among Us. A Cassie Ribeiro avec qui les discussions de bureau se font désormais aux restos pour la plus grande tristesse d'oreilles indiscrètes. A Camille Bouillier de m'avoir appris, formé et conseillé au début de ma thèse. Merci à l'ensemble de l'équipe ATIP-Avenir qui ne va cesser de croître avec Delphine Sitterlin, Jennifer Risso-Ballester, Cyrielle Durand, Cédric Diot et Sabine Blouquit-Laye.

Je souhaite remercier aussi l'équipe IRIS et LGBC. Pour le temps pris par Aude Jobart pour m'aider en microscopie. A Simon Glatigny pour ses discussions aussi scientifiques que gourmandes, heureusement que le vélo nous aide à tenir la ligne. A Hendrick Mambu (plus français qu'un français) pour toutes nos discussions qui partaient en débat planétaire. Evidemment à Bilade, Marie, Marc, Louisa pour nos discussions. A Marion Hoareau pour les moments de yoga, de réunions représentant toujours plus longues et à Juliette Noiron dont les passions pour la science, les quizz et l'escalade n'ont pas d'égal, merci encore pour toute l'aide que ça soit pour la macro ou la mise en page. Merci à toutes les deux pour m'avoir donnée l'occasion d'intervenir dans vos podcasts. Merci aux doctorants du 2ème étages pour ces moments de convivialité.

Je tiens à remercier mes collègues et amis de travail de Biogroup qui ont vécu avec moi toutes ces années études jusqu'à aujourd'hui. Merci à Mathieu Brette qui m'a soutenue dans toutes mes épreuves de la vie, de mes peines de cœurs à mes travaux d'appartement. A Khadija Ouhaïm pour toutes ses crêpes, ses moments de complicité et ses nombreux serveurs. A Mehdi Chekroune pour m'avoir fait confiance et soutenue quand je doutais. Merci à Mathieu Bernard et Jean-Marc Giannoli avec qui la période Covid a été un sujet d'étude passionnant et dont les heures de sommeil manquées ne se sont plus comptées. Merci à Marion Widmer et Sophie Béria pour m'avoir suivie dans mes études et mes projets. A Yanis Bouamara pour nos discussions thèses, musiques et Japon.

A ma famille, mes parents, mes sœurs et ma multitude de neveux et nièces qui rencontraient bien des difficultés à suivre mon rythme de vie, mes décisions, mes travaux, mes études et mon travail. A mes grands-mères Andrée et Rolande parties trop tôt et qui n'ont pu voir l'aboutissement de leur travail, les concombres et les patates rissolées maison étaient de magnifiques carburants. A Mikaël pour avoir été à mes côtés toutes ces années et avoir supporté toutes mes humeurs et mes révisions. Ce fameux bureau de 2m20 sur lequel je ne réussissais à travailler que à 2 cm de toi. A ton tour de performer maintenant…

A mes amis,

A toi,

Table des matières

Liste des abréviations.....8

Chapitre 1. Le Virus Respiratoire Syncytial en santé publique 10

Chapitre 2. Généralités sur le Virus Respiratoire Syncytial.26

1. Composition des virions.....26
1.1. Morphologie des virions et des filaments viraux.....26
1.2. Protéines virales et données structurales.....27
1.2.1. Les glycoprotéines de surface.....29
Glycoprotéine G.....29
Protéine de fusion F.....31
Protéine SH.....32
Protéine de matrice M.....33
1.2.2. Les protéines de la ribonucléoprotéine virale.....34
Nucléoprotéine N.....34
Polymérase L.....35
Phosphoprotéine P.....36
Protéine M2-1.....37
Protéine M2-2.....38
1.2.3. Protéines non structurales.....38
2. Cycle viral.....40
2.1. Entrée virale.....40
2.2. Production protéique et réplication du génome viral.....42
Transcription et réplication.....42
Les Corps d'inclusions (IBs).....42
2.3. Export et bourgeonnement.....44

Chapitre 3. Structures cellulaires impliquées dans le transport et réseau de recyclage des endosomes.....46

1. Cytosquelette cellulaire.....46
1.1. Réseau de microtubules.....46

1.1.1. Généralités 46
1.1.1. Moteurs moléculaires associés aux microtubules 47
1.2. Microfilaments d'actine 50
1.2.1. Généralités 50
1.2.2. Moteurs moléculaires associés aux filaments d'actine 51
1.3. Filament intermédiaire 51
2. Rôles des éléments du cytosquelette dans la multiplication du RSV 52
2.1. Entrée du RSV 53
2.2. Transcription et Réplication 53
2.3. Assemblage et bourgeonnement viral 54
3. Voie de recyclage des endosomes 55
3.1. Les Rab GTPases 55
3.2. Structure de Rab11a 56
3.3. Rôles cellulaires de Rab11 57
Cellules polarisées 58
Homéostasie de la voie endosome-lysosome 58
3.4 Effecteurs moléculaires de Rab11 59
3.5 Moteurs moléculaires associés aux mouvements des vésicules Rab11 60
3.6 Implication de Rab11 et de ses partenaires dans la multiplication du RSV61

Matériels et Méthodes 63

Objectif 70

Résultats 72

1. Développement du RSV recombinant pour caractériser le mouvement intracellulaire des RNP. 72
2. Caractérisation et quantification des mouvements des RNPs du RSV 75
3. Les mouvements rapides des RNPs du RSV dépendent du réseau MT 79
4. Identification des moteurs moléculaires responsables du transport des RNPs 84
5. Rab11 et les RNPs colocalisent dans les cellules infectées. 88
6. La voie Rab11 est impliquée dans les mouvements rapides et dirigés des RNPs 90
7. Validation biochimique de l'association RNP-Rab11a 93

8. Impact de Rab11 sur la production virale 97

9. Construction d'un outil viral pour l'observation de l'infection dans des cellules polarisées 99

Discussion - Perspectives 102

1. Construction d'un virus fluorescent 102

2. Technique d'analyse microscopique et suivi des particules virales 103

3. Caractérisation des mouvements des RNPs 104

4. Implication des microtubules dans le transport des RNPs 105

5. Identification de moteurs moléculaires impliqués dans le mouvement des RNPs 107

6. La voie de recyclage des endosomes dans le transport des RNPs 108

7. Protéines de la RNP impliqué dans l'interaction avec Rab11 111

8. Modèle cellulaire pour l'étude de l'infection par le RSV 111

Conclusions 113

Annexes 116

Article 1 145

Article 2 146

Bibliographies 161

Liste des abréviations

CytoD : Cytochalasine D

C-ter : C-terminal

ER : Endosome de recyclage

GE : Gene End

GFP : Green Fluorescente Protein

GS : Gene Start

IBs : Corps d'inclusion

IBAGs : Granules associés aux corps d'inclusion

MNV : Mononégavirale

MOI : Multiplicité d'infection

MT : Microtubule

NI : Non infecté

NZ : Nocodazole

N-ter : N-terminal

RE : Réticulum Endoplasmique

RNP : Ribonucléoproteine

RSV : Virus respiratoire syncytial

VSV : Virus de la stomatite vésiculaire

WT : Sauvage

p.i. : Post-infection

p.t. : Post-transfection

Chapitre 1. Le Virus Respiratoire Syncytial en santé publique

Depuis sa découverte en 1955, le virus respiratoire syncytial (RSV) occupe une place importante en santé publique. Sa circulation en période hivernale se chevauche avec celle d'autres virus respiratoires tels que le virus influenza, le métapneumovirus et les virus parainfluenza. Pour autant, il reste la première cause de bronchiolite chez les nourrissons. Il est ainsi à l'origine de nombreuses hospitalisations dans les pays développés et entraine au moins 120 000 décès d'enfants de moins de 5 ans essentiellement dans les pays en voie de développement. Les réinfections sont fréquentes y compris chez l'adulte et peuvent être sévères notamment pour les personnes âgées et immunodéprimées. La morbi-mortalité associée aux infections par le RSV chez les sujets fragilisés serait proche voire équivalente à celle des infections grippales (M. Rameix-Welti and Gault 2017).

Dans cette revue, où nous discutons des métapneumovirus et du RSV, ma contribution a été de décrire les génomes ainsi que les protéines virales composant les ribonucléoprotéines virales (RNP) soit N, P, L, M2-1, M2-2 et les protéines non structurales NS1 et NS2. De décrire succinctement le cycle viral du RSV et du métapneumovirus. J'ai rappelé l'importance de ces virus en santé publique chez l'enfant et l'adulte, la clinique ainsi que le diagnostic virologique.

Virus respiratoire syncytial et métapneumovirus humain

G. Cosentino, K. Marougka, M.-A. Rameix-Welti

Résumé : *Les infections respiratoires basses demeurent la principale cause de décès chez les enfants de moins de 5 ans dans le monde. Les virus seraient responsables de plus de 60 % des pneumonies sévères de l'enfant dans les pays en voie de développement. Parmi ceux-ci, le virus respiratoire syncytial (RSV) arrive largement en tête causant à lui seul plus de 30 % des pneumonies de l'enfant de moins de 5 ans. En Europe, 1 à 3 enfants de moins de 1 an pour 1000 sont hospitalisés chaque année du fait d'une infection par le RSV. Le métapneumovirus est aussi un pathogène important retrouvé dans 5 % des cas. L'impact en termes de morbi-mortalité de ces virus ne se limite pas à la pédiatrie. L'importance et la sévérité des infections par le RSV et métapneumovirus humain (hMPV) chez les sujets âgés ou fragilisés sont en effet maintenant bien établies et font de ces virus des pathogènes majeurs de l'adulte. Les connaissances fondamentales sur la multiplication du RSV et dans une moindre mesure du hMPV ont beaucoup progressé ces dernières années. Pourtant, malgré toutes les données disponibles, les stratégies thérapeutiques et préventives restent extrêmement limitées.*

© 2021 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots-clés : Virus respiratoires ; Virus respiratoire syncytial ; Métapneumovirus ; Épidémie ; Pneumovirus ; Bronchiolite ; Pneumopathie ; Asthme ; Antiviraux ; Vaccin

Plan

- **Virologie générale** 1
  - Structure des virions 1
  - Génome 2
  - Protéines de surface 2
  - Protéines de matrice 3
  - Nucléoprotéine et protéines du complexe polymérase 3
  - Protéines non structurales 4
  - Cycle viral 4
- **Épidémiologie et pouvoir pathogène** 4
  - Circulation 4
  - Poids en santé publique des infections par le RSV et le hMPV 6
- **Physiopathogie et clinique** 7
  - Clinique 7
  - Physiopathologie 7
  - Réponse immunitaire et mécanismes d'échappement 8
  - Diagnostic virologique 8
- **Antiviraux et vaccins** 8
  - Antiviraux spécifiques actuellement commercialisés 8
  - Antiviraux en développement 9
  - Vaccination 9
- **Conclusion** 11

Virologie générale

Le virus respiratoire syncytial (RSV) et le métapneumovirus humain (hMPV) sont deux virus ubiquitaires responsables d'infections respiratoires chez l'homme [1–4]. Le RSV a été isolé pour la première fois en 1955, à partir des sécrétions nasales de jeunes chimpanzés présentant une rhinite et des râles sibilants. Un an après, il était retrouvé chez deux enfants présentant l'un une bronchiolite et l'autre une pneumonie. Ce virus fut nommé « virus respiratoire syncytial » en référence aux syncytia observés en culture cellulaire [5]. Le hMPV a été isolé beaucoup plus récemment, en 2001 aux Pays-Bas, à partir de prélèvements nasopharyngés d'enfants présentant une infection respiratoire sans étiologie connue. C'est le premier virus identifié par la biologie moléculaire à l'aide d'une technique de polymérisation en chaîne après transcription inverse (RT-PCR) utilisant des amorces aléatoires. L'analyse des séquences obtenues a retrouvé une homologie avec le *avian metapneumovirus* ce qui a permis de le classer en hMPV [6].

Structure des virions

Le virus respiratoire syncytial (RSV) appartient au genre *Orthopneumovirus* et le hMPV au genre *Metapneumovirus*, deux genres qui font partie de la famille des *Pneumoviridae*. Les *Pneumoviridae* avaient été initialement classés au sein des *Paramyxoviridae* mais ils ont été individualisés en 2016 en raison de la présence du gène M2 dans le génome de *Pneumoviridae* et des différences structurales au niveau du complexe polymérase. Ils appartiennent à l'ordre *Mononegavirales* (MNV), qui est dédié aux virus dont le génome non segmenté présente une polarité négative [7].

Les *Pneumoviridae* forment des particules virales enveloppées sphériques, asymétriques ou filamenteuses [8] (Fig. 1). Les particules sphériques ont un diamètre de l'ordre de 150 à 250 nm. La longueur des particules filamenteuses peut atteindre plusieurs µm pour un diamètre qui reste de l'ordre de 90–100 nm. Ces filaments ressemblent aux filaments viraux observés à la surface des cellules infectées [9, 10]. Le génome encapsidé sous la forme d'une longue ribonucléocapside (NC) hélicoïdale se trouve au cœur de la particule. Les particules virales pourraient contenir de multiples génomes pour le RSV comme pour le hMPV [11]. La protéine M tapisse la face interne de la membrane des virions formant une couche cylindrique presque continue pour les virions filamenteux

Volume 0 > n°0 > xxx 2020
http://dx.doi.org/10.1016/S2211-9698(21)41747-4

alors qu'elle est présente sous la forme de plages éparses pour les formes arrondies. La membrane virale comporte les protéines de surface F et G, ainsi que la protéine SH peu abondante. La répartition de la F à la surface du RSV a été étudiée par microscopie électronique sur des virions dépourvus de G. La F est répartie de façon irrégulière à la surface des particules sphériques alors qu'elle recouvre de façon uniforme et dense les particules filamenteuses [11].

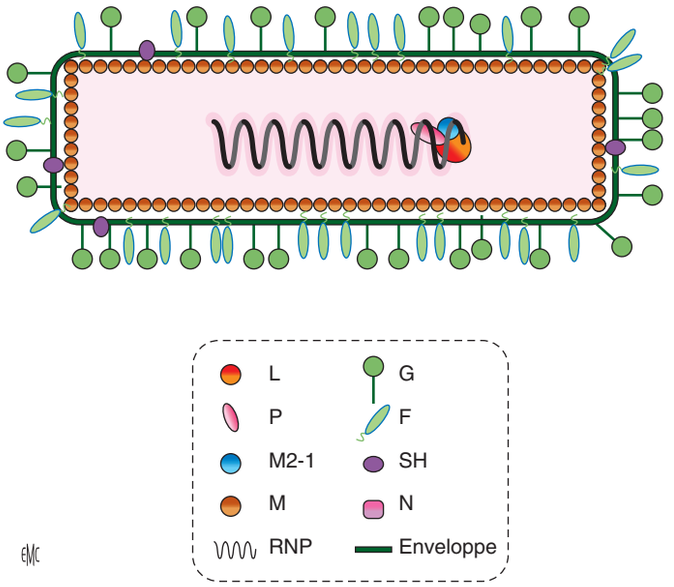


Figure 1. Représentation schématique des particules virales du virus respiratoire syncytial (RSV) et du métapneumovirus humain (hMPV). Les virions ont des formes sphériques, filamenteuses (représentée ici) ou des formes intermédiaires. Trois glycoprotéines sont insérées dans l'enveloppe virale : la protéine de fusion (F), la protéine d'attachement (G) et la petite protéine hydrophobe (SH). La protéine de matrice (M) tapisse la face interne de l'enveloppe. Le génome viral encapsidé par la nucléoprotéine (N) et associé à la polymérase (L), la phosphoprotéine (P) et la protéine M2-1 (uniquement pour le RSV) sont associées formant les ribonucléoprotéines virales (RNPs).

Génome

Les génomes du RSV et du hMPV sont des acides ribonucléiques (ARN) simple brin de polarité négative de respectivement 15 et 13 kb. Ils comportent des unités de transcription individuelles encadrées chacune par une séquence promotrice (*gene start*) et une séquence de terminaison de la transcription (*gene end)*. Leurs extrémités 5′ (*trailer*) et 3′ (*leader*) contiennent les signaux de réplication du génome (Fig. 2). Cette organisation est commune à l'ensemble des MNV, l'ordre des gènes sur le génome étant même relativement conservé avec la polymérase en 3′ et les protéines N et P en 5′. Le RSV possède l'un des génomes les plus complexes codant 11 protéines à partir de dix gènes. Il possède en particulier deux protéines non structurales NS1 et NS2 qui ne sont pas retrouvées chez le hMPV [8].

Protéines de surface

Les *Pneumovirus* possèdent deux glycoprotéines d'enveloppe majeures : G et F ainsi qu'une petite protéine transmembranaire SH.

La protéine G du RSV et du hMPV est une glycoprotéine de type II, avec un domaine hydrophobe en N-terminal qui permet l'ancrage dans la membrane plasmique. L'ectodomaine de la G est constitué par deux larges domaines connectés par une courte région centrale (Fig. 3). Ces domaines sont caractérisés par une intense glycosylation de type O-Glycan d'où leur désignation par le terme « mucin like domain » [12, 13]. Sur la G du RSV, la courte région centrale qui connecte les deux *mucin like domains* est très conservée et correspond au domaine de reconnaissance du CX3CR1. Ce motif est absent de la G du hMPV. La séquence de la G est très variable, en particulier au niveau des *mucin like domain*s et est à l'origine de la classification des groupes et des génotypes pour le RSV et le hMPV. Le RSV est divisé en deux groupes (RSV-A et RSV-B) dont les protéines G présentent moins de 53 % d'identité. Chacun de ces groupes comprend de nombreux génotypes, définis sur la base de la séquence de la G ; Trento et al. ont proposé une classification unifiée des RSV du groupe A en sept génotypes sur la base d'une distance intra génotypique P maximale de 0,049 [14]. Les analyses phylogénétiques de la G du hMPV révèlent deux groupes majeurs en circulation (A et B) avec en moyenne 34 % d'identité entre les séquences des protéines G [15, 16].

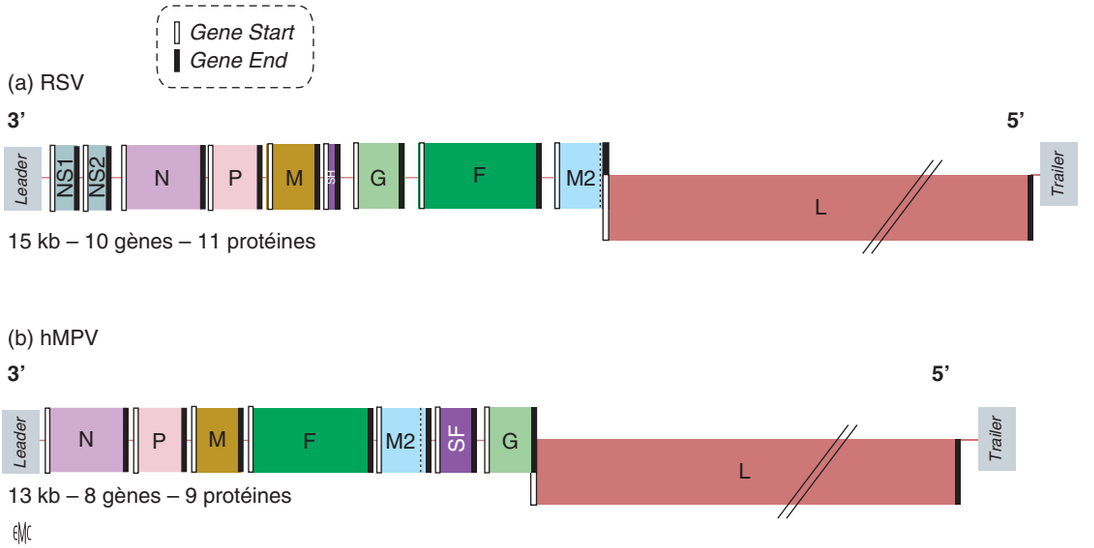


Figure 2. Organisation schématique de l'acide ribonucléique (ARN) génomique du virus respiratoire syncytial (RSV) et du métapneumovirus humain (hMPV). Les génomes du RSV et du hMPV possèdent 10 et 8 gènes qui codent pour 11 et 9 protéines respectivement. Ils ont en commun les gènes qui expriment la protéine de fusion (F), la glycoprotéine (G), la petite protéine hydrophobe (SH), la protéine de matrice (M), la nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P), le facteur de transcription M2-1 et l'ARN dépendante ARN polymérase (L). À l'extrémité 3′ du génome du RSV, on retrouve également les gènes qui codent pour deux protéines non structurales (NS1 et NS2). Chaque gène est encadré par des séquences *Gene Start* et *Gene End.* Les gènes sont représentés par des rectangles de couleur en respectant les rapports de longueur (sauf pour L). Les échelles ne sont pas respectées pour les séquences intergéniques, les séquences *Gene Start*, les séquences *Gene End*, le *leader* et le *trailer*.

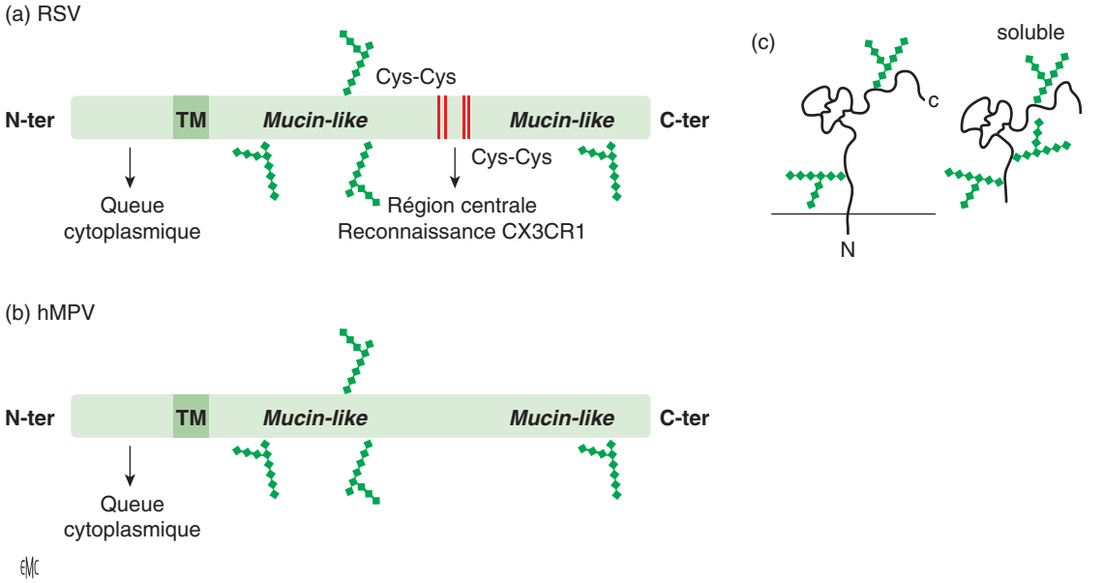


Figure 3. Organisation et structure de la glycoprotéine G du virus respiratoire syncytial (RSV) et du métapneumovirus humain (hMPV) (a et b). Répresentation schématique de l'organisation des domaines de la G (TM : région transmembrabaire) (c). Répresentation de la structure tridimentionnelle de la G RSV membranaire ou sécrétée.

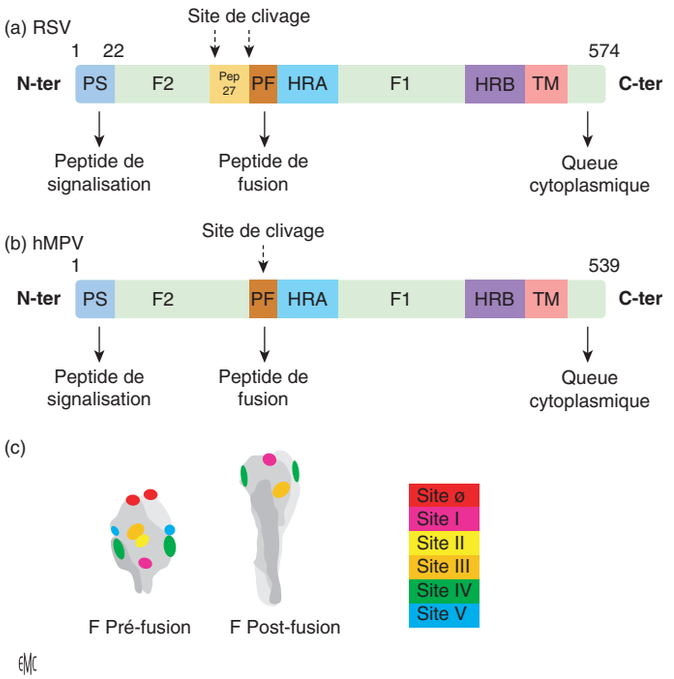


Figure 4. Structure de la glycoprotéine F du virus respiratoire syncytial (RSV) et du métapneumovirus humain (hMPV). Répresentation schématique de l'organisation des précurseurs peptidiques F0 (a,b). Le/les clivages protéolytiques produisent les sous-unités F1 et F2. (PS) *peptide signal*, (pep 27) fragment de 27AA éliminé de la forme mature, (PF) peptide de fusion, (TM) région transmembranaire, (HRA et HRB) régions répetées. (c) Répresentation schématique de la structure trimèrique de la F du RSV en conformation pré- et post-fusion. Les sites antigéniques présents sur chacune des formes sont indiqués.

Les protéines de fusion (F) du RSV et du hMPV sont des glycoprotéines de type I homotrimériques. À la différence de la G, leurs séquences sont très conservées avec respectivement, 91 et 95 % d'identité entre les protéines F des groupes RSV-A et B et des groupes hMPV-A et B [16, 17]. La F est synthétisée sous forme d'un précurseur polypeptidique (F0) qui va subir un clivage post-traductionnel. Chaque monomère de F comporte ainsi deux sous-unités F1 et F2. Ces clivages sont indispensables pour rendre F compétente pour la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane des cellules cibles [18]. Lors de la fusion, la F subit un changement conformationnel majeur passant de la forme de pré-fusion de F dite « métastable » en une structure de « post-fusion » très stable [17, 19] (Fig. 4). Les différences structurales entre les formes pré- et post-fusion de la F du RSV ont des conséquences importantes en termes de stratégies vaccinale et antivirale. La F pré-fusion du hMPV est de plus surmontée d'une couche dense de glycosylation qui pourrait bloquer la reconnaissance par les anticorps [20].

Les SH sont des petites protéines hydrophobes (SH) possédant une seule α-hélice transmembranaire. Elles forment des oligomères en présence de différents détergents. De par leur localisation et leur conformation, les SH sont considérées comme des viroporines, protéine membranaire qui forme des canaux ioniques ou protoniques. SH n'est pas indispensable pour la croissance du RSV ou du hMPV en culture cellulaire et sa fonction n'est pas connue [21]. SH pourrait intervenir dans le contrôle de la réponse immunitaire comme le suggèrent l'atténuation in vivo de RSV n'exprimant plus SH et l'induction par ces virus d'une forte réponse interleukine-1β (IL-1β) [22].

Protéines de matrice

Les protéines de matrice (M) du RSV et du hMPV sont des protéines structurales clés qui tapissent la face interne de l'enveloppe virale. Elles orchestrent l'assemblage et le bourgeonnement des virions via de multiples interactions avec les ribonucléoprotéines (RNPs), les queues cytoplasmiques des protéines de surface et les lipides membranaires [9, 23]. Les M du RSV et du hMPV ont une structure en feuillets β qui présente de fortes homologies avec la structure de VP40, protéine matrice d'Ebola [24, 25]. Elles forment des dimères qui eux-mêmes s'assemblent en oligomères de haut grade en particulier au contact des lipides [26]. Même si les mécanismes exacts ne sont pas connus, l'assemblage des virions semble impliquer la formation d'oligomères constituant un treillis sous la membrane plasmique qui fait le lien entre la RNP et les protéines de surface [24, 25].

Nucléoprotéine et protéines du complexe polymérase

Les nucléoprotéines (N) du RSV et du hMPV sont des protéines d'environ 42 kDa. Leur principale fonction est l'encapsidation du génome viral. Elles présentent une organisation structurale très similaire en deux larges domaines globulaires avec deux bras

libres aux extrémités C-ter et N-ter [27, 28]. Dans une cellule infectée, la N existe sous deux formes : une forme multimérique liée à l'ARN formant la NC mais aussi une forme monomérique non liée à l'ARN complexée à P (N_0-P) [28, 29]. Dans la NC qui forme une hélice gauche, l'ARN est fixé au niveau du sillon entre les deux domaines globulaires et les bras N- et C-ter interagissent avec les monomères adjacents [28, 30]. Dans le complexe N_0-P, la P maintient la N sous forme monomérique en bloquant les sites d'interaction avec les bras N-ter et C-ter des N adjacentes et la liaison à l'ARN [27, 31]. La P libère la N lors de la réplication du génome viral, ce qui pourrait permettre l'encapsidation sélective de l'ARN viral néosynthétisé. Outre son rôle d'encapsidation, la N du RSV pourrait aussi intervenir directement dans le contrôle de la réponse innée [32].

Les ARN polymérases ARN dépendantes (RdRp) du RSV et du hMPV sont de très grosses protéines d'environ 250 kDa, appelées L pour « Large ». Six domaines homologues sont retrouvés sur les polymérases des *MNV*. Le domaine III porte l'activité catalytique « ARN polymérase ARN dépendante » et les domaines V et VI catalysent l'addition et la méthylation de la coiffe. Les structures des RdRp du RSV et du hMPV ont été récemment résolues [33,34]. Elles sont très proches même si leurs séquences en amino-acide ne présentent que 48 % de similitude. Elles présentent un très large domaine qui abrite le site de polymérisation de l'ARN, surmonté par les domaines impliqués dans l'ajout de la coiffe. Dans les deux cas, elles sont très étroitement liées à la protéine P. Ces données structurales devraient permettre le développement d'antiviraux ciblant la polymérase dans les années à venir.

Les phosphoprotéines P sont des cofacteurs indispensables de la polymérase pour l'ensemble des MNV. Les P du RSV et du hMPV ne présentent que 36 % d'acides aminés communs mais leurs structures sont similaires [31, 33, 34]. Ce sont des protéines homotétramériques d'environ 35 kDa. Chaque monomère présente un court domaine d'oligomérisation central en hélice et deux bras (N-ter et C-ter) intrinsèquement désordonnés. De ce fait, P présente une plasticité structurelle unique lui permettant d'interagir avec de très nombreuses protéines virales (L, N sous forme NC et N_0, M2-1) et cellulaires (PPI). Elle semble ainsi jouer le rôle de « chef d'orchestre » lors de la transcription-réplication virale. En interaction avec la L, chaque monomère de P adopte une conformation différente illustrant bien la plasticité de la structure de cette protéine [33]. P possède plusieurs résidus phosphorylés. Toutefois, le rôle de ces phosphorylations reste peu connu pour le RSV comme pour le hMPV.

Les protéines M2-1, du RSV et du hMPV sont considérées comme des facteurs de transcription viraux. Seuls les *Filoviridae* possèdent un équivalent de M2-1 (VP 30). La M2-1 est une protéine basique de 22 kDa homotétramérique avec un large domaine globulaire en hélice α en C-ter, un domaine d'oligomérisation et un domaine à doigt de Zinc en N-ter [35, 36]. Elle présente un domaine d'interaction avec l'ARN et un domaine d'interaction avec la P. La M2-2 est la 2e protéine codée par l'ORF M2 de 11 kDa du génome viral RSV et hMPV. À ce jour, il n'existe aucune étude révélant sa structure. Elle interviendrait dans le contrôle du passage de la transcription à la réplication pour le RSV [37].

Protéines non structurales

Les protéines NS1 et NS2 du RSV sont de petites protéines non structurales de, respectivement, 17,5 et 14,5 kDa. Leurs gènes sont situés en 3′ du génome viral, ils sont transcrits massivement dès l'initiation de l'infection. Elles n'ont pas d'équivalents chez les autres virus ARN négatifs simple brin à l'exception des *Orthopneumovirus*. Ce sont des protéines multifonctionnelles qui jouent un rôle essentiel dans l'échappement à la réponse immunitaire. Seule la structure de la protéine NS1 est connue. Elle est étonnamment proche de la structure de la M, suggérant qu'il pourrait s'agir d'un paralogue [38].

Cycle viral

Ce paragraphe décrit essentiellement le cycle du RSV (Fig. 5) en soulignant les spécificités connues du hMPV [15]. L'attachement du RSV à la surface de la cellule cible implique les glycoprotéines de surface F et G. La protéine G se lie aux glycoaminoglycanes (GAGs), aux héparines sulfates ainsi qu'au CX3CR1 [13]. Son rôle dans l'entrée est encore mal compris. À la différence de la G, la F est indispensable pour la multiplication du RSV. La nucléoline serait un des récepteurs cellulaires clés du RSV reconnu par la protéine F. Des travaux récents ont mis en évidence un mécanisme plus complexe en deux étapes. La F interagirait initialement avec l'*insulin-like growth factor 1 receptor* (IGF1R), induisant une cascade de signalisation intracellulaire qui aboutit à la translocation de la nucléoline du noyau vers la membrane plasmique où elle est reconnue par le F [39]. L'existence d'une étape d'internalisation par endocytose ou macropynocytose avant la fusion membranaire est encore discutée. Il est en revanche clairement établi que la fusion est médiée par la protéine F et n'est pas déclenchée par une modification du pH. Le génome ainsi libéré, les étapes de transcription et de réplication vont se dérouler dans le cytoplasme de la cellule au sein d'inclusions cytoplasmiques viro-induites appelées corps d'inclusion (IBs pour *inclusion bodies*). Ces IBs, qui constituent de véritables usines virales, contiennent les protéines du complexe polymérase et les ARN viraux [40]. En utilisant comme matrice le génome viral encapsidé par la N, la polymérase (L) associée à son co-facteur P et à la protéine M2-1 va transcrire les ARNm viraux. La protéine M2-1 est indispensable à la transcription des ARNm du RSV mais pas du hMPV [41]. Le complexe polymérase s'engage sur la matrice au niveau du *leader* en 3′ et transcrit les gènes de façon séquentielle en initiant au niveau de *gene start* et terminant sur le *gene end* de chacun des gènes. La réinitiation de la transcription au niveau du *gene start* n'est pas systématique et la polymérase peut se « décrocher » de la matrice. Le gradient transcriptionnel, c'est-à-dire le fait que plus les gènes sont proches du *trailer*, plus ils sont transcrits, résulte de ce mécanisme de transcription séquentielle. Il faut toutefois souligner que ce gradient typique des *Paramyxoviridae* est moins prononcé pour le RSV [42]. La polymérase assure également l'addition de la coiffe et la polyadénylation de l'ARNm [41]. Les transcrits viraux ainsi coiffés et polyadénylés sont ensuite traduits comme des messagers cellulaires. Le complexe L-P assure la réplication du génome viral à partir de la même matrice en synthétisant un ARN antigénomique, à son tour répliqué en ARN génomique. Lors de la réplication, la polymérase synthétise un ARN complet qui est encapsidé par la N au fur et à mesure de sa synthèse. La spécificité d'encapsidation semble contrôlée par la P qui joue un rôle de chaperonne sur la N en bloquant sa liaison avec les ARN et libère la N pour encapsider le génome viral [33, 34]. Les nouveaux génomes encapsidés s'associent avec L, P et M2-1, formant de nouvelles RNPs virales. Ces RNPs rejoignent alors la membrane plasmique où sont concentrées les glycoprotéines virales, et où ont lieu les étapes finales de l'assemblage des virions [23]. Les étapes de bourgeonnement et de libération des virions sont peu connues. Les protéines M, F et P, et la protéine N dans une moindre mesure, sont essentielles pour la formation des filaments viraux, précurseurs des virions observés à la surface des cellules, suggérant qu'elles occupent un rôle central dans l'export des RNPs et le bourgeonnement du RSV et du hMPV.

■ Épidémiologie et pouvoir pathogène

Circulation

Le RSV et le hMPV sont des virus ubiquitaires extrêmement prévalents. Tous les enfants de l'âge de 2 ans ont déjà été infectés au moins une fois par le RSV, dont 70 % avant l'âge de 1 an [43]. Le hMPV infecte préférentiellement les enfants entre 2 et 5 ans. À 5 ans tous les enfants ont été infectés au moins une fois [8]. Les réinfections par ces deux virus sont fréquentes tout au long de la vie. Ils sont très contagieux. Le taux d'attaque du RSV atteint 100 % chez les sujets naïfs, et est de l'ordre de 40 % chez l'adulte [43]. Ils sont transmis par des gouttelettes respiratoires (> 5 μm) ou par voie manuportée. Le RSV comme le hMPV peuvent en effet résister à la dégradation pendant quelques minutes sur les

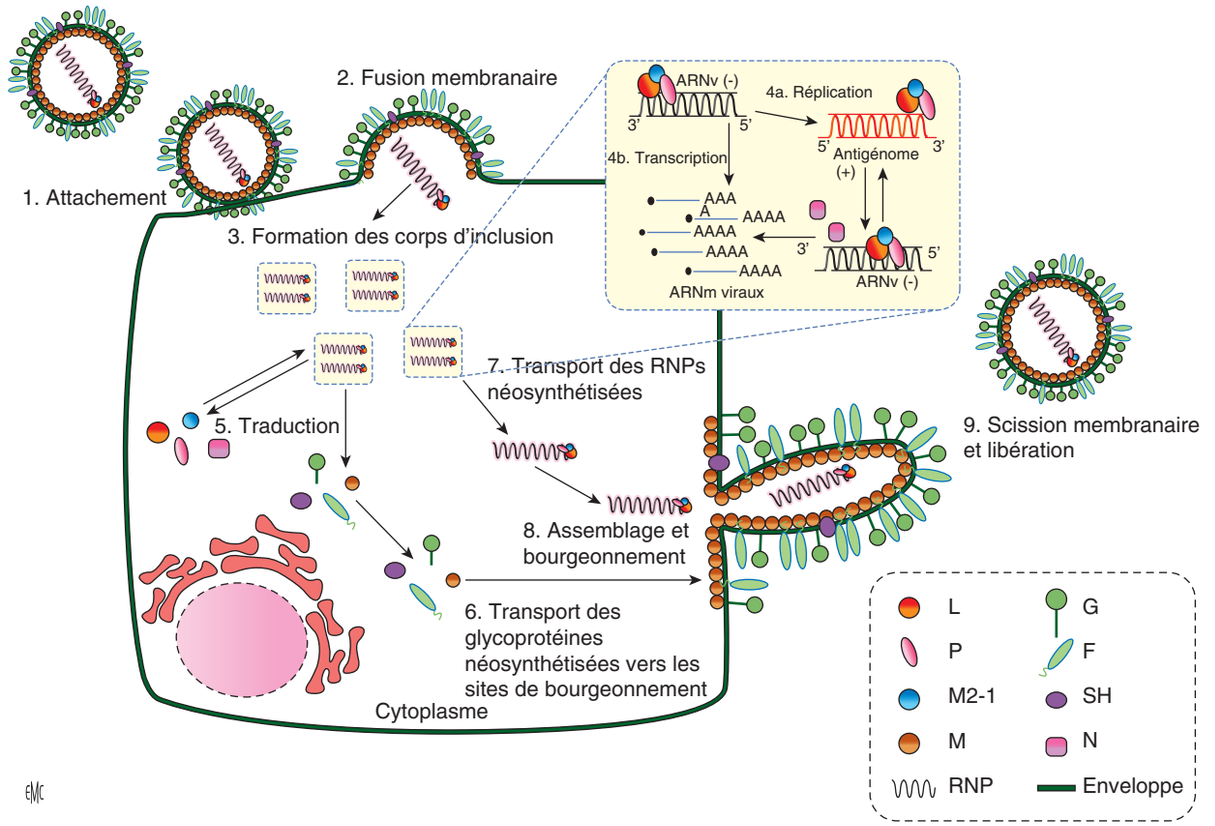


Figure 5. Schéma du cycle de réplication du virus respiratoire syncytial (RSV). La particule virale s'attache à la surface des cellules permissives à l'infection (1). L'enveloppe virale fusionne avec la membrane plasmique grâce à la protéine F (2). Les ribonucléoprotéines (RNPs) sont regroupées aux niveaux des corps d'inclusion où se déroulent la réplication et la transcription (4a et b). Les acides ribonucléiques (ARN)m viraux sont traduits dans le cytoplasme (5). Les protéines du complexe polymérase et la N néosynthétisées se concentrent dans les corps d'inclusion participant à la production de nouvelles RNPs. Les protéines de surface, la protéine de matrice et les RNPs néosynthétisées sont amenées jusqu'aux sites de bourgeonnement (6, 7 et 8). Les particules virales sont libérées (9). L : polymérase ; P : phosphoprotéine ; M : protéine de matrice ; F : la protéine de fusion ; G : la protéine d'attachement ; N : nucléoprotéine ; SH : petite protéine hydrophobe ; ARN : acides ribonucléiques.

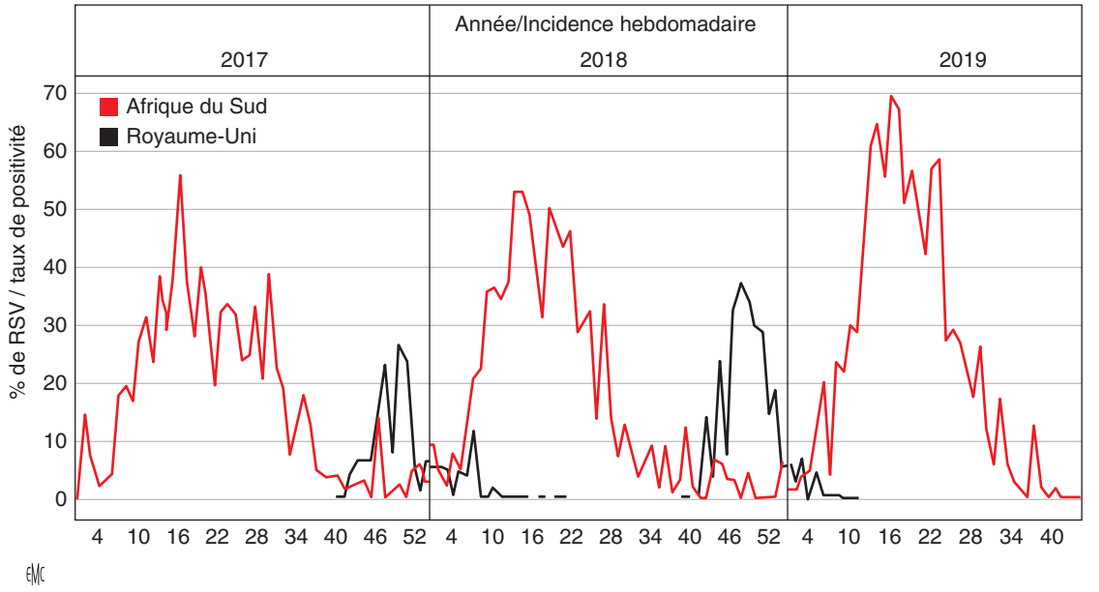


Figure 6. Représentation graphique de l'incidence hebdomadaire du virus respiratoire syncytial (RSV) au Royaume-Uni et en Afrique du Sud sur 3 années (2017–2019). Source : Flumart http://ais.paho.org/phip/viz/ed_who_rsv.asp.

mains et pendant plusieurs heures sur des surfaces non poreuses favorisant une transmission indirecte [44, 45]. En revanche, la transmission par aérosol, c'est-à-dire par de très petites gouttelettes capables de perdurer en suspension dans l'air, est plus discutée [46]. Dans les services hospitaliers, ces virus communautaires sont régulièrement responsables d'épidémies nosocomiales dont les conséquences peuvent être graves chez des patients fragiles. Leur prévention repose sur la mise en place de mesures barrières dites « précaution gouttelettes » qui comprennent entre autres le port de masques chirurgicaux, le renforcement des mesures de désinfection des surfaces et des objets, l'hospitalisation en chambre seule [47]. Dans les zones tempérées, le RSV et le hMPV

sont responsables d'épidémies saisonnières automno-hivernales voire printanières pour le hMPV [15] (Fig. 6). Le RSV est retrouvé pendant à peu près la moitié de l'année dans la majorité des pays avec une circulation relativement conservée d'une année sur l'autre [48]. Dans les zones tropicales, le RSV semble circuler pendant de plus longues périodes avec des pics épidémiques pendant les périodes humides. Il faut noter que la circulation du RSV reste peu documentée, même dans les pays développés. Dans ce contexte, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a décidé en 2017, d'utiliser la plateforme en place pour la surveillance de la grippe : Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) pour la surveillance du RSV.

Les facteurs expliquant la saisonnalité des épidémies d'infection par le RSV sont peu connus. Le froid et l'humidité pourraient favoriser la conservation du virus dans le milieu extérieur et induit aussi un regroupement des populations à l'intérieur favorable à la circulation du virus. Enfin, il faut noter que même si les virus influenza et le RSV circulent pendant les mêmes périodes, le pic épidémique du RSV précède classiquement celui de la grippe de plusieurs semaines, amenant certains à proposer des interactions négatives entre les deux virus. Le décalage de plus de 3 mois de l'épidémie de RSV lors du pic épidémique de grippe très précoce de la pandémie de 2009 va dans ce sens [49]. Lors de la pandémie liée au SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)*, la circulation hivernale dans l'hémisphère sud des autres virus respiratoires comme les virus influenza et le RSV a été considérablement réduite sans doute du fait des mesures barrières et de « distanciation sociale » [50]. La même tendance se dessine pour la saison 2020–2021 dans l'hémisphère nord.

Le mode de circulation des groupes et des génotypes est complexe. Lors d'une épidémie, un ou plusieurs groupes et génotypes de RSV ou hMPV peuvent co-circuler au sein d'une même communauté. Un même génotype peut circuler pendant des années, certains génotypes peuvent disparaitre et d'autres peuvent être dominants [14]. Par exemple pour le RSV, le génotype ON1 est quasiment le seul génotype de RSV-A retrouvé lors des épidémies depuis 5 ans. La question d'une corrélation entre la sévérité des symptômes et le génotype a été étudiée mais reste en suspens pour le RSV comme pour le hMPV.

Poids en santé publique des infections par le RSV et le hMPV

Infections par le RSV et le hMPV en pédiatrie

La pathogénicité du RSV en pédiatrie est bien établie. Les deux dernières larges études publiées donnent des estimations proches, estimant que le RSV est responsable chaque année dans le monde de 33,2 millions de cas de bronchiolite et 3,2 millions d'hospitalisations chez des enfants de moins de 5 ans [51, 52]. La mortalité serait de l'ordre de 118 000 enfants par an, essentiellement dans les pays en voie de développement. En France, le RSV serait responsable d'environ 450 000 cas de bronchiolite par an avec plus de 10 000 hospitalisations ce qui en fait la première cause d'hospitalisation des enfants de moins de 6 mois.

Une large étude rétrospective américaine portant sur les données d'hospitalisations pédiatriques de 1997 à 2006 estime l'incidence annuelle des hospitalisations liées au RSV à 32 pour 1000 nourrissons (< 1 an) correspondant à 126 000 hospitalisations par an dans cette tranche d'âge et 172 000 hospitalisations pour les enfants de moins de 5 ans [53]. Le recours aux soins intensifs est nécessaire dans 27 % des hospitalisations. Des facteurs de risque de bronchiolite sévère ont été identifiés, au premier rang desquels la prématurité. S'y ajoutent des facteurs comme le faible poids de naissance, le tabagisme passif ou encore le syndrome de Down, les pathologies cardiaques, pulmonaires ou les déficits immunitaires [54, 55]. Il faut toutefois noter que presque la moitié des enfants hospitalisés ont moins de 2 mois et que la grande majorité ne présente pas de facteur de risque particulier autre que l'âge [56]. Ainsi, dans l'étude de Stockman et al., seuls 4 % des enfants hospitalisés pour une infection par le RSV présentent un facteur de risque [53]. Ces données sont à prendre en compte pour les stratégies préventives.

Le hPMV est également un pathogène responsable d'atteinte respiratoire chez les enfants de moins de 5 ans, avec environ 1 million de consultations externes, 263 000 visites aux services d'urgences et 20 000 hospitalisations par an aux États-Unis [57]. L'incidence annuelle globale des hospitalisations associées au hMPV est de 1,2 pour 1000 d'enfants de moins de 5 ans. Son incidence est nettement inférieure à celle du RSV dans les premiers mois de vie mais se rapproche de celle de la grippe ou des virus parainfluenza [58]. Globalement le hMPV infecte des enfants plus âgés que le RSV, avec un pic d'infection entre 6 et 9 mois. De plus, 40 % des enfants hospitalisés présentent des pathologies sous-jacentes telles que la prématurité, l'asthme, les maladies pulmonaires chroniques et les cancers [54, 59].

Il est bien établi que les infections par le RSV ou d'autres virus respiratoires peuvent exacerber un asthme existant [60]. Dans le cas du RSV, il semble qu'une infection sévère constitue en soi un facteur de prédisposition au développement ultérieur d'un asthme. Une étude de cohorte a ainsi mis en évidence un risque d'asthme plus élevé chez les enfants âgés d'environ 4 mois au pic épidémique d'infections par le RSV que chez les enfants âgés d'environ 12 mois [61]. Dans une étude interventionnelle randomisée, l'administration de palivizumab à des enfants prématurés, par ailleurs en bonne santé, a significativement réduit le risque d'asthme même après l'arrêt du traitement [62].

Infections par le RSV et le hMPV chez l'adulte

Les réinfections par le RSV et le hPMV sont fréquentes tout au long de la vie. Considérées comme bénignes chez les enfants de plus de 5 ans et les adultes sains, elles peuvent être sévères chez les sujets âgés ou fragilisés.

L'incidence des réinfections chez les sujets sains est très mal connue. Le taux de réinfection par le RSV est estimé à 5–10 % des adultes par an [63] et 2,2–10,5 % pour le hMPV [64]. La majorité des adultes en bonne santé infectés par le hMPV sont asymptomatiques (44–71 %). Au contraire, l'infection par le RSV chez l'adulte est généralement symptomatique (84 %) entraînant un absentéisme au travail dans 38 % des cas [65]. Il faut toutefois noter que des infections basses sévères sont décrites chez des sujets sains sans aucun facteur de risque pour le RSV et le hMPV.

La sévérité des infections par les RSV chez les sujets âgés est aujourd'hui clairement démontrée. Une large étude prospective multicentrique établit l'incidence de ces infections à 3–7 % par an pour des adultes de plus de 65 ans sans comorbidité et 4–10 % pour des sujets à risque [63]. L'incidence annuelle des hospitalisations dues à une infection respiratoire par le RSV serait de 1 pour 1000 pour les plus de 65 ans dans les pays développés avec une durée moyenne de séjour de 3 à 6 jours [66]. Un recours aux soins intensifs est nécessaire pour 10 à 31 % des adultes hospitalisés pour une infection par le RSV et le recours à une ventilation mécanique pour 3 à 17 % des cas [67]. La mortalité chez les patients hospitalisés est de l'ordre de 8 à 10 % [63, 68]. Ainsi les infections par le RSV des sujets de plus de 65 ans seraient responsables d'environ 180 000 hospitalisations et de 14 000 décès annuels aux États-Unis [63]. Une large analyse systématique des données de morbi-mortalité de 195 pays [69] estime que 54 820 sujets de plus de 65 ans décèdent suite à des infections par le RSV, à comparer à 76 477 pour les virus influenza. La morbi-mortalité des infections par le RSV chez les sujets de plus de 65 ans serait ainsi comparable à celle des infections grippales [70, 71], voire supérieure comme suggérée par une large étude rétrospective récente [72].

Moins documentée, la morbi-mortalité associée aux infections des sujets de plus de 65 ans par le hMPV apparaît très importante. Une large étude prospective sur 2 ans chez l'adulte estime l'incidence des hospitalisations avec pneumonie objectivée à la radiographie et recherche de hMPV positive à 2,5 pour 10 000 adultes de plus de 65 ans par an aux États-Unis, un chiffre comparable à celui retrouvé pour les infections par le RSV dans cette même étude [73]. Dans une étude prospective sur trois saisons grippales consécutives, le hMPV est retrouvé chez 4,5 % des sujets de plus de 50 ans hospitalisés pour pathologie respiratoire. Il faut souligner que les patients infectés par le hMPV sont plus âgés et présentent plus de comorbidités que ceux infectés par la grippe ou le RSV [71].

Chez les patients profondément immunodéprimés, en particulier les patients ayant reçu une greffe de cellules souches hématopoïétiques ou les transplantés de poumon, le RSV et le hMPV sont responsables d'infections très sévères avec une excrétion virale prolongée. Chez les patients transplantés de cellules souches hématopoïétiques, le RSV est le virus le plus fréquemment identifié dans les infections respiratoires avec une incidence de 2 à 17 % selon la population et la saison. Le hMPV arrive en deuxième position (3–9 %) [74]. Dans près de la moitié des cas, l'infection respiratoire haute progresse vers une infection respiratoire basse associée à une mortalité de près de 30 % [75, 76]. Le RSV et le hMPV sont associés à respectivement 11 et 6 % des infections respiratoires observées chez les transplantés pulmonaires. Ces infections conduisent à des rejets aigus et surtout chroniques dans 25 à 88 % des cas [77].

Chez les patients atteints de maladies pulmonaires obstructives chroniques telles que les bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO), les infections virales sont une cause commune de poussées aiguës. Le RSV fait partie des trois principaux virus retrouvés tandis que le hMPV se place en 7e position dans ce type d'infection [78, 79]. Ces poussées sont responsables d'une morbidité et d'une mortalité importantes ainsi que d'un déclin des fonctions pulmonaires à long terme.

■ Physiopathogie et clinique

Clinique

La primo-infection par le RSV est en règle générale symptomatique, responsable chez le nourrisson d'une rhinite avec éventuellement une fièvre modérée. Dans 15 à 50 % des cas, l'infection évolue vers une bronchiolite qui nécessitera l'hospitalisation dans 1 à 3 % des cas [56]. Le RSV est le principal agent étiologique de la bronchiolite mais d'autres virus peuvent engendrer un tableau similaire. La bronchiolite se caractérise par des signes d'infection respiratoire haute, suivis d'une dyspnée expiratoire. Les symptômes typiques sont une rhinorrhée, une toux, et des râles sibilants (*wheezing*) à l'auscultation qui peuvent s'accompagner d'une tachypnée et de signes de lutte respiratoire (tirage intercostal et/ou sus sternal, balancement thoraco-abdominal). La fièvre n'est retrouvée que dans 50 % des cas. Il faut toutefois noter que l'auscultation « caractéristique » est en fait assez variable d'un observateur à un autre [80]. La radiographie de thorax est non contributive et n'est pas recommandée en l'absence de suspicion de foyer bactérien. L'hospitalisation est décidée devant des signes de gravité : signes d'épuisement respiratoire dont les apnées et l'hypoxémie, signes de déshydratation ou encore un terrain à risque. Les traitements recommandés actuellement sont uniquement des traitements symptomatiques : désobstruction des voies aériennes supérieures, oxygénothérapie voire ventilation mécanique, fractionnement de l'alimentation voire hydratation parentérale. Les antitussifs et fluidifiants bronchiques sont contre-indiqués, les autres traitements médicamenteux (bronchodilatateur, sérum salé hypertonique, etc.) ne sont pas indiqués. La kinésithérapie respiratoire ne fait pas partie des recommandations de la Haute Autorité de santé (HAS) en 2019 (voir recommandations de la HAS, Fiche outil HAS Novembre 2019 consultables sur www.has-sante.fr).

Lors des réinfections par le RSV chez l'adulte, les symptômes varient selon l'âge et le terrain sous-jacent. La maladie débute par une atteinte respiratoire haute, mais la fièvre est inconstante, retrouvée dans environ 50 % des cas. La toux est le symptôme le plus fréquemment rapportée (85–95 %). Comme chez l'enfant après quelques jours d'évolution, une dyspnée et un *wheezing* sont courants (50–90 %). L'imagerie peut révéler une infiltration pulmonaire (38,8 %).

Les infections par le hMPV sont plus souvent asymptomatiques (environ 40 % des cas). Les symptômes sont proches de ceux retrouvés dans les infections par le RSV avec une rhinorrhée, une toux dans 75 % des cas et un *wheezing* dans 30 % des cas. La fièvre est très inconstante [64] La sévérité des infections par le RSV ou le hMPV de l'adulte est fréquemment liée à une exacerbation de pathologies sous-jacentes (maladies pulmonaires chroniques comme l'asthme et les BPCO, cardiopathies chroniques). Ainsi, au moins une condition pathologique antérieure est retrouvée chez environ 70 % des adultes hospitalisés [68]. Chez les sujets très âgés, les signes respiratoires peuvent même manquer et l'infection peut se traduire par la seule décompensation de pathologies sous-jacentes (insuffisance cardiaque, détérioration de l'état mental, etc.) [81]. Ces infections peuvent aussi se compliquer de surinfections bactériennes pulmonaires retrouvées chez environ 20 % des patients hospitalisés suite à une infection par le hMPV ou le RSV [82, 83].

Les connaissances sur la physiopathologie de bronchiolite du nourrisson ont progressé, mais de nombreuses questions restent en suspens, en particulier concernant les rôles respectifs de réplication virale et de la réponse immunitaire dans l'obstruction respiratoire.

Physiopathologie

L'infection par le RSV et le hMPV se fait par voie respiratoire et débute au niveau du tractus respiratoire supérieur après une courte incubation. L'atteinte des voies respiratoires inférieures survient quelques jours après chez environ un tiers des nourrissons. Les données histologiques obtenues dans le modèle d'infection de l'agneau ont permis de compléter les quelques données issues d'autopsies. In vivo, le RSV et le hMPV infectent essentiellement les cellules ciliées de l'épithélium respiratoire, mais in vitro leur tropisme est beaucoup plus large [84, 85]. Dans les lésions de bronchiolites sévères, les bronchioles sont obstruées par un infiltrat inflammatoire massif composé de polynucléaires neutrophiles et de macrophages ainsi que par du mucus et des débris cellulaires issus de la nécrose et de l'apoptose des cellules épithéliales [85]. Une hyperplasie des épithélia agressés et un infiltrat inflammatoire péribronchiolaire réduit encore la lumière des bronchioles. Une réponse inappropriée du système immunitaire a longtemps été considérée comme la cause de l'obstruction pulmonaire. Les infiltrats inflammatoires ainsi que les fortes concentrations de médiateurs inflammatoires retrouvées dans les cas sévères sont en faveur de cette hypothèse [86]. De plus, dans les modèles d'épithélium bronchique reconstitués in vitro, l'infection par le RSV est peu cytopathique allant à l'encontre d'un rôle direct du virus dans les lésions [84]. Un mécanisme immunopathologique mettant notamment en cause une orientation de la réponse T régulatrice vers un profil typique des réponses allergiques et des réponses contre les pathogènes extracellulaires (dit profil « Th2 » pour T *helper* 2) au détriment des réponses antivirales dites « Th1 », a été évoqué très tôt sur la base des résultats des premiers essais vaccinaux dans les années 1960. En effet, les enfants vaccinés avec du RSV inactivé à la formaline ont développé lors de l'infection naturelle des symptômes sévères conduisant à une hospitalisation dans 80 % des cas et à deux décès [87]. Les enfants décédés présentaient des infiltrats inflammatoires massifs riches en polynucléaires éosinophiles. Ce modèle d'immunopathologie après vaccination a pu être reproduit chez la souris [88], et une production importante d'IL-4 (cytokine de la réponse Th2) a été associée à des signes d'obstruction bronchique [89], mais de façon inconstante [90]. Des éléments récents ont remis en cause cette vision en suggérant un rôle direct de la réplication virale dans l'obstruction bronchiolaire. Tout d'abord, même si le virus est peu cytopathique dans les modèles d'épithélium respiratoires, il induit une expulsion des cellules infectées de l'épithélium, une hypersécrétion de mucus et une inhibition des mouvements ciliaires. De plus, la corrélation entre la charge virale et la sévérité des symptômes, longtemps discutée, semble maintenant établie [91, 92]. Enfin, la réponse cytotoxique T8 semble corrélée avec l'élimination du virus et la guérison plutôt qu'avec une aggravation des symptômes. Aujourd'hui, la question du rôle respectif du virus et de la réponse immunitaire dans les symptômes reste ouverte. Il est toutefois clair que le RSV mais aussi le hMPV, sont des virus qui contrôlent remarquablement bien les réponses immunitaires innées et adaptatives en comparaison avec des virus comme la grippe [93].

Réponse immunitaire et mécanismes d'échappement

La première étape de la réponse innée adaptative implique une reconnaissance des pathogènes. Par exemple, le TLR4 (*Toll-like receptor*) exprimé à la surface des cellules dendritiques interagit avec la F du RSV et avec la G du hMPV [94, 95]. De même, les deux virus sont reconnus au niveau des endosomes par les TLR3/TLR7 (voie MyD88 : *myeloid differenciation primary response 88*). En plus, la présence dans le cytoplasme des ARNs double brin et des 5′ triphosphates non coiffés est détectée par les récepteurs MDA5 (*melanoma differenciation-associated protein 5*) et RIG-I (*retinoic acid-inducible gene I*) respectivement, qui activent la voie MAVS (*mitochondrial antiviral-signaling protein*) [32]. Lors de l'infection, les cellules épithéliales vont produire différentes chimiokines (IP-10 et IL-8), responsables d'un afflux de polynucléaires neutrophiles au site de l'infection, ainsi que des interférons de type 1. Les macrophages alvéolaires et les cellules dendritiques produisent aussi des cytokines proinflammatoires (Interférons, IL-1 et IL-18) en quantité permettant le recrutement des autres effecteurs de l'immunité [93]. Lors de l'infection par le RSV chez la souris, les premières cellules à gagner les voies respiratoires sont les cellules NK, qui sont ensuite rejointes par des lymphocytes T *helpers* (T4) et des lymphocytes cytotoxiques (T8). Cette réponse va permettre une élimination du virus et l'induction d'une réponse humorale. Cette réponse IgG et IgA dirigée contre les protéines de surface permet de prévenir les réinfections. Il faut toutefois souligner que l'immunité induite par l'infection est très transitoire comme en témoigne la fréquence des réinfections [43].

Le RSV et le hMPV ont développé plusieurs stratégies pour s'opposer à la réponse immune.

Le RSV possède deux protéines, NS1 et NS2, spécialisées dans l'échappement à la réponse de l'hôte. Elles inhibent l'induction et les réponses interféron via de multiples cibles comme TRAF3 (*TNF receptor associated factor 3*), IKKε (*inhibitor-κB kinase ε*), TBK1 (*TANK-binding kinase 1*), IRF3 (*interferon regulatory factor*), et IRF7 [32, 96]. De plus, NS1 et NS2 forment un complexe proche du protéasome appelé « NS degradasome » qui dégrade spécifiquement des protéines de l'immunité innée comme STAT-2 [96]. La protéine G du RSV lie le récepteur de chimiokine CX3CR1 et induit son activation [13]. Il existe aussi une forme sécrétée de la G qui pourrait jouer le rôle de leurre pour les anticorps neutralisants. Par ailleurs, l'engagement du TLR4 par la F du RSV provoque une augmentation de l'expression de ce dernier en surface, ce qui pourrait augmenter la susceptibilité de l'épithélium aux ligands TLR4, dont l'endotoxine bactérienne [94].

Le hMPV ne possède pas de protéines non structurales, mais ses protéines M2-2, G, P et SH inhibent la détection des ARNs viraux et d'autres motifs moléculaires viraux par des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires comme les TLR et RIG-I via des stratégies diverses. Par exemple, M2-2 s'associe directement avec Myd88 et bloque ainsi l'activation des voies pro-inflammatoires dépendantes de Myd88 [97]. Les stratégies de contrôle de la réponse de l'hôte par la hMPV restent moins bien caractérisées que pour le RSV. Le mécanisme par lequel la protéine P du hMPV inhibe la reconnaissance des 5′ triphosphates par RIG-I reste par exemple incompris.

Le RSV et le hMPV limitent le recrutement de cellules dendritiques matures (cellules présentatrices d'antigène) au site de l'infection en perturbant la formation des synapses immunologiques entre ces dernières et les lymphocytes T [98]. Ce phénomène contribue à l'incapacité de l'organisme à établir une mémoire immunologique durable.

Diagnostic virologique

Le diagnostic étiologique des infections respiratoires n'est pas systématique. Il est essentiellement réalisé en cas de formes sévères ou à des fins épidémiologiques. Ces tests reposent sur la recherche du virus ou de ses composants dans des prélèvements respiratoires. L'isolement des virus en culture aujourd'hui est réservé aux centres de référence. Actuellement deux grands types de tests sont utilisés : les tests rapides type *point-of-care tests* (POC), et les tests moléculaires réalisés dans des laboratoires spécialisés [83, 99]. L'avantage des POC est l'obtention d'une réponse très rapide sans recours à un laboratoire spécialisé, ce qui permet de limiter le recours à des antibiothérapies et des explorations complémentaires inutiles ainsi que la transmission nosocomiale. Il n'en existe que pour le RSV. La première génération de tests avait des performances médiocres en particulier chez l'adulte avec une sensibilité de moins de 20 %. Des tests plus récents affichent des performances acceptables de l'ordre de 85 % de sensibilité et 95 % de spécificité par rapport aux des tests moléculaires chez l'enfant et même chez l'adulte [100]. Dans les laboratoires, les tests moléculaires se sont imposés comme méthode de référence. De nombreux tests commerciaux sont proposés, tous très sensibles et spécifiques. À côté des automates permettant la réalisation de larges séries de tests, il existe aussi des formats unitaires simples et rapides qui sont adaptés pour les diagnostics d'urgence. La recherche de RSV et de hMPV est enfin intégrée dans les tests moléculaires permettant une approche syndromique. Ces tests recherchent simultanément un large panel de pathogènes viraux et bactériens impliqués dans des infections respiratoires. Ils permettent de détecter en quelques heures plusieurs virus ou bactéries avec une très grande sensibilité quel que soit l'âge du patient et la qualité du prélèvement, mais restent plus onéreux que les tests recherchant un à trois virus.

■ Antiviraux et vaccins

Antiviraux spécifiques actuellement commercialisés

L'arsenal thérapeutique actuel reste extrêmement restreint. Deux antiviraux sont actuellement utilisés : la ribavirine, un antiviral ciblant les virus ARN et le palivizumab, un anticorps monoclonal réservé au traitement préventif des infections par le RSV.

Ribavirine

Les bénéfices de la ribavirine dans le traitement des infections par le RSV sont faibles pour un coût et une toxicité importante. Ainsi la ribavirine n'est plus indiquée dans le traitement des infections pédiatriques [101]. Bien qu'il n'existe aucune étude randomisée, les données disponibles suggèrent que la ribavirine permettrait de réduire la mortalité et la morbidité en cas d'infection par le RSV chez les transplantés de cellules souches hématopoïétiques [102, 103]. À l'heure actuelle, les groupes d'experts européens recommandent l'administration de ribavirine en aérosol ou en systémique chez les patients transplantés à haut risque d'évolution vers une infection respiratoire basse par le RSV [104]. L'administration concomitante d'immunoglobulines polyclonales reste discutée. Les données portant sur l'utilisation de la ribavirine dans les greffes d'organes solides sont encore plus limitées. La société américaine de transplantation pulmonaire recommande toutefois son utilisation par voie orale ou inhalée chez les greffés de poumon infectés par le RSV avec un niveau de preuve modéré [105]. En l'absence de données concernant le traitement des infections par les hMPV chez les sujets profondément immunodéprimés, les recommandations concernant le RSV peuvent s'appliquer aux infections par le hMPV [105, 106].

Palivizumab

Le palivizumab est un anticorps monoclonal humanisé qui cible la protéine F du RSV. Il a été mis sur le marché en 1998 en prévention des infections par le RSV chez les enfants à risque. Il est administré sous forme d'injections intramusculaires mensuelles (15 mg/kg) pendant la période de circulation du RSV. Dans l'essai princeps, IMpact-RSV, la prophylaxie par le palivizumab réduisait de 55 % le risque d'hospitalisation pour infection par le RSV des enfants prématurés (supérieur à 35 semaines gestationnelles) ou atteints de dysplasie bronchopulmonaire (4,8 vs. 10,6 %, $p < 0{,}001$) [107]. Les études ultérieures ont retrouvé des résultats similaires [108].

> **Point important**
>
> Indications du palivizumab dans l'autorisation de mise sur le marché (AMM) :
> • enfants nés à 35 semaines d'âge gestationnel ou moins et âgés de moins de 6 mois au début de l'épidémie saisonnière à RSV ;
> • enfants de moins de 2 ans qui ont nécessité un traitement pour dysplasie bronchopulmonaire au cours des 6 derniers mois ;
> • enfants de moins de 2 ans atteints d'une cardiopathie congénitale avec retentissement hémodynamique.
> Pour plus d'informations se référer à la stratégie thérapeutique recommandée, définie dans l'avis de la Commission de la Transparence du 5 avril 2017.

Antiviraux en développement

Le développement d'antiviraux efficaces et peu toxiques pour le traitement des infections par le RSV est un enjeu de santé publique majeur, mais aussi un enjeu industriel important au vu de l'importance du marché potentiel. C'est un champ de recherche très actif avec de nombreuses molécules dans les différentes phases de développement. Dans cet article, nous nous concentrerons essentiellement sur les molécules ayant été testées chez l'homme qui sont toutes des antiviraux ciblant le RSV. Pour le hMPV, aucun essai chez l'homme n'a été rapporté.

Anticorps

La protéine F étant très conservée, elle apparaît comme une cible de choix. Sur le modèle du palivizumab, différents anticorps monoclonaux ciblant la protéine F ont été développés, essentiellement destinés au traitement préventif des infections sévères.

Le plus avancé est le MEDI8897, une IgG1 monoclonal humaine, qui dérive de l'anticorps D25 développé par MedImmune et Sanofi Pasteur. Le D25 cible l'épitope Ø de la F en conformation pré-fusion avec une efficacité de neutralisation in vitro 100 fois supérieure à celle du palivizumab [17]. La chaîne lourde a, de plus, été modifiée pour augmenter la demi-vie du MEDI8897 chez le nourrisson permettant en théorie une protection pour toute une saison avec une administration unique [109]. Après des résultats encourageants en phase 2b, des essais cliniques de phase 2/3 et 3 sont en cours chez les nourrissons présentant ou non des facteurs de risque. Le REG2222 (Sputavizumab, Regeneron pharmaceuticals) a été testé en phase 3 comme traitement préventif chez les nouveau-nés mais les essais ont été interrompus car les critères d'efficacité n'étaient pas atteints. L'ALX-0171, enfin, est un *nanobody* dirigé contre la F qui a été développé pour une utilisation curative. Les *nanobodies* dérivent d'anticorps de camélidés qui ont la particularité de ne posséder qu'une seule chaîne. L'ALX-0171 est un *nanobody* trivalent, ciblant le même épitope que le palivizumab [110]. Les résultats des premiers essais chez l'homme étaient encourageants mais fin 2019 les essais ont été interrompus à la suite de l'essai de phase 2b réalisé sur 180 enfants. À côté des stratégies ciblant la F, il faut mentionner des stratégies alternatives développées en préclinique dont un anticorps ciblant le domaine CXCR3 de la G (domaine conservé) ou encore un agoniste de la nucléoline testés dans le modèle murin.

Sur le modèle du palivizumab des anticorps monoclonaux ciblant la F du hMPV ont été testés avec succès chez la souris [111, 112].

Inhibiteurs de fusion

Des criblages de différentes banques de petites molécules ont permis l'identification de composés capables de bloquer la fusion du RSV avec les cellules. Trois molécules, le presatovir (GS 5806), le JNJ-53718678 et le RV-521 ont été administrées oralement en double aveugle à des volontaires sains dans un modèle d'infection expérimentale par le RSV [92]. Ces trois molécules, administrées dès les premiers symptômes, permettent une importante réduction de la charge virale et des symptômes [113–115]. Toutefois les résultats des essais de phase 2b du Presatovir, la molécule dont le développement est le plus avancé, semblent décevants, ne permettant pas de réduire les symptômes ou la charge virale lors d'infections naturelles [116, 117]. D'autres molécules sont actuellement en développement en phase 2 comme l'AK0529 ou testées dans le modèle humain d'infection expérimentale (Tableau 1). L'émergence rapide de mutations de résistance in vitro et in vivo lors de l'utilisation des inhibiteurs de fusion est préoccupante, d'autant plus qu'elles confèrent en général une résistance croisée à plusieurs inhibiteurs de fusion. Ces mutations apparaissent regroupées au niveau de la cavité centrale de la forme pré-fusion de la F dans la région où se trouve le peptide de fusion. Ces données suggèrent que ces molécules agissent en stabilisant la forme pré-fusion de la F plutôt qu'en bloquant le repliement de la forme post-fusion comme proposé initialement [127]. Le défi est maintenant d'utiliser ces données pour développer de nouveaux inhibiteurs de fusion non impactés par ces mutations de résistance.

Pour le hMPV, un peptide inhibant la fusion permet une réduction de la charge virale, de l'inflammation et de l'obstruction pulmonaire dans un modèle murin d'infection [128].

Antiviraux ne ciblant pas l'entrée

La molécule la plus avancée est la lumicitabine développée par Alios Biopharma et Johnson & Johnson. Cet analogue de la cytidine inhibe spécifiquement la polymérase du RSV. Le positionnement des mutations de résistance sur la structure de la L suggère que la drogue ne se fixe pas directement au niveau du site catalytique mais à proximité de celui-ci et agit en modulant l'activité de la polymérase [33]. Comme le presatovir, la lumicitabine a démontré son efficacité dans un essai en double aveugle sur le modèle d'infection expérimentale de l'adulte sain [125]. Toutefois, les essais de phase 2b ont été arrêtés au cours de l'été 2019. Deux autres inhibiteurs ciblant la polymérase ont fait l'objet de développement préclinique. Le BI-D, qui inhibe l'addition de la coiffe sur les messagers viraux réduit la charge virale chez la souris. L'AZ-27, dont le développement est aujourd'hui arrêté, inhibe la polymérase virale en se fixant dans le « connector domain » entre les domaines « ribonucleotidyl transferase » et « méthyl transferase » de la L [33, 41]. Le RSV 604 est une molécule qui cible la N, efficace en préclinique, les essais chez l'homme n'ont encore jamais été publiés. Parmi les stratégies originales, il faut citer l'ALN-RSV01 qui est un petite ARN interférent ciblant l'ARNm de la nucléoprotéine N du RSV. Administré en aérosol, il a démontré une activité antivirale dans le modèle murin. Dans un essai randomisé, l'administration en aérosol d'ALN-RSV001 chez des patients greffés de poumons infectés par le RSV a permis de réduire le risque de bronchiolite oblitérante à 6 mois par rapport au placébo [123].

Vaccination

Presque 60 ans après l'échec retentissant du premier essai vaccinal contre le RSV, la mise au point d'un vaccin reste l'une des priorités de santé publique définie par l'OMS. Deux types de stratégies sont développées : soit des vaccins vivants qu'ils s'agissent de virus atténués ou de vecteurs viraux, soit des vaccins sous-unitaires avec des protéines recombinantes. En mars 2020, plus de 80 essais chez l'homme étaient recensés, dont 24 en cours sur une vingtaine de candidats vaccins (Fig. 7). Pour le métapneumovirus, des stratégies analogues sont à l'étude principalement en phase préclinique.

Les vaccins vivants atténués sont essentiellement destinés à la vaccination d'une population pédiatrique car l'établissement d'une immunité par l'infection naturelle devrait les inhiber. La voie intranasale est privilégiée pour induire une immunité muqueuse et parce qu'elle permet d'éviter les injections douloureuses chez l'enfant. Les premiers vaccins vivants atténués ont été développés par passage à basse température pour obtenir des

Tableau 1.
Antiviraux.

Antiviral	Cible	Développement actuel	Phase clinique atteinte [a]	Compagnie	Références
AK-0529 = Ziresovir	Inhibiteur de fusion	En cours	Phase 2b	Ark Biosciences Inc., Roche Pharma	[b]
AZD-9639	Inhibiteur de fusion	Arrêté	Phase 1	AstraZeneca Plc	
BTA-9881	Inhibiteur de fusion	Arrêté	Phase 1	Biota Scientific Management Pty Ltd	[118]
BTA-C585 = Enzaplatovir	Inhibiteur de fusion	Arrêté	Phase 2a	Aviragen Therapeutics Inc.	
JNJ-8678 = JNJ-53718678	Inhibiteur de fusion	En cours	Phase 2b	Johnson & Johnson	[119, 120]
MDT-637 (VP 14637)	Inhibiteur de fusion	Arrêté	Phase 2a	MicroDose Therapeutx, Inc.	[121]
GS-5806 = Presatovir	Inhibiteur de fusion	En cours	Phase 2b	Gilead Sciences Inc	[113, 116, 117]
RV-521 = Sisunatovir	Inhibiteur de fusion	En cours	Phase 2a	ReViral Ltd	[115]
ALN-RSV01	RNA i contre N spray	Arrêté	Phase 2b	Alnylam Pharmaceuticals Inc.	[122, 123]
ALS-8176 Lumicitabine	RSV polymerase	Arrêté	Phase 2b	Alios Biopharma Johnson & Johnson	[124] [125]
RSV-604 (A-60444)	N	Arrêté	Phase 2	Novartis	[126]
EDP-938	N	En cours	Phase 2a	Enanta Pharmaceuticals	[124]

[a] Clôturée, interrompue ou en cours 2e trimestre 2020.
[b] Toovey SWJ, 1st International Meeting on Singapore 2015. Respiratory Pathogens.

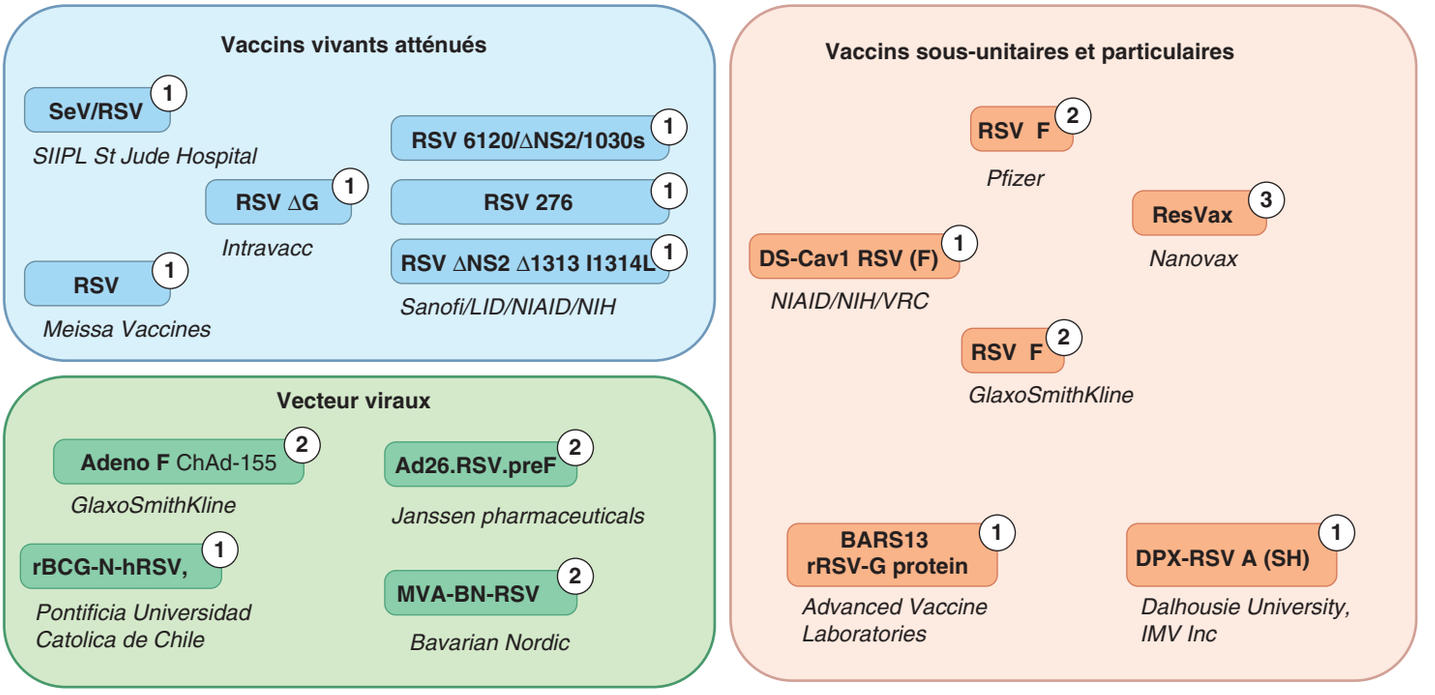


Figure 7. Résumé des candidats vaccins du virus respiratoire syncytial (RSV) actuellement en cours d'évaluation clinique. Le numéro indique la phase des essais les plus avancés pour le candidat. Le nom des laboratoires à l'origine des essais est indiqué en italique. Adapté de RSV Vaccine and mAb Snapshot - PATH Vaccine Resource Library - https://vaccineresources.org.

mutants thermosensibles. Depuis 1995, ils sont produits par génétique inverse, permettant l'introduction de mutations spécifiques et/ou la délétion de gènes. Les stratégies d'atténuation les plus prometteuses sont les délétions de la protéine M2-2, ce qui perturbe l'équilibre transcription-réplication, et de la protéine NS2 impliquée dans le contrôle des réponses antivirales. Des mutations ponctuelles dans la polymérase sont ajoutées pour limiter la réplication et augmenter la stabilité des candidats vaccins. En effet, la stabilité et l'innocuité de ces vaccins vivants sont cruciales en particulier en cas d'inoculation intranasale avec excrétion de virus vaccinal. Cinq essais de phase 1 sont actuellement en cours dont quatre organisés par le National Institute of Allergy and Infectious Diseases (agence du ministère de la santé américain).

Les vaccins utilisant des vecteurs viraux actuellement en développement dérivent d'adénovirus pour deux d'entre eux. L'Ad26-RSv PreF exprime une F stabilisée dans sa conformation pré-fusion pour induire une forte réponse neutralisante. Le ChAd155 dérive d'un adénovirus de chimpanzé modifié pour exprimer F, N et M2-1 pour une vaccination pédiatrique. Un troisième (MVA-BN-RSV) utilise une souche défective pour la

réplication de vaccine pour exprimer plusieurs antigènes viraux (F, G, N et M2-1).

Les stratégies reposant sur des protéines purifiées utilisent majoritairement la F comme antigène du fait de sa conservation. L'obtention de la structure de la forme pré-fusion de la F a révélé la présence d'épitopes spécifiques ciblés par des anticorps neutralisants. Les résultats obtenus chez l'animal ont confirmé les avantages d'une F stabilisée dans sa conformation pré-fusion pour la vaccination [17]. Il faut noter que parmi les six vaccins sous-unitaires actuellement en phase 1 ou 2, l'un utilise de la SH (DPX-RSV-SH) et l'autre utilise de la G (rRSV-G).

Trois autres candidats vaccins reposent sur l'administration de F en conformation pré-fusion. Le plus avancé est le candidat de Pfizer, actuellement en phase 2b chez l'adulte. Le ResVax repose sur l'administration de la protéine F sous forme de nanoparticules permettant l'induction d'une meilleure réponse immunitaire. Dans un essai de phase 3 sur plus de 10 000 patients âgés de plus de 60 ans, le ResVax n'a pas permis de prévenir les infections modérées ou sévères par le RSV. L'essai de phase 3 d'immunisation maternelle a montré une diminution des hospitalisations et des formes les plus sévères chez les nourrissons sans toutefois atteindre ses objectifs initiaux [129]. Ces résultats sont encourageants même s'ils n'ont pas permis la mise sur le marché du vaccin.

Le développement de vaccin contre le hMPV est nettement moins avancé mais repose sur les mêmes stratégies : vaccins vivants et vaccins sous-unitaires. Les vaccins les plus avancés sont les vaccins recombinants avec des résultats prometteurs chez l'animal [130]. Un vaccin recombinant dans lequel la P a été remplacée par celle du métapneumovirus aviaire est le seul à avoir été testé chez l'homme ; il s'est révélé trop atténué même chez les enfants séronégatifs pour hMPV [131]. La majorité des vaccins sous-unitaires reposent sur l'utilisation de de la F comme antigène. L'identification d'épitopes communs entre les F du RSV et du hMPV pourrait ouvrir la voie à la mise au point d'un vaccin « pan-pneumovirus humains » [132].

Conclusion

Depuis la découverte du RSV en 1955 et du hMPV en 2001, de nombreuses connaissances se sont accumulées concernant l'importance de ces pathogènes en santé humaine, leur épidémiologie et leurs mécanismes de réplication. De nombreux antiviraux ont été testés chez l'homme mais très peu sont aujourd'hui utilisables. La résolution récente des structures des polymérases de ces deux virus représente un espoir important de développement de nouveaux antiviraux spécifiques. Malgré des dizaines d'année de recherches intensives, les interactions du RSV avec l'hôte demeurent peu connues. Les capacités du RSV à contourner à la réponse immunitaire ont tenu en échec toutes les tentatives de vaccination jusqu'à ce jour. Les progrès rapides dans la compréhension de la pathogénèse de ces infections et l'intensification des essais cliniques vaccinaux permettent d'espérer la mise au point de stratégie de prévention adaptées pour les différentes populations dans un futur proche.

Déclaration de liens d'intérêts : les auteurs n'ont pas transmis de déclaration de liens d'intérêts en relation avec cet article.

Références

[1] GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global regional and national life expectancy all-cause mortality and cause-specific mortality for 249 causes of death 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 2016;**388**:1459–544.

[2] Kramer R, Duclos A, Lina B, Casalegno J-S. Cost and burden of RSV related hospitalisation from 2012 to 2017 in the first year of life in Lyon, France. *Vaccine* 2018;**36**:6591–3.

[3] Jepsen MT. Incidence and seasonality of respiratory syncytial virus hospitalisations in young children in Denmark 2010 to 2015. *Euro Surveill* 2018;**23**.

[4] Pneumonia Etiology Research for Child Health (PERCH) Study Group. Causes of severe pneumonia requiring hospital admission in children without HIV infection from Africa and Asia: the PERCH multi-country case-control study. *Lancet* 2019;**394**:757–79.

[5] Chanock R, Finberg L. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *Am J Hyg* 1957;**66**:291–300.

[6] van den Hoogen BG. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001;**7**:719–24.

[7] Afonso CL. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Arch Virol* 2016;**161**:2351–60.

[8] Van Den Hoogen BG, Osterhaus DM, Fouchier RA. Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 2004;**23**.

[9] Mitra R, Baviskar P, Duncan-Decocq RR, Patel D, Oomens AGP. The human respiratory syncytial virus matrix protein is required for maturation of viral filaments. *J Virol* 2012;**86**:4432–43.

[10] El Najjar F. Human metapneumovirus induces reorganization of the actin cytoskeleton for direct cell-to-cell spread. *PLoS Pathog* 2016;**12**:e1005922.

[11] Liljeroos L, Krzyzaniak MA, Helenius A, Butcher SJ. Architecture of respiratory syncytial virus revealed by electron cryotomography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;**110**:11133–8.

[12] Leyrat C, Paesen GC, Charleston J, Renner M, Grimes JM. Structural insights into the human metapneumovirus glycoprotein ectodomain. *J Virol* 2014;**88**:11611–6.

[13] Battles MB, McLellan JS. Respiratory syncytial virus entry and how to block it. *Nat Rev Microbiol* 2019;**17**:233–45.

[14] Trento A. Conservation of G-protein epitopes in respiratory syncytial virus (Group A) despite broad genetic diversity: is antibody selection involved in virus evolution? *J Virol* 2015;**89**:7776–85.

[15] Schildgen V. Human metapneumovirus: lessons learned over the first decade. *Clin Microbiol Rev* 2011;**24**:734–54.

[16] van den Hoogen BG. Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. *Emerg Infect Dis* 2004;**10**:658–66.

[17] McLellan JS. Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralzing antibody. *Science* 2013;**340**:1113–7.

[18] González-Reyes L. Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;**98**:9859–64.

[19] McLellan JS, Yang Y, Graham BS, Kwong PD. Structure of respiratory syncytial virus fusion glycoprotein in the postfusion conformation reveals preservation of neutralizing epitopes. *J Virol* 2011;**85**:7788–96.

[20] Battles MB. Structure and immunogenicity of pre-fusion-stabilized human metapneumovirus F glycoprotein. *Nat Commun* 2017;**8**:1–11.

[21] Biacchesi S. 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**:12877–87.

[22] Russell RF. Partial attenuation of respiratory syncytial virus with a deletion of a small hydrophobic gene is associated with elevated interleukin-1β responses. *J Virol* 2015;**89**:8974–81.

[23] Shaikh FY. Respiratory syncytial virus assembles into structured filamentous virion particles independently of host cytoskeleton and related proteins. *PLoS One* 2012;**7**:e40826.

[24] Leyrat C, Renner M, Harlos K, Huiskonen JT, Grimes JM. Structure and self-assembly of the calcium binding matrix protein of human metapneumovirus. *Structure* 2014;**22**:136–48.

[25] Forster A, Maertens GN, Farrell PJ, Bajorek M. Dimerization of matrix protein is required for budding of respiratory syncytial virus. *J Virol* 2015;**89**:4624–35.

[26] Mcphee HK. Influence of lipids on the interfacial disposition of respiratory syncytical virus matrix protein. *Langmuir* 2011;**1**:304–11.

[27] Esneau C. Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus N0-P complex in solution. *J Biol Chem* 2019;**294**:3647–60.

[28] Renner M. Nucleocapsid assembly in pneumoviruses is regulated by conformational switching of the N protein. *Elife* 2016;**5**.

[29] Galloux M. Identification and characterization of the binding site of the respiratory syncytial virus phosphoprotein to RNA-free nucleoprotein. *J Virol* 2015;**89**:3484–96.

[30] Tawar RG. Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. *Science* 2009;**326**:1279–83.

[31] Renner M. Structural dissection of human metapneumovirus phosphoprotein using small angle x-ray scattering. *Sci Rep* 2017;**7**.

[32] Canedo-Marroquín G. Modulation of host immunity by human respiratory syncytial virus virulence factors: A synergic inhibition of both innate and adaptive immunity. *Front Cell Infect Microbiol* 2017;**7**:367.

[33] Gilman MS. Structure of the respiratory syncytial virus polymerase complex. *Cell* 2019;**179**, 193-204.e14.

[34] Pan J. Structure of the human metapneumovirus polymerase phosphoprotein complex. *Nature* 2020;**577**:275–9.

[35] Tanner SJ. Crystal structure of the essential transcription antiterminator M2-1 protein of human respiratory syncytial virus and implications of its phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;**111**:1580–5.

[36] Leyrat C, Renner M, Harlos K, Huiskonen JT, Grimes JM. Drastic changes in conformational dynamics of the antiterminator M2-1 regulate transcription efficiency in Pneumovirinae. *Elife* 2014;**3**:e02674.

[37] Bermingham A, Collins P. The M2:- 2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;**96**:11259–64.

[38] Chatterjee S. Structural basis for human respiratory syncytial virus NS1-mediated modulation of host responses. *Nat Microbiol* 2017;**2**:17101.

[39] Griffiths CD. IGF1R is an entry receptor for respiratory syncytial virus. *Nature* 2020;**583**:615–9.

[40] Rincheval V. Functional organization of cytoplasmic inclusion bodies in cells infected by respiratory syncytial virus. *Nat Commun* 2017;**8**:563.

[41] Noton SL, Fearns R. Initiation and regulation of paramyxovirus transcription and replication. *Virology* 2015;**479-480**:545–54.

[42] Aljabr W. Investigating the influence of ribavirin on human respiratory syncytial virus RNA synthesis by using a high-resolution transcriptome sequencing approach. *J Virol* 2016;**90**:4876–88.

[43] Glezen WP, Taber LH, Frank AL, Kasel JA. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am J Dis Child* 1986;**140**:543–6.

[44] Tollefson SJ, Cox RG, Williams JV. Studies of culture conditions and environmental stability of human metapneumovirus. *Virus Res* 2010;**151**:54–9.

[45] Hall CB, Douglas RGJ, Geiman JM. Possible transmission by fomites of respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 1980;**141**:98–102.

[46] Kulkarni H. Evidence of respiratory syncytial virus spread by aerosol. Time to revisit infection control strategies? *Am J Respir Crit Care Med* 2016;**194**:308–16.

[47] Groothuis J, Bauman J, Malinoski F, Eggleston M. Strategies for prevention of RSV nosocomial infection. *J Perinatol* 2008;**28**:319–23.

[48] Obando-Pacheco P. Respiratory syncytial virus seasonality: a global overview. *J Infect Dis* 2018;**217**:1356–64.

[49] Meningher T. Relationships between A(H1N1)pdm09 influenza infection and infections with other respiratory viruses. *Influenza Other Respir Viruses* 2014;**8**:422–30.

[50] Sullivan SG. Where has all the influenza gone? The impact of COVID-19 on the circulation of influenza and other respiratory viruses Australia March to September 2020. *Euro Surveill* 2020;**25**.

[51] Nair H. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2010;**375**:1545–55.

[52] Shi T. Global regional and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet* 2017;**390**:946–58.

[53] Stockman LJ, Curns AT, Anderson LJ, Fischer-Langley G. Respiratory syncytial virus-associated hospitalizations among infants and young children in the united states 1997-2006. *Pediatr Infect Dis J* 2012;**31**:5–9.

[54] Anderson E. Prevalence and characteristics of human metapneumovirus infection among hospitalized children at high risk for severe lower respiratory tract infection. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2012;**1**.

[55] Lee YI. Risk factors associated with death in patients with severe respiratory syncytial virus infection. *J Microbiol Immunol Infect* 2016;**49**:737–42.

[56] Hall CB. Respiratory syncytial virus-associated hospitalizations among children less than 24 months of age. *Pediatrics* 2013;**132**:e341–8.

[57] Edwards KM. Burden of human metapneumovirus infection in young children. *N Engl J Med* 2013;**368**:633–43.

[58] Williams JV. Population-based incidence of human metapneumovirus infection among hospitalized children. *J Infect Dis* 2010;**201**:1890–8.

[59] Martinez-Rodriguez C, Banos-Lara MD. HMPV in immunocompromised patients: frequency and severity in pediatric oncology patients. *Pathogens* 2020;**9**:51.

[60] Jartti T, Bønnelykke K, Elenius V, Feleszko W. Role of viruses in asthma. *Semin Immunopathol* 2020;**42**:61–74.

[61] Wu P. Evidence of a causal role of winter virus infection during infancy in early childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;**178**:1123–9.

[62] Blanken MO, Koffijberg H, Nibbelke EE, Rovers MM, Bont L. Prospective validation of a prognostic model for respiratory syncytial virus bronchiolitis in late preterm infants: a multicenter birth cohort study. *PLoS One* 2013;**8**.

[63] Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Engl J Med* 2005;**352**:1749–59.

[64] Walsh EE, Peterson DR, Falsey AR. Human metapneumovirus infections in adults: another piece of the puzzle. *Arch Intern Med* 2008;**168**:2489–96.

[65] Hall CB, Long CE, Schnabel KC. Respiratory syncytial virus infections in previously healthy working adults. *Clin Infect Dis* 2001;**33**:792–6.

[66] Shi T. The etiological role of common respiratory viruses in acute respiratory infections in older adults: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis* 2020;**222**:S563–9.

[67] Colosia AD. The epidemiology of medically attended respiratory syncytial virus in older adults in the United States: a systematic review. *PLoS One* 2017;**12**:e0182321.

[68] Lee N. High morbidity and mortality in adults hospitalized for respiratory syncytial virus infections. *Clin Infect Dis* 2013;**57**:1069–77.

[69] Troeger C. Estimates of the global regional and national morbidity mortality and aetiologies of lower respiratory tract infections in 195 countries: a systematic analysis for the global burden of disease study 2015. *Lancet Infect Dis* 2017;**17**:1133–61.

[70] Falsey AR. Respiratory syncytial virus and other respiratory viral infections in older adults with moderate to severe influenza-like illness. *J Infect Dis* 2014;**209**:1873–81.

[71] Widmer K. Rates of hospitalizations for respiratory syncytial virus human metapneumovirus and influenza virus in older adults. *J Infect Dis* 2012;**206**:56–62.

[72] Ackerson B. Severe morbidity and mortality associated with respiratory syncytial virus versus influenza infection in hospitalized older adults. *Clin Infect Dis* 2019:69.

[73] Jain S. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. adults. *N Engl J Med* 2015;**373**:415–27.

[74] Chemaly RF, Shah DP, Boeckh MJ. Management of respiratory viral infections in hematopoietic cell transplant recipients and patients with hematologic malignancies. *Clin Infect Dis* 2014;**59**:S344–51, doi:10.1093.cid.ciu623.

[75] Kim Y-J. Respiratory syncytial virus in hematopoietic cell transplant recipients: factors determining progression to lower respiratory tract disease. *J Infect Dis* 2014;**209**:1195–204.

[76] Shah DP, Shah PK, Azzi JM, Chaer El, Chemaly RF. Human metapneumovirus infections in hematopoietic cell transplant recipients and hematologic malignancy patients: a systematic review. *Cancer Lett* 2016;**379**:100–6.

[77] Kumar D. A prospective molecular surveillance study evaluating the clinical impact of community-acquired respiratory viruses in lung transplant recipients. *Transplantation* 2010;**89**:1028–33.

[78] Zwaans WA, Mallia P, van Winden ME, Rohde GG. The relevance of respiratory viral infections in the exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease-A systematic review. *J Clin Virol* 2014;**61**:181–8.

[79] Koul PA, Mir H, Akram S, Potdar V, Chadha MS. Respiratory viruses in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Lung India* 2017;**34**:29–33.

[80] Elphick HE. Validity and reliability of acoustic analysis of respiratory sounds in infants. *Arch Dis Child* 2004;**89**:1059–63.

[81] Johnson JC, Jayadevappa R, Baccash PD, Taylor L. Nonspecific presentation of pneumonia in hospitalized older people: age effect or dementia? *J Am Geriatr Soc* 2000;**48**:1316–20.

[82] Hasvold J, Sjoding M, Pohl K, Cooke CR, Hyzy RC. The role of human metapneumovirus in the critically ill adult patient. *J Crit Care* 2016;**31**:233–7.

[83] Nam HH, Ison MG. Respiratory syncytial virus infection in adults. *The Br Med J* 2019;**366**.

[84] Zhang L, Peeples ME, Boucher RC, Collins PL, Pickles RJ. Respiratory syncytial virus infection of human airway epithelial cells is polarized specific to ciliated cells and without obvious cytopathology. *J Virol* 2002;**76**:5654–66.

[85] Ackermann MR. Lamb model of respiratory syncytial virus-associated lung disease: insights to pathogenesis and novel treatments. *ILAR J* 2014;**55**:4–15.

[86] 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* 2005;**191**:1225–32.

[87] Kim HW. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol* 1969;**89**:422–34.

[88] Peebles RS, Graham BS. Pathogenesis of respiratory syncytial virus infection in the murine model. *Proc Am Thorac Soc* 2005;**2**:110–5.

[89] Legg JP, Hussain IR, Warner JA, Johnston SL, Warner JO. Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;**168**:633–9.

[90] Nicholson EG. Robust cytokine and chemokine response in nasopharyngeal secretions: association with decreased severity in children with physician diagnosed bronchiolitis. *J Infect Dis* 2016;**214**:649–55.

[91] Hasegawa K. Respiratory syncytial virus genomic load and disease severity among children hospitalized with bronchiolitis: multicenter cohort studies in the United States and Finland. *J Infect Dis* 2015;**211**:1550–9.

[92] DeVincenzo JP. Viral load drives disease in humans experimentally infected with respiratory syncytial virus. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;**182**:1305–14.
[93] Ascough S, Paterson S, Chiu C. Induction and subversion of human protective immunity: contrasting influenza and respiratory syncytial virus. *Front Immunol* 2018;**9**:323.
[94] Kolli D. Human metapneumovirus glycoprotein G inhibits TLR4-dependent signaling in monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2011;**187**:47–54.
[95] Rallabhandi P. Respiratory syncytial virus fusion protein-induced toll-like receptor 4 (TLR4) signaling is inhibited by the TLR4 antagonists Rhodobacter sphaeroides lipopolysaccharide and eritoran (E5564) and requires direct interaction with MD-2. *MBio* 2012;**3**.
[96] Sedeyn K, Schepens B, Saelens X. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins 1 and 2: exceptional disrupters of innate immune responses. *PLoS Pathog* 2019;**15**:e1007984.
[97] Ren J. Human metapneumovirus M2-2 protein inhibits innate immune response in monocyte-derived dendritic cells. *PLoS One* 2014;**9**:e91865.
[98] Céspedes PF. Surface expression of the hRSV nucleoprotein impairs immunological synapse formation with T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;**111**:E3214–23.
[99] Shafagati N, Williams J. Human metapneumovirus - what we know now. *F1000 Research* 2018;**7**:135.
[100] 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* 2015;**53**:3738–49.
[101] American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases, American Academy of Pediatrics Bronchiolitis Guidelines Committee. Updated guidance for palivizumab prophylaxis among infants and young children at increased risk of hospitalization for respiratory syncytial virus infection. *Pediatrics* 2014;**134**:415–20.
[102] Shah JN, Chemaly RF. Management of RSV infections in adult recipients of hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2011;**117**:2755–63.
[103] Waghmare A. Respiratory syncytial virus lower respiratory disease in hematopoietic cell transplant recipients: viral RNA detection in blood antiviral treatment and clinical outcomes. *Clin Infect Dis* 2013;**57**:1731–41.
[104] Hirsch HH. Fourth european conference on infections in leukaemia (ECIL-4): guidelines for diagnosis and treatment of human respiratory syncytial virus parainfluenza virus metapneumovirus rhinovirus and coronavirus. *Clin Infect Dis* 2013;**56**:258–66.
[105] Manuel O, Estabrook M. RNA respiratory viral infections in solid organ transplant recipients: Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin Transplant* 2019;**33**:e13511.
[106] Akhmedov M. Respiratory syncytial virus and human metapneumovirus after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Impact of the immunodeficiency scoring index viral load and ribavirin treatment on the outcomes. *Transpl Infect Dis* 2020, doi:10.1111.tid.13276.
[107] Palivizumab a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. The IMpact-RSV Study Group. *Pediatrics* 1998;**102**:531–7.
[108] Anderson EJ, Carosone-Link P, Yogev R, Yi J, Simoes EAF. Effectiveness of palivizumab in high-risk infants and children: a propensity score weighted regression analysis. *Pediatr Infect Dis J* 2017;**36**:699–704.
[109] Domachowske JB. 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* 2018;**37**:886–92.
[110] Detalle L. Generation and characterization of ALX-0171 a potent novel therapeutic nanobody for the treatment of respiratory syncytial virus infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;**60**:6–13.
[111] Schuster JE. A broadly neutralizing human monoclonal antibody exhibits in vivo efficacy against both human metapneumovirus and respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 2015;**211**:216–25.
[112] Williams JV. A recombinant human monoclonal antibody to human metapneumovirus fusion protein that neutralizes virus in vitro and is effective therapeutically in vivo. *J Virol* 2007;**81**:8315–24.
[113] DeVincenzo JP, Whitley RJ, Mackman RL, Scaglioni-Weinlich C, Harrison L, Farrell E, et al. Oral GS-5806 Activity in a Respiratory Syncytial Virus Challenge Study. *N Engl J Med* 2014;**371**(8):711–22. Available from: http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1401184.
[114] Stevens M. Antiviral activity of oral JNJ-53718678 in healthy adult volunteers challenged with respiratory syncytial virus: a placebo-controlled study. *J Infect Dis* 2018;**218**:1–9.
[115] DeVincenzo J, Tait D, Efthimiou J, Mori J, Kim Y-I, Thomas E, et al. A randomized placebo-controlled respiratory syncytial virus human challenge study of the antiviral efficacy safety and pharmacokinetics of RV521 an inhibitor of the RSV-F protein. *Antimicrob Agents Chemother* 2020;**64**(2):1–13.
[116] Marty FM, Chemaly RF, Mullane KM, Lee D-G, Hirsch HH, Small CB, et al. A Phase 2b, randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter study evaluating antiviral effects, pharmacokinetics, safety, and tolerability of presatovir in hematopoietic cell transplant recipients with respiratory syncytial virus (RSV) infection. *Clin Infect Dis* 2019, doi:10.1093.cid.ciz1167.
[117] Chemaly RF, Dadwal SS, Bergeron A, Ljungman P, Kim Y-J, Cheng G-S, et al. A phase 2 randomized double-blind placebo-controlled trial of presatovir for the treatment of respiratory syncytial virus upper respiratory tract infection in hematopoietic-cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2019, doi:10.1093.cid.ciz1166.
[118] Bond S, Draffan AG, Fenner JE, Lambert J, Lim CY, Lin B, et al. 1,2,3,9b-Tetrahydro-5H-imidazo[2,1-a]isoindol-5-ones as a new class of respiratory syncytial virus (RSV) fusion inhibitors. Part 2: identification of BTA9881 as a preclinical candidate. *Bioorg Med Chem Lett* 2015;**25**(4):976–81.
[119] Stevens M, Rusch S, DeVincenzo J, Kim YI, Harrison L, Meals EA, et al. Antiviral activity of oral JNJ-53718678 in healthy adult volunteers challenged with respiratory syncytial virus: A placebo-controlled study. *J Infect Dis* 2018:748–56.
[120] Martinón-Torres F, Rusch S, Huntjens D, Remmerie B, Vingerhoets J, McFadyen K, et al. Pharmacokinetics, safety and antiviral effects of multiple doses of the respiratory syncytial virus fusion protein inhibitor, JNJ-53718678, in infants hospitalized with RSV infection: a randomized phase 1b study. *Clin Infect Dis* 2020.
[121] Douglas JL, Panis ML, Ho E, Lin KY, Krawczyk SH, Grant DM, et al. Small molecules VP-14637 and JNJ-2408068 inhibit respiratory syncytial virus fusion by similar mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;**49**(6):2460–6.
[122] DeVincenzo J, Lambkin-Williams R, Wilkinson T, Cehelsky J, Nochur S, Walsh E, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;**107**(19):8800–5.
[123] Gottlieb J, Zamora MR, Hodges T, Musk AW, Sommerwerk U, Dilling D, et al. ALN-RSV01 for prevention of bronchiolitis obliterans syndrome after respiratory syncytial virus infection in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2015;**35**(2):1–9. Available from: https://doi.org/10.1016/j.healun.2015.08.012.
[124] Beigel JH, Nam HH, Adams PL, Krafft A, Ince WL, El-Kamary SS, et al. Advances in respiratory virus therapeutics - A meeting report from the 6th ISIRV Antiviral Group conference. *Antiviral Res* 2019;**167**: 45–67.
[125] DeVincenzo JP, McClure MW, Symons JA, Fathi H, Westland C, Chanda S, et al. Activity of oral ALS-008176 in a respiratory syncytial virus challenge study. *N Engl J Med* 2015;**373**(21):2048–58. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26580997.
[126] Chapman J, Abbott E, Alber DG, Baxter RC, Bithell SK, Henderson EA, et al. RSV604, a novel inhibitor of respiratory syncytial virus replication. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;**51**(9):3346–53.
[127] Battles MB. Molecular mechanism of respiratory syncytial virus fusion inhibitors. *Nat Chem Biol* 2016;**12**:87–93.
[128] Deffrasnes C, Hamelin M-E, Prince GA, Boivin G. Identification and evaluation of a highly effective fusion inhibitor for human metapneumovirus. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;**52**:279–87.
[129] Madhi SA. Vaccination of pregnant women with respiratory syncytial virus vaccine and protection of their infants. *N Engl J Med* 2020;**383**:426–39.
[130] Ogonczyk Makowska D, Hamelin M-E, Boivin G. Engineering of live chimeric vaccines against human metapneumovirus. *Pathogens* 2000; **9**.
[131] Karron RA, San Mateo J, Wanionek K, Collins PL, Buchholz UJ. Evaluation of a live attenuated human metapneumovirus vaccine in adults and children. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2018;**7**:86–9.
[132] Corti D. Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody. *Nature* 2013;**501**:439–43.

G. Cosentino.
K. Marougka.
Université Paris-Saclay, Inserm, Université de Versailles Saint-Quentin, UMR 1173 (2I), 78000 Versailles, France.

M.-A. Rameix-Welti (marie-anne.welti@aphp.fr).
Université Paris-Saclay, Inserm, Université de Versailles Saint-Quentin, UMR 1173 (2I), 78000 Versailles, France.
Laboratoire de microbiologie, Hôpital Ambroise-Paré, AP–HP, Université Paris-Saclay, 9, avenue Charles-de-Gaulle, 92100 Boulogne-Billancourt, France.

Toute référence à cet article doit porter la mention : Cosentino G, Marougka K, Rameix-Welti MA. Virus respiratoire syncytial et métapneumovirus humain. EMC - Biologie médicale 2020;0(0):1-14 [Article 90-55-0067-A].

Disponibles sur www.em-consulte.com

Arbres décisionnels
Iconographies supplémentaires
Vidéos/ Animations
Documents légaux
Information au patient
Informations supplémentaires
Auto- évaluations
Cas clinique

Chapitre 2. Généralités sur le Virus Respiratoire Syncytial

1. Composition des virions

1.1. Morphologie des virions et des filaments viraux

Les virions ont majoritairement une forme filamenteuse, de 200 nm à 2 µm et un diamètre de 70 nm à 190 nm (Ke et al. 2018). Mais il existe également des formes sphériques de 100 nm à 1 µm et asymétriques (Figure 1). (Kiss et al. 2014; Liljeroos et al. 2013; Bächi and Howe 1973).

L'enveloppe virale du RSV est composée d'une membrane issue des cellules infectées dans laquelle sont enchâssées les trois protéines virales transmembranaires F (pour Fusion), G (pour Glycoprotéine) et SH (pour Small Hydrophobic). Sur les virions, la protéine F peut présenter 2 conformations bien distinctes : forme pré-fusion et post-fusion sur les virions. De manière intéressante, la prédominance de forme pré et post fusion à la surface est corrélé à la forme des virions (Figure 1) (Liljeroos et al. 2013; Ke et al. 2018).

La surface interne de l'enveloppe virale est tapissée par la protéine de matrice M. Des zones dépourvues de M peuvent être observées en particulier sur les virions sphériques ou asymétriques. Ces données suggèrent que la protéine M maintient la forme filamenteuse des virions (Kiss et al. 2014; Ke et al. 2018; Liljeroos et al. 2013). Des données récentes de cryo-électromicroscopie montrent l'arrangement de la M en dimères, eux-mêmes organisées en matrice. Ces dimères semblent conditionner la disposition de la protéine F en surface (Conley et al. 2021; Sibert et al. 2021).

Au centre du virion se trouve la ribonucléocapside. Elle se compose du génome viral, un ARN négatif simple brin, encapsidé par la nucléoprotéine N sous forme d'une hélice gauche d'un pas de 68 Å (Bakker et al. 2013; Tawar et al. 2009). Les virions semblent renfermer de multiples copies du génome viral, en particulier dans les formes sphériques qui peuvent contenir jusqu'à 9 génomes (Kiss et al. 2014). La polymérase (L) et son cofacteur, la phosphoprotéine (P) sont associés à la ribonucléocapside. Dans les virions filamenteux la protéine M2-1 semble tapisser la première couche formée par M et ainsi ancrer de la RNP à l'enveloppe (Ke et al. 2018; Kiss et al. 2014; Liljeroos et al. 2013).

Des filaments viraux sont observés à la surface des cellules infectées par le RSV en microscopie à fluorescence ou en microscopie électronique. Ces filaments peuvent mesurer entre 0,5 et

12 µm de long pour un diamètre moyen de 130 nm (Ke et al. 2018). Ils sont marqués par des anticorps anti-F, M, N ou P et semblent abriter des ARN viraux (Shaikh, Utley, et al. 2012). Ils sont considérés comme des virions en cours d'assemblage ou assemblés qui n'ont pas été libérés.

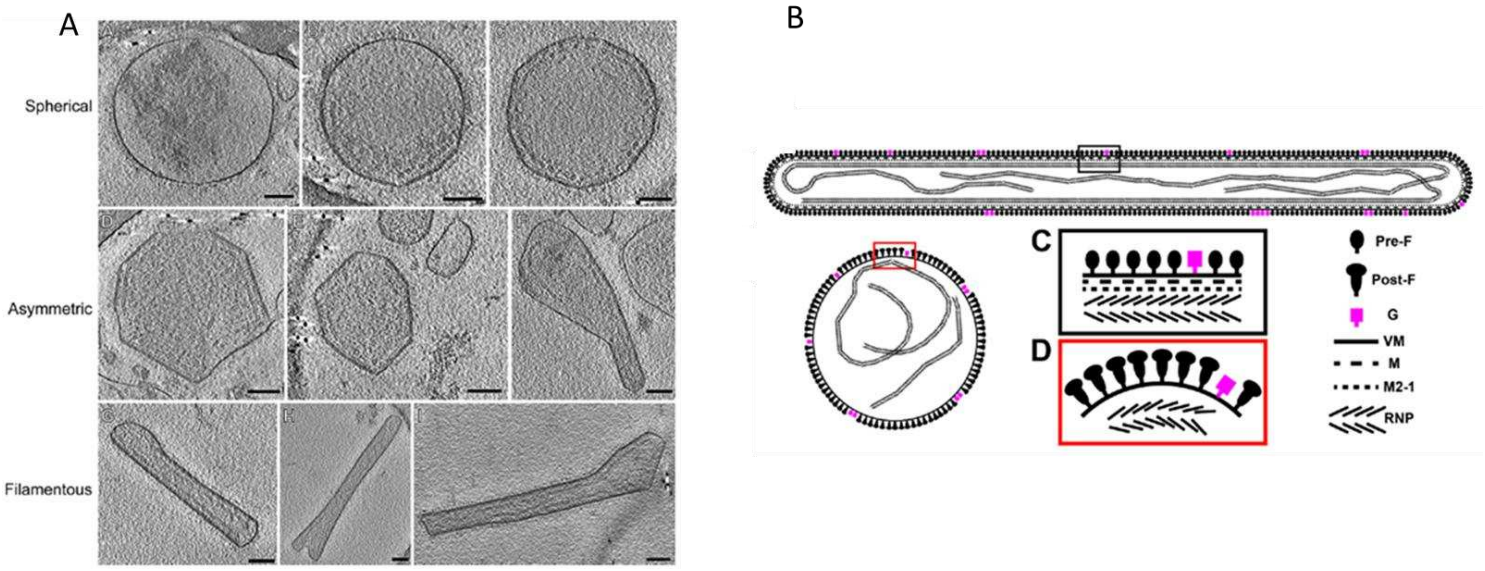


Figure 1. Structure des virions du RSV. A) Images des différentes morphologies observées en microscopie cryo-électromicroscopie. B) Représentation schématique des structures filamenteuses et sphériques des virions ainsi que la composition membranaire et répartition des formes pré-fusion et post-fusion de la protéine F. Extrait de Kiss 2014.

1.2. Protéines virales et données structurales

Le génome du RSV, un acide ribonucléique (ARN), est de polarité négative non segmenté. D'une taille de 15 kb, il comporte 10 unités de transcription. Chacune d'elles est encadrée par une séquence promotrice (*Gene Start*) et une séquence de terminaison de transcription (*Gene End*). Les extrémités 5' (*Leader*) et 3' (*Trailer*) contiennent les signaux de réplication génomique (Kuo et al. 1996).

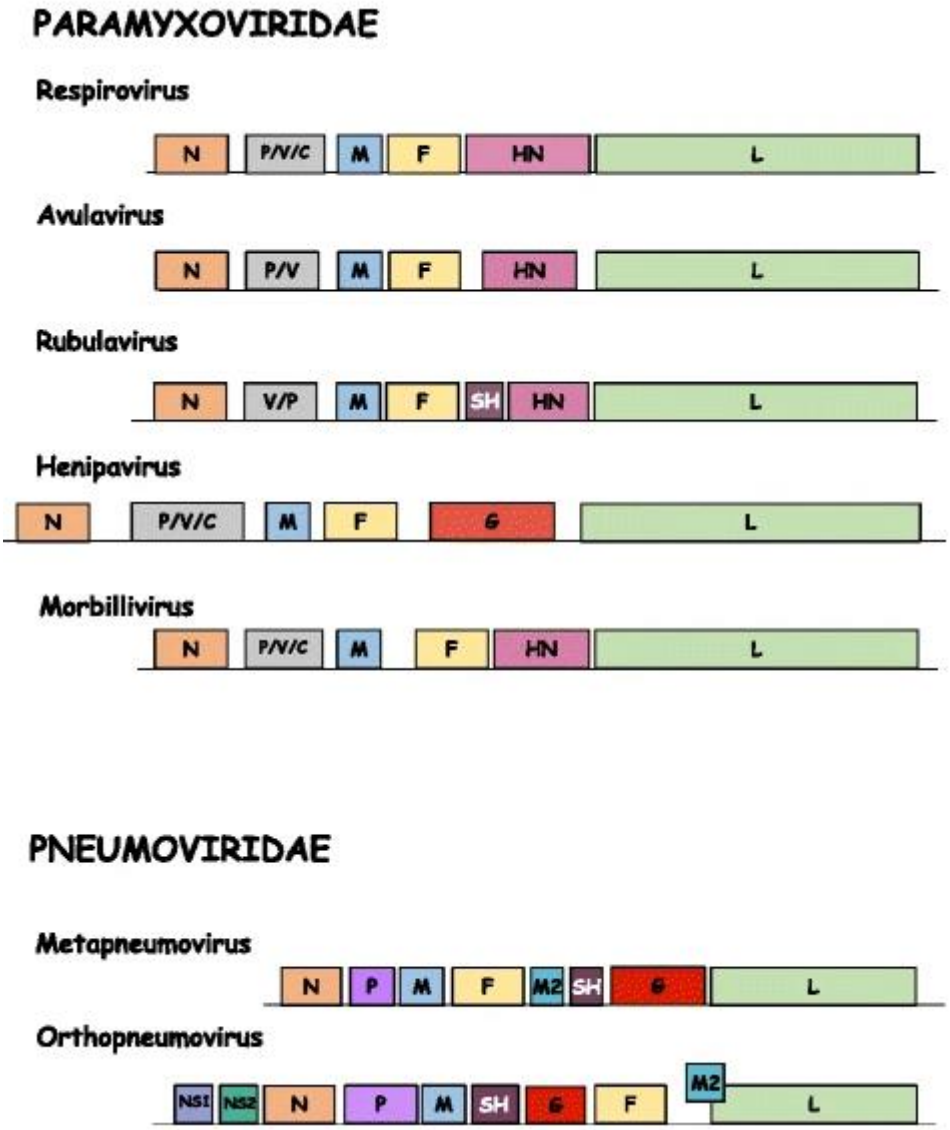


Figure 2. Organisation génomique de la famille des Paramyxovirus et Pneumoviridae. L'organisation génomique de la nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P), la protéine matricielle (M), la protéine de fusion (F) et l'ARN polymérase dépendante de l'ARN (L), est semblable entre les deux familles. La protéine de fixation correspond aux protéines notées H, HN ou G, la petite protéine hydrophobe SH, l'ORF M2, et les protéines non structurales NS1, NS2 Extrait de Shahriari 2016.

La Figure 2 permet de se rendre compte de la complexité du génome du RSV (*Orthopneumovirus*) par rapport aux autres *Mononegavirales* (MNV). Il code notamment pour deux protéines non structurales en 3' et la 9ème unité de transcription (M2) code pour deux protéines distinctes. Le génome du RSV code pour 11 protéines listées dans le tableau 1.

Tableau 1. Protéines virales du RSV, masse et structure.

Protéine Virale	Poids moléculaire	Structure
Glycoprotéine G	95-180 kDa	RMN (Sugawara et al. 2002)
Fusion F	F1 55 kDa F2 15 kDa	Rayon X cristallographie (McLellan, Ray, and Peeples 2013) Ectodomaine
Small Hydrophobic SH	Toute longueur 7.5 kDa Tronquée 4.5 kDa	RMN (Gan et al. 2012)
Matrice M	28 kDa	Cristallographie (Money et al. 2009; Conley et al. 2021; Forster et al. 2015)
Nucléocapside N	42 kDa	Cristallographie (Tawar et al. 2009; Bakker et al. 2013)
Polymérase L	250 kDa	Cryo-EM (Gilman et al. 2019)
Phosphoprotéine P	35 kDa	Cryo-EM (Pereira et al. 2017; Gilman et al. 2019; Cardone et al. 2021; Dongdong Cao et al. 2020)
M2-1	25 kDa	Cristallographie (Blondot et al. 2012; Tanner et al. 2014; Selvaraj et al. 2018; Gao et al. 2020)
M2-2	22 kDa	x
Non structurale NS1	17.5 kDa	Rayon X cristallographie (Chatterjee et al. 2017)
Non structurale NS2	14.5 kDa	x

Ce tableau décrit les différentes protéines virales codées par le génome du RSV, leurs poids moléculaires et les articles décrivant leur structure et la méthode d'observation comme la résonance magnétique nucléaire (RMN), la cryo-électromicroscopie (cryo-EM) ou cristallographie par rayon X.

1.2.1. Les glycoprotéines de surface

Glycoprotéine G

La glycoprotéine G participe à l'attachement du virion sur la membrane cellulaire (Levine, Klaiber-Franco, and Paradiso 1987). Elle va notamment reconnaitre le récepteur au CX3C (CX3CR1) (Tripp et al. 2001), les héparanes (Feldman, RM, and JA 1999) et glycoaminoglycanes sulfatés (GAGs) (Hallak, Kwilas, and Peeples 2007) présents sur la surface des membranes. La protéine G est également importante dans le contrôle des réponses immunitaires. En effet, son interaction avec le CX3CR1 inhibe le recrutement des cellules immunitaires et elle pourrait aussi masquer les sites antigéniques de la protéine F (Battles and McLellan 2019). De plus, sa forme sécrétée jouerait le rôle de leurre immunitaire (Ray et al. 2001; Chirkova et al. 2013). Bien qu'elle participe à l'attachement, elle n'est pas indispensable

à la multiplication virale et les virus Delta-G montrent une atténuation *in vitro* et une diminution de l'infectiosité *in vivo* (Teng and Collins 2002; Karron et al. 1997).

La protéine G comporte environ 290 acides aminés correspondant à un poids moléculaire initial de 32 kDa. C'est une protéine transmembranaire de type II (Figure 3) qui comprend une queue cytoplasmique (en N-terminal), un domaine transmembranaire et un ectodomaine en C-ter. Ce dernier se compose de deux domaines peu structurés de type mucine encadrant une boucle maintenue par 2 ponts disulfures appelée *Cystine nose* (McLellan, Ray, and Peeples 2013). Cette structure serait la séquence de reconnaissance du CX3CR1 cellulaire. Ce niveau de séquence est très conservé. Au contraire, les régions qui l'encadrent sont très peu conservées, peu structurées et richement glycosylées. La glycoprotéine G est la protéine la plus variable des protéines du RSV avec moins de 40% d'identité entre les G des RSV de groupe A et de groupe B (Mufson et al. 1985). Sa glycosylation varie selon le type cellulaire. En effet, dans les lignées cellulaires immortalisés comme les HEp-2, la protéine G présente une masse d'environ 95 kDa, mais cette masse peut atteindre 180 kDa dans les cellules bronchiques différenciées (King et al. 2021). La forme soluble de la protéine G est produite à partir du codon alternatif (M48) (S. Roberts et al. 1994). Après sa synthèse, elle va subir une coupure protéolytique du domaine transmembranaire restant, permettant la libération la protéine G. Cette forme jouerait plutôt un rôle de leurre immunitaire empêchant l'action des leucocytes (Battles and McLellan 2019).

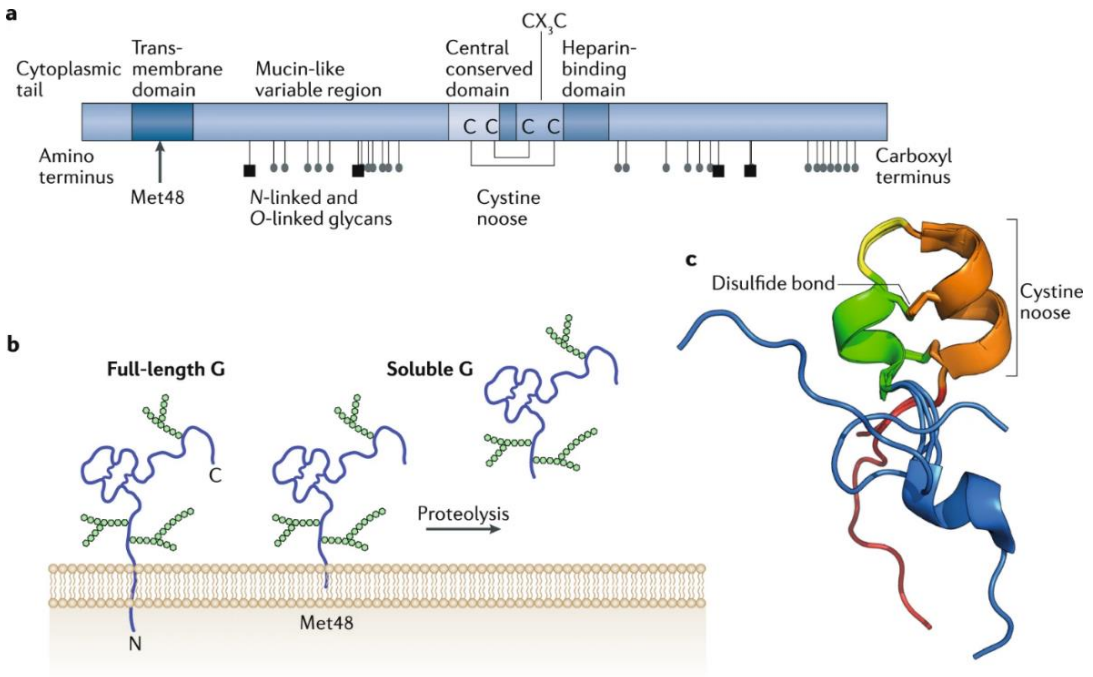


Figure 3. Structure de la glycoprotéine G. a) Représentation des domaines protéiques et des modifications post-traductionnelles b) Schéma des deux isoformes de la protéine G avec la forme

entière (à gauche) et de la forme soluble (à droite) c) Structure des parties adjacentes au domaine cystine noose avec en bleu extrémité N-ter et en rouge C-ter. Les deux liaisons disulfures dans le nœud de cystine sont représentées comme des bâtons reliant les hélices. Extrait de Battles 2019.

Protéine de fusion F

La protéine de fusion F possède deux rôles principaux. Tout d'abord, elle va se lier aux récepteurs cellulaires tels que l'IGFR1 et la nucléoline (Griffiths et al. 2020). Elle va ensuite permettre la fusion de l'enveloppe avec la membrane de la cellule cible permettant la libération du génome viral dans le cytoplasme cellulaire. La fusion des membranes des cellules infectées en syncytium est caractéristique et va donner son nom au RSV.

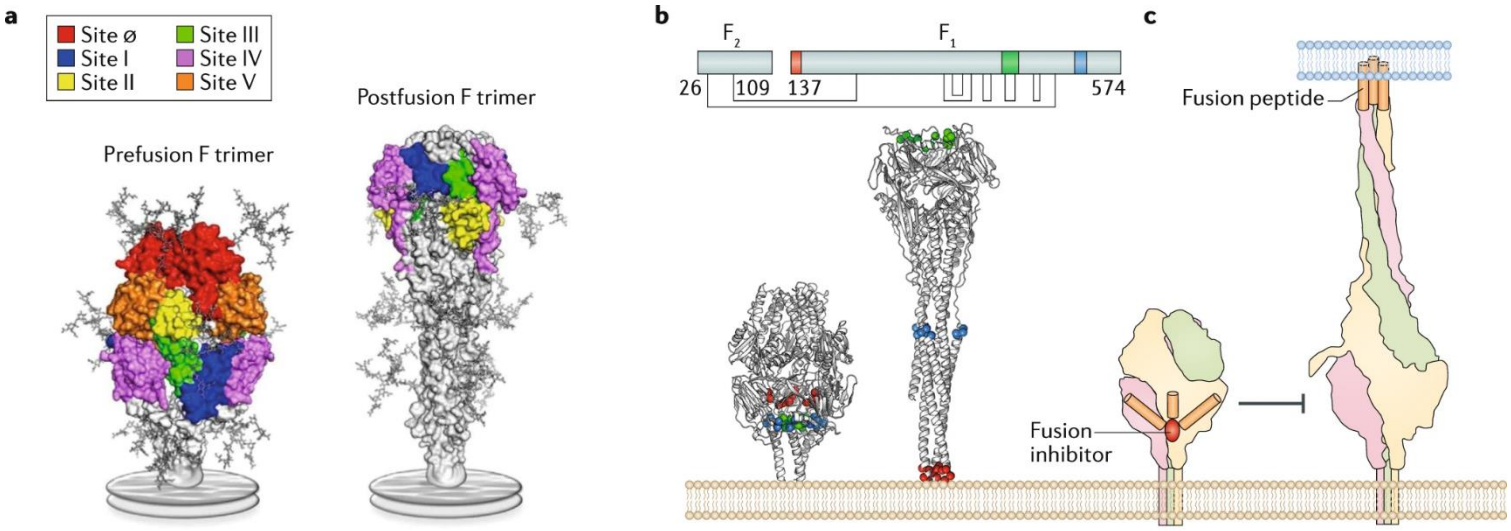


Figure 4. Structure et localisation des sites antigéniques de la protéine de Fusion F. a) Localisation des sites antigéniques majeurs selon la conformation pré-fusion et post-fusion de la protéine F. b) Les mutations d'échappement aux inhibiteurs de fusion sont colorées en orange, vert et bleu c) Représentation schématique de la forme pré-fusion (gauche) et pré-hairpin (à droite) ainsi que le point de blocage des inhibiteurs de fusion. Extrait de Battles 2019.

La protéine F est une protéine homotrimérique transmembranaire de type I (Yin et al. 2006). Elle comprend un large ectodomaine en N-ter, un domaine transmembranaire et un court domaine intra-cytoplasmique en C-ter (FCT) (Figure 4). Elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur F0 de 574 acides aminés (Collins, Huang, and Wertz 1984) qui va être clivé par des protéases « *furin-like* » dans l'appareil de Golgi. Un peptide de 27 acides aminés est éliminé. La forme mature de F comprend 2 sous-unités protéiques, F1 (55 kDa) et F2 (15 kDa), qui restent liées entre elles par des ponts disulfures.

La F est une protéine de fusion de type I, comme l'hémagglutinine des virus Influenza. L'ectodomaine peut adopter 2 conformations : la forme pré-fusion (instable) et la forme post-fusion (stable). Lors de la fusion, un peptide hydrophobe situé en N-ter des protomères F1, appelé peptide de fusion, va s'enchâsser dans les membranes cibles. La protéine F va ensuite se replier permettant le rapprochement des membranes de l'enveloppe virale et cellulaire entrainant leur fusion (Battles and McLellan 2019).

Au contraire de la G, la F est très conservée avec 90% d'identité entre les F des RSV de groupes A et B. Elle est la cible d'anticorps neutralisants bloquant l'infection. Certains sites antigéniques comme les sites I, II, III IV sont présents sur les formes pré et post-fusion tandis que les sites 0 et V sont spécifiques de la forme pré-fusion (Figure 4). L'existence de 2 conformations antigéniquement distinctes de la F est un élément très important à prendre compte pour le développement d'anticorps thérapeutiques ou de vaccins (Jones et al. 2019).

Protéine SH

Les fonctions de la protéine Small hydrophobic (SH) sont encore mal connues. Elle permettrait d'augmenter l'efficacité de l'infection virale chez les mammifères (Whitehead et al. 1999; Bukreyev et al. 1997) bien que sa présence ne soit pas nécessaire *in vitro* (Bukreyev et al. 1997). Comme pour d'autre *paramyxovirus* (PIV5, le virus des oreillons…) elle induirait un blocage de l'apoptose des cellules infectées (Fuentes et al. 2007).

La protéine SH est une protéine transmembranaire de type II très conservée de 64 à 65 acides aminés (M. Chen et al. 2000). Durant l'infection, SH peut être retrouvée sous 4 formes selon son niveau de glycosylation et sa taille. La forme entière non glycosylée est majoritairement retrouvée. Son domaine transmembranaire est constitué d'une hélice hydrophobe dont la partie C-ter forme une queue cytosolique. Comme le montre la Figure 5, elle s'assemble en homopentamère formant un pore ionique (viroporine) dans la membrane (Li et al. 2014; Araujo et al. 2016). Elle s'accumule principalement au niveau de structures riches en lipides tel que les membranes du réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et la membrane plasmique (radeau lipidique) tandis que de faibles quantités sont retrouvées dans les filaments viraux matures (Rixon et al. 2004).

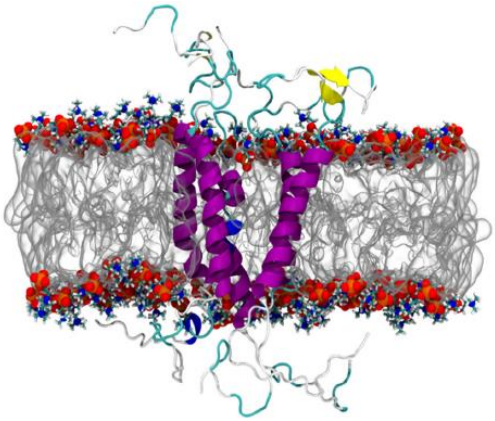


Figure 5. Structure de la protéine Small Hydrophobic. Modèle structural de la protéine SH homopentamérique en vue de côté en membrane palmitoyl-oleoyl-phosphatidyl-choline. La partie N-terminale a une orientation intracellulaire et la partie C-ter a une orientation extracellulaire. Extrait de Araujo 2016.

Protéine de matrice M

La protéine structurale de matrice M tapisse la surface interne de l'enveloppe virale (Kiss et al. 2014). Elle joue un rôle clé dans l'assemblage et le bourgeonnement viral ainsi que dans la maturation des filaments viraux (Mitra et al. 2012; Forster et al. 2015). Elle présente des sites d'interaction avec la protéine P et semblerait rentrer en contact avec M2-1 (M Bajorek et al. 2021; Kiss et al. 2014). Ces éléments laissent supposer que la protéine M fait le lien entre des protéines de la RNP et la membrane plasmique (M Bajorek et al. 2021).

La protéine M (Figure 6) est composée de 2 domaines, un domaine N-terminal et un domaine C-terminal, composés en grande partie de feuillet β (Money et al. 2009). Sa structure lui permet d'établir des interactions protéine-lipide et protéine-protéine (Money et al. 2009). Les protéines M s'associent en dimères (Forster et al. 2015; Trevisan et al. 2018) qui s'assemblent eux-mêmes en oligomères d'ordre supérieur au contact des lipides (M. Bajorek et al. 2014). Lors de l'infection, la protéine M est retrouvée au niveau des corps d'inclusion et du noyau cellulaire. Cette localisation suggère un rôle de M dans la régulation de la synthèse des ARN cellulaires et/ou le transport des RNPs et/ou dans l'assemblage (Ghildyal et al. 2003; 2005).

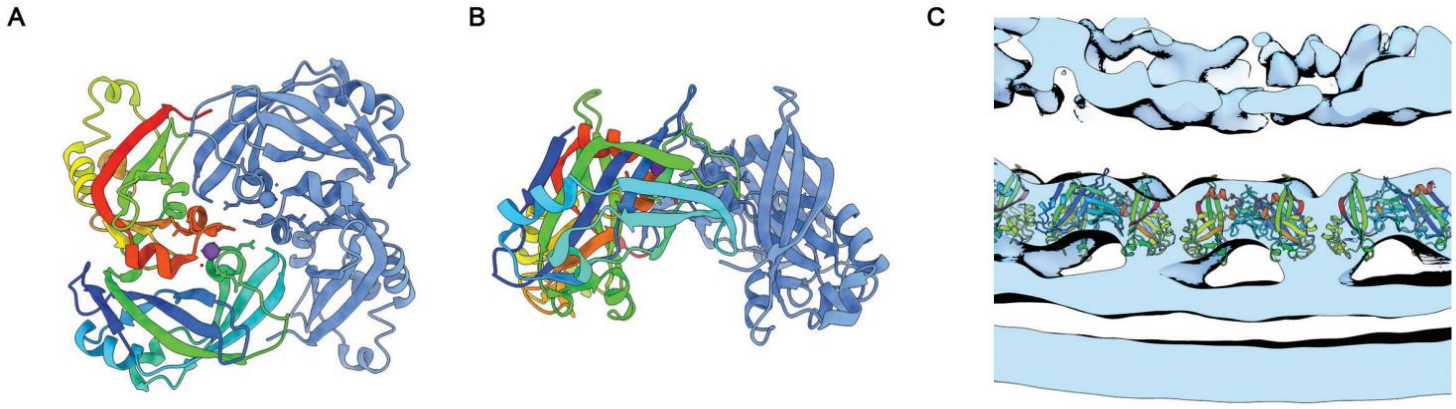


Figure 6. Structure de la protéine de matrice M. A et B) Structure au rayon X de la protéine M vue de dessus A) et vu de côté B). C) La coupe à travers et la reconstruction du subtomogramme montre l'orientation du M-dimère par rapport au feuillet interne de la bicouche lipidique (en bas).

1.2.2. Les protéines de la ribonucléoprotéine virale

Nucléoprotéine N

La nucléoprotéine N assure l'encapsidation des ARN viraux génomiques et anti-génomiques (Tawar et al. 2009). Cette encapsidation permet notamment de protéger l'ARN viral et de limiter sa détection par les acteurs de l'immunité de la cellule (Lifland et al. 2012).

Elle est composée de 2 domaines globulaires (N-ter et C-ter) et de deux bras libres C-ter et N-ter. De la même manière que lors de l'encapsidation de l'ARN viral, son expression dans des bactéries, montre elle se lie aux ARN bactériens en formant des structures en anneaux de 10 à 11 monomères (Figure 7). Chaque monomère se lie aux monomères adjacents via les bras N-ter et C-ter. L'ARN viral se loge dans le sillon formé par les domaines globulaires de la protéine, environ 70 nucléotides par tour d'hélice. L'interaction entre l'ARN viral et les nucléoprotéines est spécifique du squelette d'ARN et non des nucléotides présents, ensemble ils forment la nucléocapside (N_{NC}) (Tawar et al. 2009). N existe également sous une forme monomérique libre non liée à l'ARN *ie* N_0 (Galloux et al. 2015). C'est la liaison à la P qui permet le maintien de la N sous la forme N_0. Ce complexe N_0P est essentiel pour permettre l'encapsidation sélective de l'ARN génomique (Esneau et al. 2019).

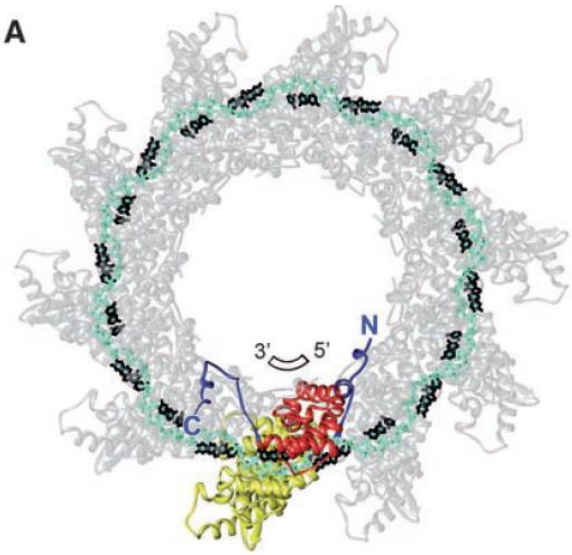


Figure 7. Structure d'un anneau de protéines N liées à l'ARN. Une sous-unité N est colorée : domaine globulaire en jaune et rouge indiquent le NTD et le CTD respectivement, et les bras Nter et Cter libres sont bleus. L'ARN est représenté avec le squelette en cyan et les bases en noir. Les bras libres permettent de faire le lien « main dans la main » entre chaque monomère. Extrait de Tawar 2009.

Polymérase L

La polymérase L porte l'ensemble des activités enzymatiques permettant la synthèse du génome viral et des ARN messagers viraux. C'est une ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) capable d'initier à la fois la transcription et la réplication. Elle est aussi responsable de la polyadénylation des messagers viraux. Elle assure également l'addition et la méthylation de la coiffe des ARNm viraux. On notera que le mécanisme d'addition de la coiffe implique un transfert de l'ARN en cours de synthèse sur le GTP, réaction différente de celle impliquée dans le *capping* des messagers cellulaires (D Cao, Gao, and Liang 2021).

Appelée L pour « large », la polymérase est une grosse protéine de 250 kDa. Ces dernières années, les structures en cryo-électromicroscopie des polymérases de différents MNV ont été publiées (Liang 2020; Gilman et al. 2019; Jenni et al. 2020; Dongdong Cao et al. 2020). Elles comprennent 5 domaines : le domaine de synthèse de l'ARN (RdRp) et le domaine d'addition de la coiffe (PRNTase) surmontés par un domaine charnière/connecteur, le domaine méthyltransférase (MTase) et en enfin le domaine C-ter. Dans les structures publiées de la L du RSV (Figure 8), seuls les domaines RdRp et PRNTase sont visibles (Gilman et al. 2019; Dongdong Cao et al. 2020). La comparaison des structures des L des MNV suggère une grande flexibilité de la L puisqu'elle adopte des conformations différentes en phase d'initiation ou d'élongation (D Cao, Gao, and Liang 2021; Blanchard et al. 2020). Le mécanisme d'ajout de coiffe des ARN et de méthylation de celle-ci implique un processus unique et différent des cellules mammifères (Ogino and Green 2019; D Cao, Gao, and Liang 2021). Du fait de son rôle central et de ses activités enzymatiques spécifiquement virales (RdRp et PRNTase), la protéine L représente une cible de choix pour de futurs antiviraux. La résolution récente de sa structure devrait permettre l'élaboration de nouvelles molécules antivirales dans le futur.

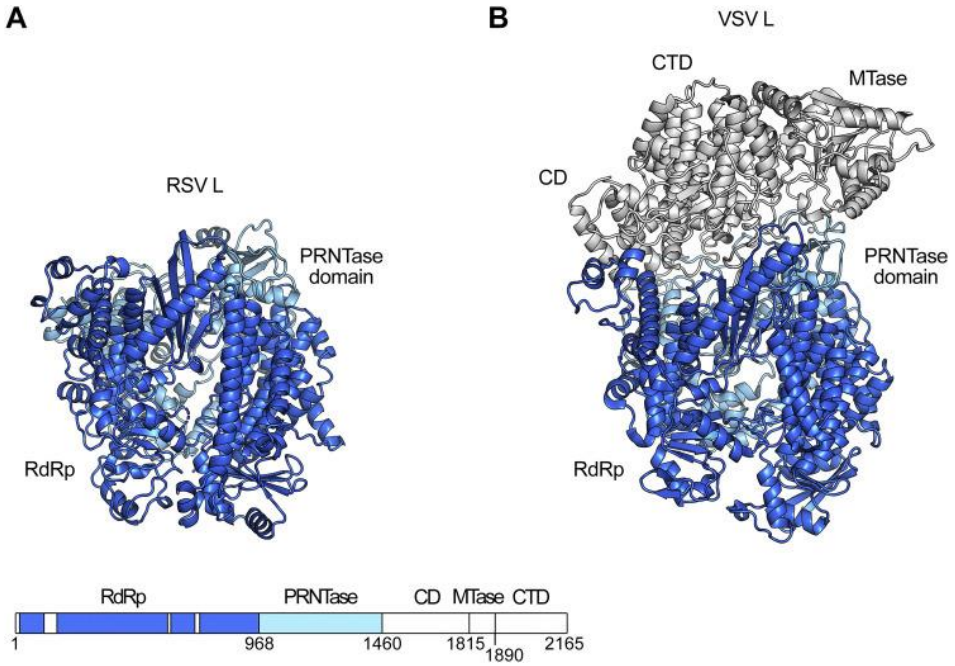


Figure 8. Structure en Cryo-Electromicroscopie de la polymérase. A) Présentation schématique du domaine RdRp et PRNTase de la protéine L du RSV et B) Structure publiée de la L du VSV (Liang et al. 2015) *sont représentés sous forme de rubans colorés. Le domaine connecteur (CD), le domaine méthyltransférase (MTase) et le domaine C-terminal (CTD) sont colorés en blanc pour le VSV et ne sont pas observés dans la structure du RSV. La carte linéaire montre les portions de L qui sont résolues dans la structure du RSV sous forme de barres colorées. Extrait de Gilman 2019.*

Phosphoprotéine P

La phosphoprotéine P peut être considérée comme le chef d'orchestre de la réplication et de la transcription virale. En effet, elle interagit avec l'ensemble des protéines impliquées dans ces processus : elle est le cofacteur essentiel de la polymérase à laquelle elle est intimement liée (Gilman et al. 2019), elle interagit avec la N_{NC} et maintien la N sous forme monomérique non liée à l'ARN dans le complexe N_0P (Galloux et al. 2015) et elle interagit avec le facteur de transcription viral M2-1 (Blondot et al. 2012). Enfin, une étude récente montre l'importance des protéines P et M dans la formation des filaments viraux et la production de VLP (virus like particul) (M Bajorek et al. 2021).

La protéine P s'associe en homotétramères au niveau d'une région centrale d'oligomérisation (OD) structurée en hélice. Les bras N-ter et C-ter de P sont intrinsèquement désordonnés. Les domaines d'interaction avec les différents partenaires se structurent au contact des interacteurs. La plasticité de la P est illustrée par les différentes conformations que prennent les 4 bras C-ter de P liées à la L (Figure 9) (Gilman et al. 2019).

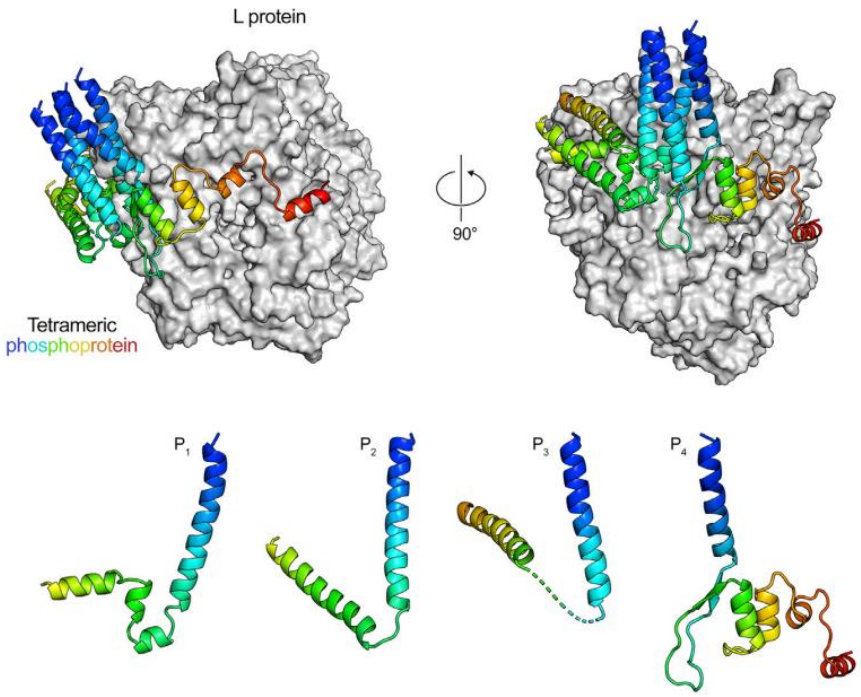


Figure 9. Structure de domaine d'oligomérisation et du C-terminal de la phosphoprotéine en Cryo-Electromicroscopie avec la polymérase. La polymérase L est représentée par une surface moléculaire grise. Les monomères P1 à P4 sont colorés (bleu à rouge, terminaison N à C, respectivement). Ces monomères permettent de visualiser la capacité de P à moduler sa conformation en fonction des interactions. Extrait Gilman 2019.

Protéine M2-1

La protéine M2-1 peut être considérée comme un facteur de transcription virale. Elle est absolument indispensable à la transcription des gènes viraux. En l'absence de M2-1, seuls des niveaux très faibles de l'ARNm correspondant au gène le plus proche du *Leader* sont observés (Fearns and Collins 1999). M2-1 favorise la processivité de la polymérase. C'est une protéine de liaison à l'ARN (Cuesta et al. 2000) qui se lie préférentiellement aux ARNm du RSV et aux séquences riches en A (Cartee and Wertz 2001; Blondot et al. 2012).

Cette petite protéine basique forme des homotétramères (Figure 10). Chaque protomère présente un domaine N-ter en doigt de zinc (ZBD), un motif de tétramérisation en hélice et un large domaine globulaire C-ter (Tanner et al. 2014). De plus, M2-1 est déphosphorylée dans les cellules par la protéine cellulaire PPI (Richard et al. 2018) sur les résidus sérines 58 et 61. La régulation de son état de phosphorylation semble cruciale pour la liaison à l'ARN. Récemment, une étude a révélé que M2-1 interagit spécifiquement avec l'ARN du RSV sens positif et à des transcrits cellulaires et non avec l'ARN du génome sens négatif (Braun et al. 2021). M2-1 est recrutée dans les IB via son interaction avec P (Blondot et al. 2012) puis se concentre avec les ARNm viraux dans des sous-structures appelées IBAGs (cf cycle viral) (Rincheval et al. 2017b).

Les sites d'interaction de P et de l'ARN sur M2-1 sont partiellement chevauchants, montrant qu'il existe une compétition pour leur fixation (Tran et al. 2009). De plus, le domaine ZBD et le domaine central de M2-1 interagissent indépendamment avec l'ARN (Gao et al. 2020). Après la synthèse et libération des ARN dans le cytoplasme, il a été montré que M2-1 reste en partie liée aux ARNm viraux (Bouillier, Cosentino, et al. 2019).

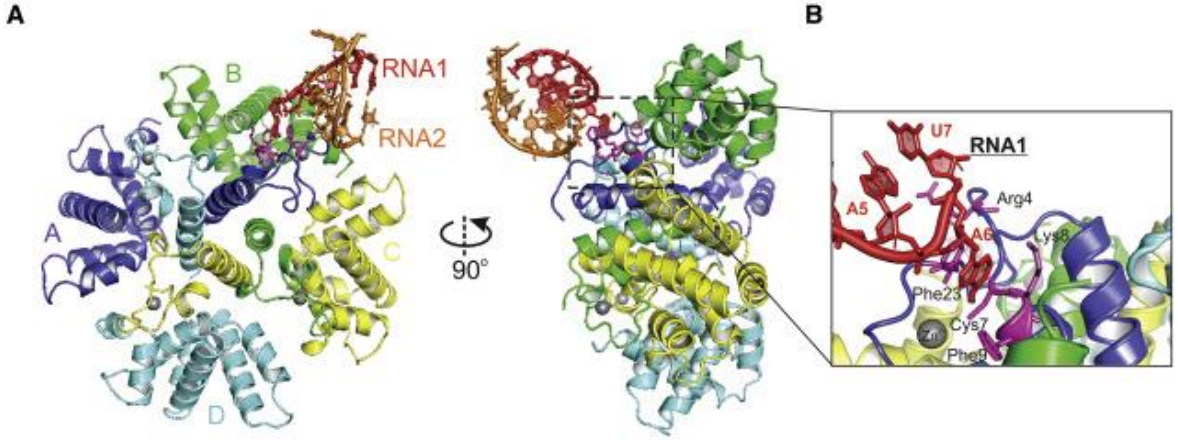


Figure 10 . Structure d'un complexe M2-1 du RSV en interaction avec un ARN court. A) Vue de face de la protéine tétramérique de M2-1. B) Vue de côté de la protéine tétramérique de M2-1 associé à un ARN court. Les sous-unités M2-1 A, B, C et D sont respectivement en bleu, vert, jaune et cyan. Les ARN1 et ARN2 sont respectivement en rouge et orange. Les résidus interagissant avec l'ARN de M2-1 sont en magenta. Les ions Zn 2+ sont représentés par des sphères grises. La vue latérale met en évidence les interactions entre l'ARN et le domaine de liaison au zinc (ZBD) de M2-1 comme indiqué dans la boîte en pointillés. Extrait de Gao 2020.

Protéine M2-2

M2-2 participe au contrôle de la balance entre la transcription et la réplication virale (Bermingham and Collins 1999). Peu abondante, elle est synthétisée à partir du même ARNm que M2-1 par un mécanisme d'initiation alternative de la traduction. Pour que se produise de manière efficace une traduction couplée des protéines M2-1 et M2-2, la région de chevauchement des ORF n'est pas suffisante, elle nécessite aussi la présence de structures secondaires des séquences en amont (Gould and Easton 2005). Aucune caractérisation de la structure de M2-2 n'a été réalisée à ce jour.

1.2.3. Protéines non structurales

Les protéines NS1 et NS2 jouent un rôle dans le contrôle de la réponse immunitaire de la cellule. Ces protéines fonctionnent individuellement et en coopération pour supprimer l'induction d'interféron (IFN). En effet, il a été montré que les cellules infectées présentaient une réduction de la production d'interféron I et III (Lo, Brazas, and Holtzman 2005). Les

protéines non structurales vont réduire cette production d'IFN par la cellule en jouant sur un grand nombre de protéines de signalisation et des facteurs des transcriptions nucléaires (Sedeyn, Schepens, and Saelens 2019).

La protéine NS1 est décrite comme un paralogue de la protéine de matrice M (Figure 11). Elle est principalement formée de feuillet β et semble être monomérique (Chatterjee et al. 2017). A ce jour il n'existe aucune donnée structurale pour la protéine NS2. Les protéines NS1 et NS2 ne sont pas présentes au sein des virions.

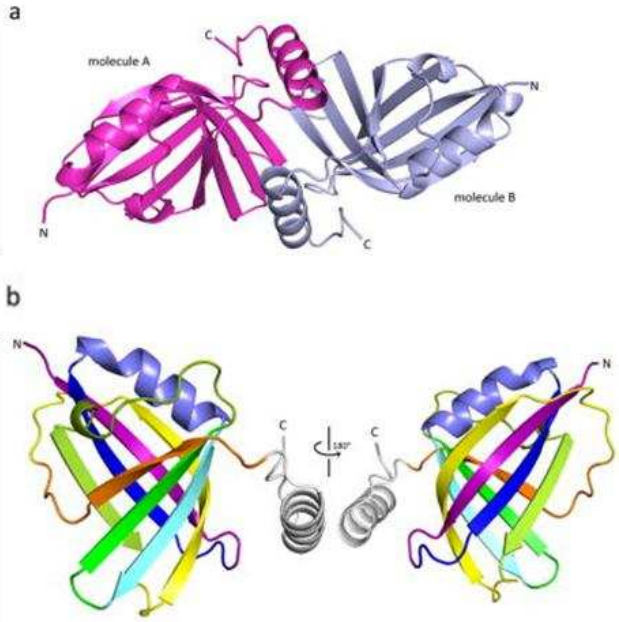


Figure 11. Structure de la protéine non structurale 1 du RSV. a) L'unité cristallographique asymétrique contient deux molécules de NS1 (magenta et bleu clair) b) Structure du domaine N-terminal (NTD) de NS1.

2. Cycle viral

In vivo, le RSV présente un tropisme marqué pour les cellules ciliées de l'épithélium respiratoire. *In vitro*, il est capable d'infecter un grand panel de lignées cellulaires. La Figure 12 schématise les différentes étapes simplifiées du cycle viral.

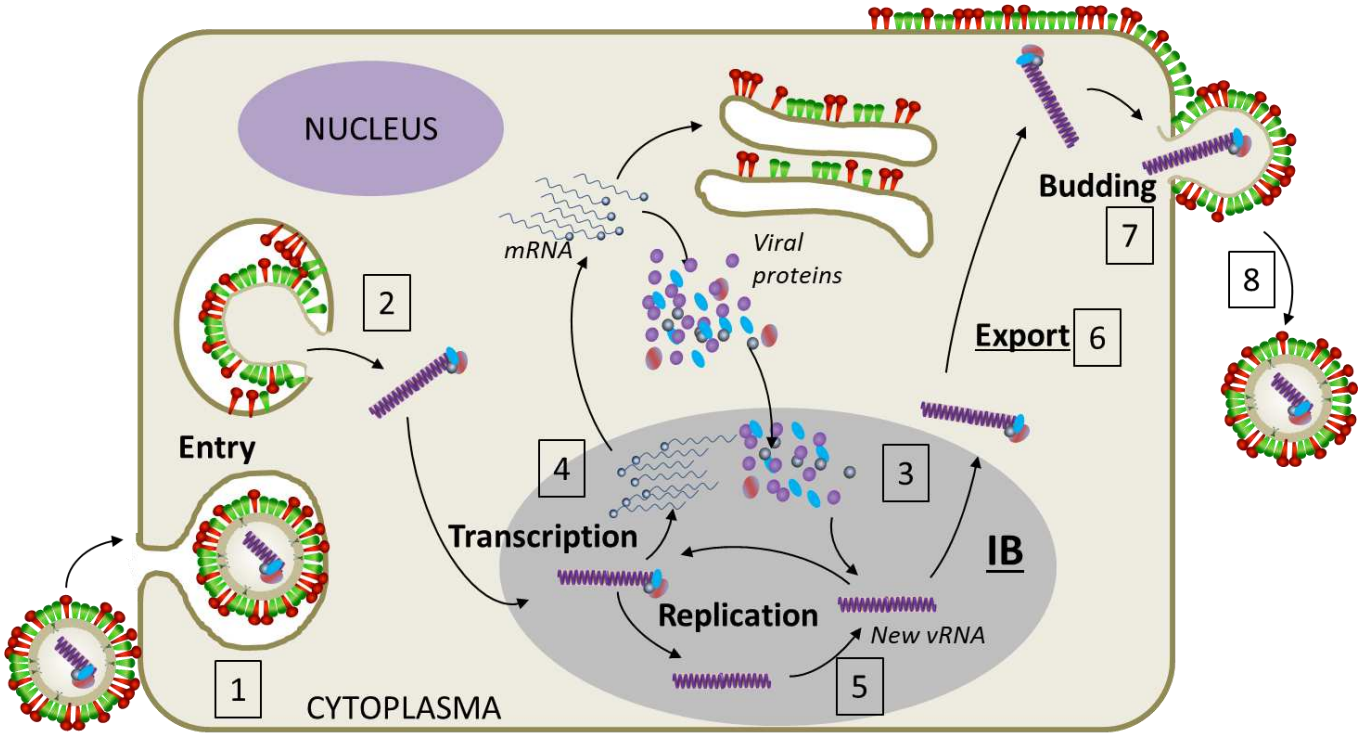


Figure 12. Cycle viral du virus respiratoire syncytial. 1) Attachement et entrée du virion dans la cellule 2) Libération des RNPs dans le cytoplasme 3) Formation des corps d'inclusion (IB) en gris 4) Transcription primaire des ARNm 5) Réplication du génome viral et transcription secondaire 6) Export des RNPs néosynthétisés à la membrane plasmique 7) Bourgeonnement des virions 8) Libération du virion après scission membranaire. Les protéines F sont marquées en rouge, G en vert, la protéine de matrice (sous la membrane plasmique) n'est pas représentée sur ce schéma. Les protéines virales, N sont marquées en violet, L en violet claire/rouge, P en bleu et M2-1 en gris.

2.1. Entrée virale

L'entrée virale se décompose en 3 étapes : une étape d'attachement, une étape d'internalisation et une étape de fusion membranaire. L'attachement peut se faire via différents récepteurs cellulaires. Cette diversité peut indiquer que la voie d'entrée virale varie selon le modèle cellulaire et/ou de la souche virale étudiée. Même si elle n'est pas indispensable, la protéine G va participer à l'attachement du virion à la membrane de la cellule en interagissant avec les récepteurs CX3CR1, les GAGs ainsi que les héparanes (Battles and McLellan 2019; McLellan, Ray, and Peeples 2013). Les protéines de fusion interagissent avec des récepteurs de

l'IGF1 ce qui induit la translocation de la nucléoline depuis le compartiment nucléaire vers la membrane plasmique. L'interaction de F avec la nucléoline est essentielle pour l'attachement et participe à l'entrée du RSV notamment dans des modèles de cellules ciliées (Figure 13) (Griffiths et al. 2020; Tayyari et al. 2011; Mastrangelo et al. 2021). La F est responsable de la fusion membranaire mais le lieu exact de cette étape est mal compris. Des études montrent que la fusion se déroulerait au niveau de la membrane plasmique dans des domaines riche en cholestérol (radeau lipidique) (San-Juan-Vergara et al. 2012; Bachi 1988), tandis qu'une autre démontre une fusion après macropinocytose des virions (Krzyzaniak et al. 2013). Il est possible qu'*in vivo* les deux phénomènes se produisent de manière concomitante afin de permettre une multiplication virale plus efficace. (Battles and McLellan 2019). Il est admis que la fusion membranaire est indépendante du pH (Kahn et al. 1999), mais les facteurs déclenchants de la fusion membranaire restent méconnus. La transconformation de la F, permet de fusionner les membranes virales et cellulaires, libérant ainsi les ribonucléoprotéines virales dans le cytoplasme cellulaire.

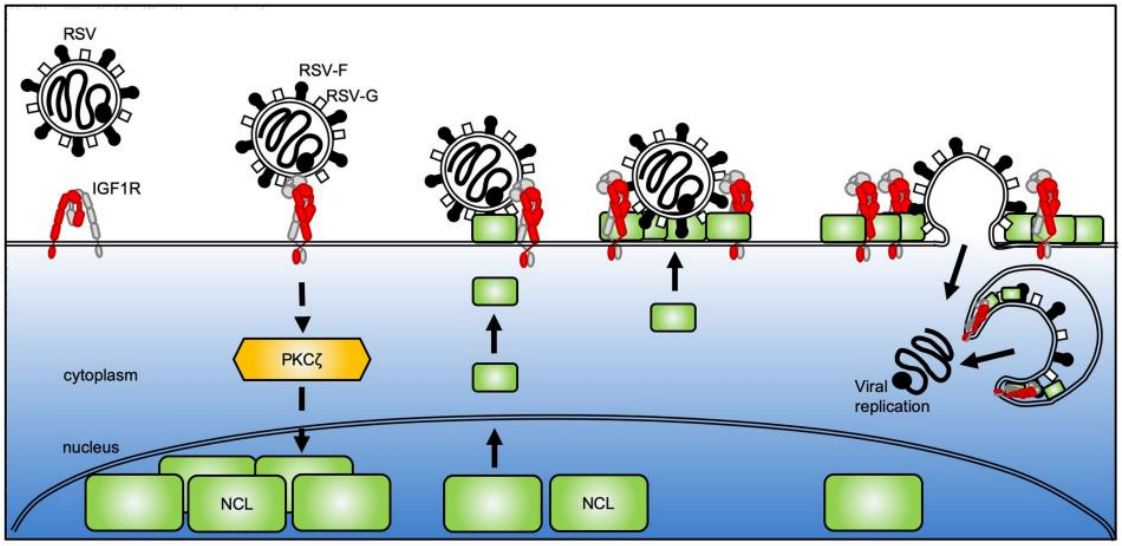


Figure 13. Schéma de l'interaction de F avec son récepteur et le recrutement des corécepteurs. La protéine de fusion (en noir sur la particule virale) interagit avec le récepteur IGF1R. Cette interaction stimule la voie de signalisation de PKCζ. Cela entraine la translocation de la nucléoline (NCL) du noyau à la membrane plasmique. F interagit avec les cofacteurs NCL. La nucléoline attire le récepteur IGFR1 améliorant l'adhésion de la particule virale et les processus d'internalisation et de fusion. Extrait de Griffiths 2020.

2.2. Production protéique et réplication du génome viral

Transcription et réplication

Les étapes de transcription et réplication du génome viral se déroulent après libération de la RNP dans le cytoplasme. Dans un premier temps, la transcription utilise le matériel de la ribonucléoprotéine libéré pour transcrire les ARNm viraux grâce la protéine L et son cofacteur P. Dans sa conformation d'hélice gauche (Baker 2013), le complexe L-P peut accéder simultanément aux deux éléments de séquence : le séquence *Leader* et le gène start. La polymérase transcrit de manière séquentielle le génome viral et subit des détachements aléatoires. Il en résulte un gradient transcriptionnel, c'est-à-dire que les gènes situés à proximité du promoteur (en 3') sont plus transcrits que ceux situés en 5' de l'ARN génomique. Ce gradient est observé chez d'autres virus à ARN négatif (Whelan, Barr, and Wertz 2004). Pour le RSV, ce gradient est toutefois discuté puisqu'une étude récente montre que la glycoprotéine G est plus transcrite que la protéine N (Piedra et al. 2020). Lors de la réplication, la polymérase avec son cofacteur P synthétise un intermédiaire nommé l'anti-génome, à partir duquel elle va répliquer le génome viral. Une étude suggère un réarrangement des interactions entre L et les autres protéines virales telles que M2-1 après 6 à 8 heures post-infection, pouvant correspondre à la mise en place de la réplication à l'aide de M2-2 (Bermingham and Collins 1999; Blanchard et al. 2020). L'encapsidation par la nucléoprotéine est concomitante à la synthèse des nouveaux génomes viraux. La ribonucléocapside s'associe avec les protéines L, P et M2-1 pour former la ribonucléoprotéine (RNP). En parallèle de la réplication, la transcription des ARNm viraux par L-P continue.

Les Corps d'inclusions (IBs)

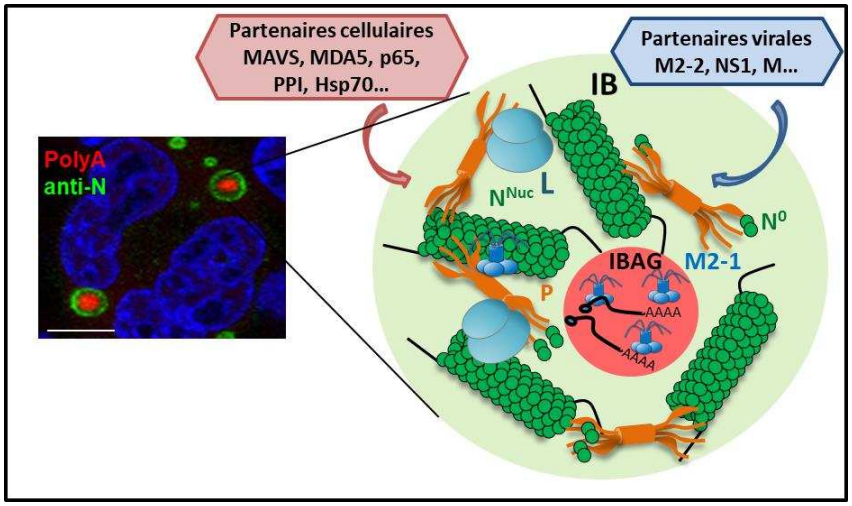


Figure 14. Composition des corps d'inclusion et des IBAGs. L'image de gauche représente des cellules HEp-2 infectées, la protéine N (vert) délimite les corps d'inclusion (IBs) et la polyA-binding protein (rouge) délimite les granules associées aux corps d'inclusion. Le schéma de droite présente les protéines cellulaires et virales retrouvées associées à chaque compartiment viral et notamment aux IBAGs (Inclusion body associated granules).

Comme pour un grand nombre de *MNV* (Nevers et al. 2020; Etibor, Yamauchi, and Amorim 2021) des inclusions cytoplasmiques appelées corps d'inclusions (IBs) sont observables après 6 à 8 heures d'infection (Norrby, Marusyk, and Örvell 1970; Rincheval et al. 2017b). Leur taille et leur nombre augmentent au cours du cycle viral. Ces structures sont assez mal caractérisées et font encore l'objet de plusieurs études. Présentes tout au long de l'infection virale, ce sont des structures liquides sans membrane, dynamiques, capables de fusionner et de se déformer. Une étude suggère que la synthèse des protéines N et P en quantité croissante suffirait à entrainer une séparation de phase dans le cytoplasme permettant l'apparition de ces corps d'inclusion (IB) (Galloux et al. 2020). Les corps d'inclusions sont le lieu des étapes de transcription et réplication virale (Rincheval et al. 2017a; Risso-Ballester et al. 2021). Les IBs regroupent des protéines virales et cellulaires (Figure 14). Parmi les protéines virales, les IBs contiennent L, N, P, M2-1, M2-2 et le génome viral (Rincheval et al. 2017b) ainsi que NS2 et M (Weber et al. 1995; R et al. 2002). Des études ont aussi retrouvé des protéines cellulaires notamment des protéines impliquées dans la traduction des ARNm telles que PABPC1, eIF4G et PPI (Bouillier, Cosentino, et al. 2019; Rincheval et al. 2017a; Richard et al. 2018; Wei et al. 2014), des protéines chaperonnes HSP90 et HSP70 (Munday et al. 2015; Radhakrishnan et al. 2010) ainsi que de l'actine et des protéines régulatrices associées à l'actine (Jeffree et al. 2007; Kipper et al. 2015). Les IBs peuvent aussi servir de lieu de séquestration des protéines impliquées dans la réponse antivirale comme MDA5 (gène 5 associé à la différenciation du mélanome) et MAVS (signalisation antivirale mitochondriale) (Lifland et al. 2012). Au sein des corps d'inclusions se trouvent des sous-structures nommées IBAGs dans lesquelles se concentrent les ARNm viraux néosynthétisés, la protéine M2-1 et les protéines cellulaires liés à la traduction (Bouillier, Cosentino, et al. 2019; Richard et al. 2018; Rincheval et al. 2017b). Au fur et à mesure de la transcription, les ARNm sont concentrés dans les IBAGs (inclusion body associated granules) puis expulsés des IBs pour être traduits par la cellule (Rincheval et al. 2017b). Ce mécanisme d'expulsion n'est pas encore caractérisé.

2.3. Export et bourgeonnement

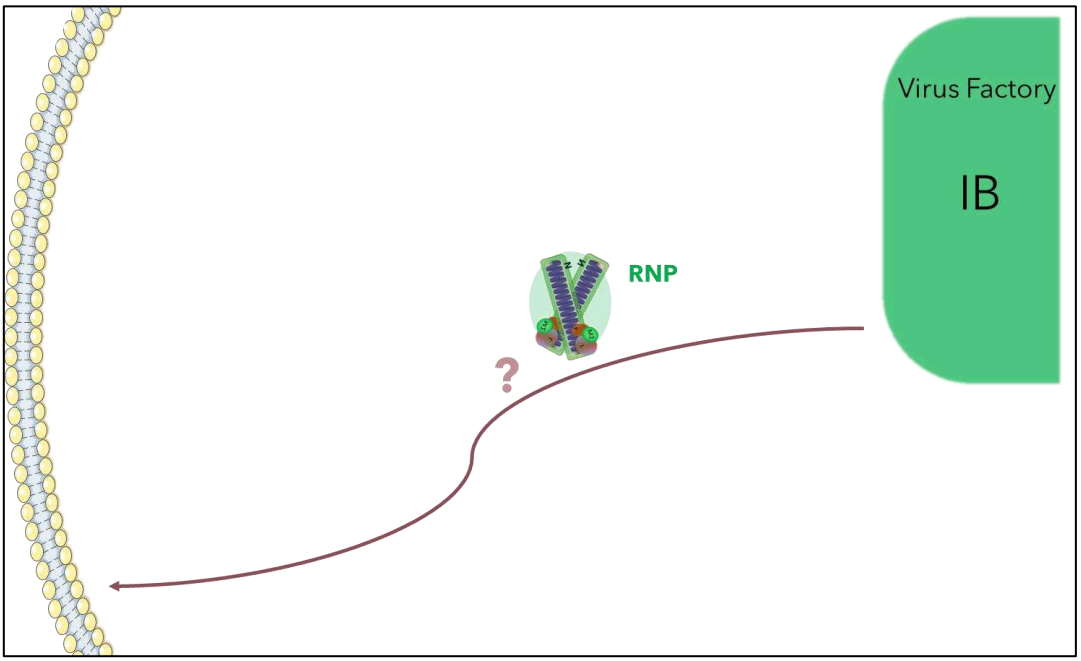
La libération d'un virion infectieux implique le transport des RNPs vers les sites d'assemblage, l'assemblage du virion, son bourgeonnement et sa libération. Ces étapes terminales sont souvent étudiées en observant la formation de filaments viraux à la membrane. Ceux-ci sont considérés comme des précurseurs des virions, de VLP ainsi que de virus infectieux, ce qui ne permet pas d'approcher ces étapes de manière indépendante.

L'expulsion des RNPs hors des IBs reste un processus inconnu. Ensuite, les RNPs doivent migrer jusqu'à la membrane plasmique. Leur taille volumineuse (plusieurs milliers de kDa) ne leur permet pas de diffuser librement dans le cytoplasme cellulaire. A ce jour, aucune équipe n'a étudié cette étape de transport indépendamment. Pour autant, la présence de M aux IBs et à la membrane suggère qu'elle pourrait avoir un rôle dans le transport des RNPs (Ghildyal et al. 2003; 2005; Monika Bajorek et al. 2021). Le site d'assemblage exact des virus reste incertain. Une étude récente suivant le cycle de recyclage de la glycoprotéine G révèle la présence de filaments cytoplasmiques dynamiques sous-membranaires sur lesquels sont présents les protéines N, P et M ainsi que l'ARN génomique. Ces filaments cytoplasmiques formeraient une plateforme d'assemblage sous la membrane plasmique, mais il n'est pas démontré qu'ils soient les précurseurs des filaments viraux observés à la membrane (Vanover et al. 2017). Les filaments viraux sont considérés comme des virus en cours de bourgeonnement. Les protéines indispensables à la formation des filaments viraux sont M, P et F (Meshram et al. 2016). Plus précisément, c'est la queue cytoplasmique de la protéine F qui est impliquée dans le formation des filaments et l'incorporation des protéines virales dans les virions (Shaikh, Cox, et al. 2012; Baviskar et al. 2013; Meshram et al. 2016; AG, KP, and GW 2006). Des études montrent qu'un défaut dans la dimérisation de la protéine M (Forster et al. 2015) et dans l'interaction avec P (Monika Bajorek et al. 2021) empêche la formation des filaments viraux et la libération de VLP. Ce dernier élément reste à interpréter avec précaution puisque le domaine de P nécessaire à la formation des filaments viraux est différent du domaine de P interagissant avec la protéine M (Mitra et al. 2012; Monika Bajorek et al. 2021). Des études montrent que la formation des filaments viraux se produit au sein des radeaux lipidiques (McCurdy and Graham 2003; Santangelo and Bao 2007). Ces mécanismes de formation des filaments ainsi que les interactions entre protéines sont encore mal connues et nécessitent d'autres études. L'étape terminale est une scission membranaire permettant la libération des virions vers l'extérieur de

la cellule. Au contraire d'autres virus tels que la rage ou la rougeole, le mécanisme de libération est indépendant de la voie ESCORT (Utley et al. 2008). Pour autant le mécanisme de scission reste inconnu. Après libération des virions, il existe une fraction infectieuse très importante qui reste liée aux cellules (Kiss et al. 2014). Puisque les filaments sont les précurseurs viraux, il est possible que ces derniers subissent une cassure afin de permettre une libération dans la fraction libre (Figure 15).

Dans le chapitre suivant nous développerons l'implication du cytosquelette dans le cycle viral. En effet celui-ci peut intervenir sous plusieurs formes à plusieurs étapes du cycle.

a



b

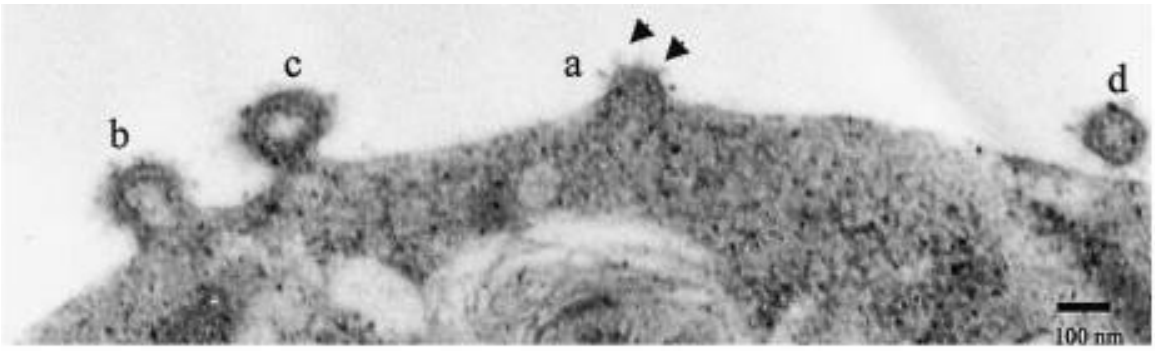


Figure 15. Assemblage et bourgeonnement du RSV. a) Représentation schématique des connaissances actuelles sur l'étape de transport des RNPs des IBs à la membrane plasmique b) Image en microscopie électronique de bourgeonnement à la surface de la cellule en absence de filaments viraux. Les annotations a à d représentent les différentes étapes du bourgeonnement.

Chapitre 3. Structures cellulaires impliquées dans le transport et réseau de recyclage des endosomes

Sous plusieurs aspects, le cytosquelette est essentiel aux cellules eucaryotes. En effet, il permet la mobilité cellulaire, le changement de forme et la conservation de morphologie. Il permet le maintien et le positionnement des organites cellulaires ainsi que le transport et la communication intracellulaire (entre organite) et avec l'extérieur de la cellule.

1. Cytosquelette cellulaire

Le cytosquelette est composé de trois réseaux : les microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules (MT).

1.1. Réseau de microtubules

1.1.1. Généralités

Les MT participent à l'organisation des chromosomes et à leur ségrégation durant la division cellulaire. Ils participent aussi aux transports et à la distribution de différentes cargaisons, comme les vésicules et organelles intracellulaires (Goodson and Jonasson 2018).

Les MT sont assemblés à partir d'hétérodimères d'α et β-tubuline formant de longs polymères appelés aussi protofilaments. Leur longueur peut dépasser 100 µm pour un diamètre d'environ 25 nm. Les protofilaments s'associent pour former des tubules de, généralement, 13 protofilaments dont le centre est creux (Figure 16). Leur surface est chargée négativement, permettant les interactions avec protéines de liaisons aux MT (Goodson and Jonasson 2018). Les MT sont des structures rigides et dynamiques. Ils sont orientés avec un pôle positif (+) zone de polymérisation (croissance du MT) et un pôle négatif (-) qui tend à se dépolymériser. Leur stabilité peut dépendre de modifications post-traductionnels. En effet, l'acétylation des microtubules augmente leur stabilité (Janke and Montagnac 2017). Ils participent ainsi à la polarisation cellulaire. Le centrosome est considéré comme le principal centre organisateur de microtubule (MTOC) contenant une machinerie spécialisée : le complexe γ-tubuline (γ-TuRC) (Zupa et al. 2021). Il concentre et stabilise les extrémités (-) des MT qui irradient dans la cellule à partir de ce centre. En réalité cette vision classique du réseau est incomplète. De nombreux MT émanent de l'appareil de Golgi lui-même. Ils peuvent même polymériser à partir d'autres

MT. Dans les cellules épithéliales polarisées dont les cellules cibles du RSV *in vivo*, le complexe annulaire γ-tubulin (γ-TuRC) se trouve au niveau apical induisant la formation d'un réseau polarisé avec le pôle négatif en apical (Sanders and Kaverina 2015; Sanchez and Feldman 2017; Toya et al. 2016).

Il existe un grand nombre de protéines associées aux MT. Parmi elles, des protéines régulatrices et métaboliques conférant leur dynamique aux MT. Certaines protéines vont servir de liens membranaires (non-moteur) afin d'ancrer les organites aux MT tandis que d'autres joueront un rôle moteur (kinésine et dynéine) afin de déplacer des éléments au sein de la cellule. (Goodson and Jonasson 2018).

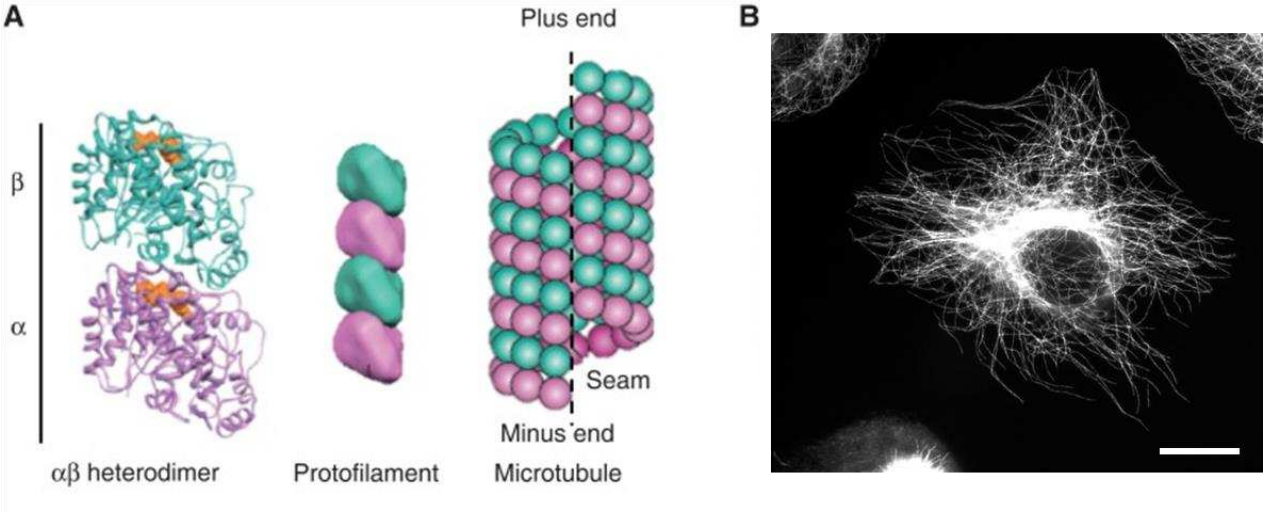


Figure 16. Structure des microtubules. A) Différente structure et type d'assemblage des microtubules B) Image de microscopie d'une cellule humaine dont les microtubules ont été marqué en fluorescence, barre d'échelle 10 µm. Goodson et Jonasson 2018.

1.1.1. Moteurs moléculaires associés aux microtubules

Les moteurs moléculaires associés aux MT sont de deux types : les kinésines et les dynéines (Figure 17).

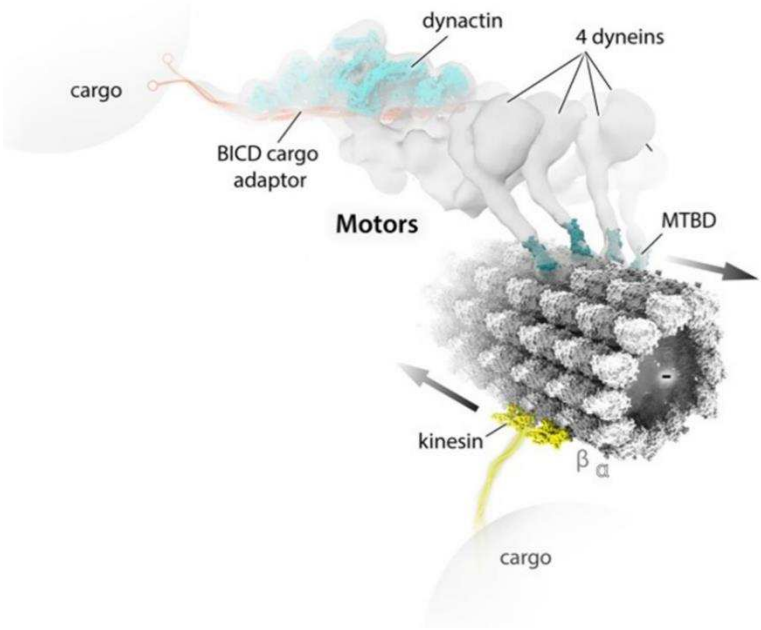


Figure 17. Microtubules et moteurs moléculaires. Microtubule en cryo-EM représenter avec les moteurs moléculaire kinésine liée à sa cargaison et dynéine lié à son adaptateur (dynactin) lui-même lié à sa cargaison. MTBD signifie microtubule-binding domain et BICD signifie BicaudalD. Extrait de Manka et Moores 2018.

Les kinésines ont pour particularité d'être des moteurs moléculaires dont la progression se fait vers le pôle positif des MT à quelques exceptions près. Le génome humain code 45 kinésines différentes qui sont classées en 14 familles sur la base de l'analyse phylogénétique de la séquence de la « tête » (Lawrence et al. 2004). La plupart des kinésines partagent une organisation en domaine avec une région dite « tête » qui contient le domaine moteur, une tige et une queue (Ali and Yang 2020). Le domaine moteur subit des cycles itératifs de transconformation ATP-dépendants qui génèrent les forces motrices, la tige conditionne le niveau d'oligomérisation et la queue permet l'interaction avec les cargos et intervient dans l'autorégulation de l'activité. Certaines kinésines s'associent préférentiellement à des types spécifiques de MT sans que les déterminants de ces spécificités soient clairement compris (modification post-traductionnelle, protéines liant le MT…).

Les moteurs de la famille des dynéines progressent vers le pôle négatif des MT. Une seule dynéine est décrite dans les cellules mammifères (Reck-Peterson et al. 2018). Il s'agit d'un large complexe d'environ 1500 kDa comprenant 2 chaines lourdes, 2 chaines intermédiaires et 8 chaines légères. La chaine lourde de la dynéine existe sous une seule isoforme. C'est une protéine de 500 kDa très complexe qui porte l'activité motrice. Il existe différentes isoformes pour les chaines intermédiaires et légères permettant de moduler la spécificité de la dynéine.

La dynéine fonctionne en association avec la dynactine qui assure le recrutement du cargo (A. J. Roberts et al. 2013; Schmidt and Carter 2016).

1.2. Microfilaments d'actine

1.2.1. Généralités

Les filaments d'actine jouent un rôle dans la migration cellulaire avec la formation de pseudopodes, dans le renforcement de la membrane au niveau du cortex cellulaire et dans la morphologie cellulaire. Le réseau d'actine participe également au transport cellulaire cortical et à la contraction musculaire (Dominguez and Holmes 2011).

Les monomères d'actine existent sous trois isotypes α, β et γ en fonction du type cellulaire. Les monomères d'actine-G (globulaire) polymérisent sous forme de filaments en double hélice (actine-F pour filamenteuse) (Dominguez and Holmes 2011; Pollard 2016). La polymérisation des filaments d'actine nécessite l'hydrolyse d'ATP cellulaire. Certaines protéines permettent d'induire la nucléation de l'actine-F tels que le complexe ARP2/3, la formine et la profiline (Firat-Karalar and Welch 2011). Les filaments sont polarisés avec le pôle négatif au niveau des protéines de nucléation. Ces structures sont dynamiques et s'organisent en faisceaux ou en réseaux. La Figure 18 montre l'effet « tapis roulant » de l'actine par l'ADF/cofilin et la profiline, ce qui entraîne respectivement une diminution et une augmentation de la taille des filaments d'actine. Le complexe ARP2/3 permet la nucléation de nouveaux filaments par sa liaison avec les monomères d'actine et le côté des filaments d'actine, tandis que les formines nucléent de nouveaux filaments en se liant aux monomères d'actine et grâce à la coopération de la profiline (Gupta, Ambaru, and Bajaj 2020).

De plus en plus d'études montrent que les MT et les filaments d'actine sont interconnectés. En effet les deux réseaux travaillent souvent ensemble dans les processus cellulaires fondamentaux et leurs propriétés dynamiques fonctionnelles sont souvent intimement connectées (Dogterom and Koenderink 2018).

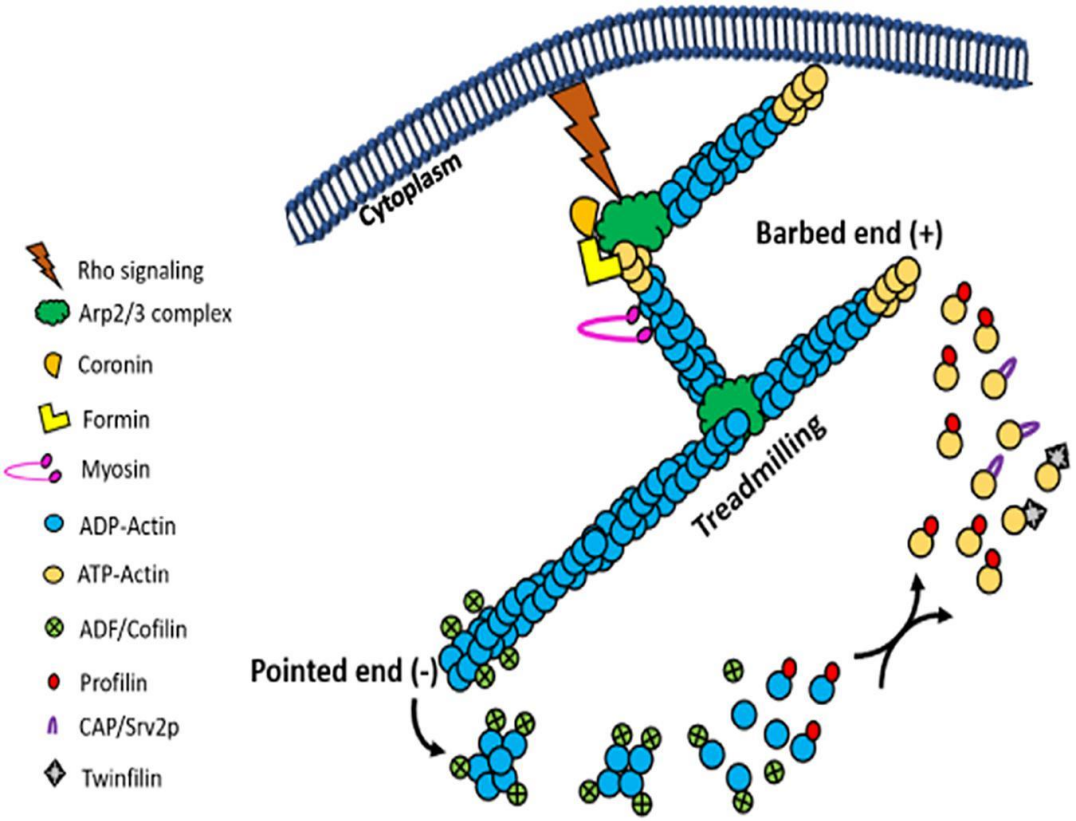


Figure 18. Nucléation des filaments d'actine. Ce schéma représente les protéines associées à la dynamique des filaments d'actine. Extrait de Gupta 2020.

1.2.2. Moteurs moléculaires associés aux filaments d'actine

Les moteurs associés au réseau d'actine sont les myosines. Il en existe de nombreuses isoformes. Certaines génèrent les forces nécessaires aux mouvements des cellules, l'exemple le plus connu étant celui des myosines de classe II impliquées dans la contraction musculaire. D'autres, comme les myosines de classe V, sont spécialisées dans le transport de cargo sur le réseau d'actine. Toutes les myosines comportent 3 domaines. Une tête qui est la partie motrice à proprement parler et qui hydrolyse l'ATP, un bras qui amplifie le mouvement, et enfin une queue qui permet la liaison à ses interacteurs. Un domaine de dimérisation peut précéder la queue (Mermall, Post, and Mooseker 1998; Krendel and Mooseker 2005; Guhathakurta, Prochniewicz, and Thomas 2018).

1.3. Filament intermédiaire

Les filaments intermédiaires participent au maintien de la forme cellulaire et à l'ancrage des organites cellulaires. Leur résistance à la pression et aux étirements permet aux cellules de

résister aux frottements. Ils jouent également un rôle dans l'adhérence et la cohésion cellulaire notamment en interagissant avec les desmosomes (Köster et al. 2015).

Les filaments intermédiaires sont les structures les plus stables du cytosquelette. Il existe 5 sous types de filaments (kératine, vimentine, desmine, neurofilament et cytokératine) mais ils ne sont pas retrouvés dans tous les types cellulaires. Ce sont des polymères, d'une épaisseur intermédiaire d'environ 10 nm, composés de protéines fibrillaires. Les monomères sont composés d'un domaine central en bâtonnets α-hélicoïdaux de taille conservée flanquée de domaines terminaux non-α-hélicoïdaux. Les filaments intermédiaires ne sont pas polarisés contrairement aux MT et aux microfilaments d'actine (Figure 19). Aucun moteur moléculaire ne leur est associé (Herrmann and Aebi 2016).

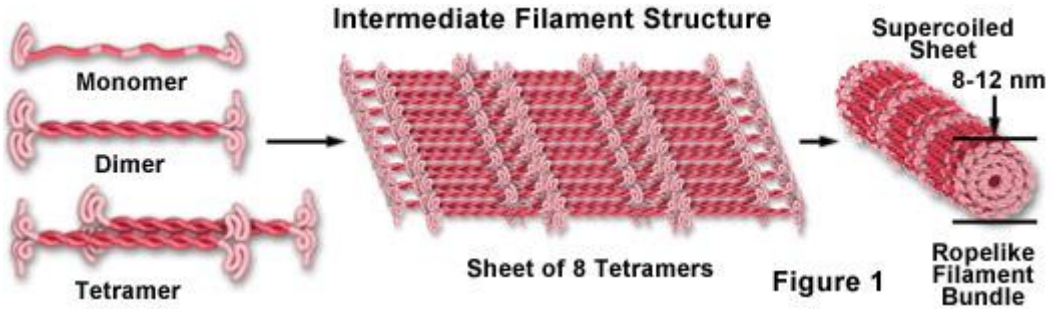


Figure 19. Structure des filaments intermédiaires et association en polymère. Deux des unités monomères forment un dimère enroulé qui s'auto-associent dans un arrangement antiparallèle pour former un tétramère décalé. Les unités tétramériques interagissent latéralement pour former une feuille de huit protofilaments parallèles qui sont surenroulés en un faisceau serré. https://micro.magnet.fsu.edu/cells/intermediatefilaments/intermediatefilaments.html.

2. Rôles des éléments du cytosquelette dans la multiplication du RSV

Les éléments du cytosquelette jouent un rôle essentiel dans le cycle viral de nombreux virus dont le RSV.

La première étude évoquant l'implication possible du cytosquelette date de 1988. L'équipe de Bachi suppose, en observant un allongement localisé des filaments, que le recrutement des protéines virales aux filaments pourrait mettre en jeu des éléments du cytosquelette (Bachi 1988). Les rôles des réseaux d'actine et des MT dans le cycle viral ont été mis en évidence par l'équipe de Kallewaard et al (Kallewaard, Bowen, and Crowe 2005). Leur observation révèle une diminution d'un log de la production virale lors de la dépolymérisation des réseaux d'actine et de MT. Le titrage distinct de la fraction libre et de la fraction liée aux cellules suggère que les MT interviennent dans l'assemblage viral ou dans les étapes en amont, alors que l'actine

jouerait un rôle dans la libération virale (Kallewaard, Bowen, and Crowe 2005). De manière intéressante, une étude de l'expression des gènes cellulaires lors d'une infection par le RSV montre une augmentation de la régulation de 5 gènes impliqués dans l'organisation et la biogénèse du cytosquelette (Martínez et al. 2007).

2.1. Entrée du RSV

L'actine est mise en jeu dans l'entrée virale de différentes manières. Tout d'abord, l'attachement du RSV se fait majoritairement aux niveaux des radeaux lipidiques qui sont des structures dépendantes des filaments d'actine (Lillemeier et al. 2006). En effet, le RSV colocalise avec les radeaux lipidiques lors de l'attachement et leurs perturbations diminuent drastiquement l'infection viral (San-Juan-Vergara et al. 2012; Zheng et al. 2017). De plus, comme évoqué précédemment (paragraphe 2.1, chapitre 2), la fusion virale peut survenir directement à la membrane ou dans les vacuoles après endocytose. Ce phénomène d'endocytose peut être de deux types : endocytose clathrine dépendante ou macropinocytose. Dans les deux cas, le réseau d'actine est impliqué (Kolokoltsov et al. 2007; Krzyzaniak et al. 2013). L'équipe de Zheng a étudié plus précisément les étapes d'entrée du RSV en observant des particules uniques marquées par des fluorochromes stables et brillants (quantum dots). Elle révèle que l'entrée se fait principalement par voie d'endocytose et le trafic intracellulaire dure environ 2h avant d'atteindre la région périnucléaire. La vitesse des particules et leur colocalisation avec des comètes d'actine suggèrent un trafic sur ce réseau. De plus, la perturbation du réseaux d'actine par la Cytochalasine D diminue de 90% l'internalisation virale appuyant l'importance du réseau d'actine dans l'entrée des virions (Zheng et al. 2017). Les MT, quant à eux, ne semblent pas être impliqués dans les mécanismes d'entrée virale.

2.2. Transcription et Réplication

L'actine, et notamment sa participation dans la formation des fibres de stress, semble participer à la transcription et à la réplication virales. Tout d'abord, de l'actine est détectée au niveau des corps d'inclusion (Jeffree et al. 2007) et l'actine semble stimuler positivement la transcription virale. Au contraire, l'addition d'anticorps ciblant l'actine inhibe la transcription virale (Burke et al. 1998). De plus, la présence de fibres de stress semble importante pour la transcription et la réplication. En effet, il est possible d'observer leur formation peu de temps après l'infection (Zheng et al. 2017) et l'inhibition de certaines protéines permettant leur polymérisation montre une diminution de la transcription et de la réplication. Notamment, l'inhibition de la profiline

(Krishnan and Moens 2009), par ARN interférence diminue considérablement la transcription virale (Burke et al. 2000; Bitko et al. 2003) tandis que l'inhibition des facteurs d'élongation de la traduction eEF1A et PI3K diminuent la réplication virale (Wei et al. 2014; Snape et al. 2018; Bitko et al. 2007). Enfin, des protéines de la famille Rho GTPase (RhoA, Rac1 et cdc42), régulatrices de la dynamique de l'actine intracellulaire et de la polymérisation de fibre de stress, sont retrouvées dans les IBs mais leurs rôles précis ne sont pas encore déterminés (Ravi et al. 2021).

2.3. Assemblage et bourgeonnement viral

La vision du rôle du réseau d'actine dans le transport des RNPs, l'assemblage et le bourgeonnement des virions reste encore partielle. Toutefois, différents éléments suggèrent que ce réseau joue un rôle important dans l'assemblage des filaments viraux et dans leur libération. En premier lieu, les filaments viraux contiennent de l'actine (Ulloa et al. 1998) et une interaction entre la protéine de matrice M, qui joue un rôle clé dans ces étapes tardives, et l'actine G et F a été décrite à plusieurs reprises (Ulloa et al. 1998; Kipper et al. 2015; Shahriari et al. 2018). La fonction de cette interaction n'est toutefois pas élucidée. Plusieurs équipes ont publié des résultats en faveur de l'intervention des radeaux lipidiques dans l'assemblage des virions : 1) les protéines virales néosynthétisées telles que F, G, N et M se regroupent au niveau des radeaux lipidiques (Marty et al. 2003; Fleming et al. 2006), 2) et la perturbation des radeaux 8 h post-infection diminue la libération de particules infectieuses de 80-85% (Chang et al. 2012) et 3) l'enveloppe virale possède une composition proche de celle des radeaux lipidiques (Marty et al. 2003; Yeo et al. 2009). De plus, les glycoprotéines de surface virales sont capables d'interagir avec des régulateurs du réseau d'actine, notamment la G avec la cavéoline et la F avec RhoA (Ludwig et al. 2017; Pastey et al. 1999). Lors de l'infection, le RSV induit une activation de RhoA entrainant sa relocalisation à la membrane plasmique où elle interagit avec F (Pastey et al. 1999). L'inhibition de RhoA perturbe la morphologie des virions produits et inhibe la formation des syncytia (Gower et al. 2001; 2005). Les fibres de stress semblent aussi jouer un rôle dans la libération du RSV. En effet, lors de l'infection Rac1 est activée permettant la formation de fibres de stress. L'inhibition de Rac1, ou de son activateur la PI3K, empêchent la formation de filaments viraux sans affecter la transcription virale (Jeffree et al. 2007; Ravi et al. 2021). De plus, Rac1, contrairement à RhoA et cdc42, est retrouvée dans les filaments viraux. Il faut noter que la voie Rac1/PI3K/Akt est également impliquée dans la formation des radeaux

lipidiques (Lin et al. 2014). Les facteurs d'élongation de la traduction eEF1A et APR2 sont également impliqués dans le remodelage de l'actine et la formation des fibres de stress. L'inhibition de leurs expressions par des siRNA entraine une diminution des fibres de stress et de la libération virale (Wei et al. 2014; Snape et al. 2018; Mehedi et al. 2016). Enfin les myosines, moteurs liés à l'actine, pourraient intervenir dans la libération des filaments viraux. L'équipe de Santangelo a en effet observé le mouvement des filaments viraux à la surface de la cellules grâce à un marquage du génome viral par des sondes fluorescentes. Les mouvements des filaments étaient compatibles avec l'intervention des myosines (Santangelo and Bao 2007). En accord avec ces données, la myosine Vb a été identifiée comme un facteur important pour la production de particules virales (Brock et al. 2003).

Peu de données impliquent les MT dans l'assemblage et le bourgeonnement. Vanover et al, montrent toutefois que la dépolymérisation des MT perturbe la formation des pseudo-sites d'assemblage sous la membrane cellulaire (Vanover et al. 2017).

3. Voie de recyclage des endosomes

3.1. Les Rab GTPases

Les Rab GTPases font partie de la superfamille des Ras GTPase, petites protéines de 20 à 30 kDa liant le GTP. Les Ras GTPases jouent un rôle important de modulateur dans divers processus biologiques tels que la transduction du signal, la croissance cellulaire, la transformation, le transport, la motilité, le trafic et l'adhésion (Emily J. Chenette The enzyme 2011). Elles sont retrouvées aussi bien chez les plantes que chez les levures ou les mammifères. Plus de 150 Ras GTPases sont ainsi recensées chez homme. La conservation de leurs séquences et de leurs structures permet de les classer en 5 catégories : Ras, Rho, Ran, Arf et Rab.

La famille des Rab GTPase (Ras relateds protein in brain) (Touchot 1987) est la sous-famille la plus étudiée de la superfamille des Ras GTPase. Chez l'Homme, elle comprend plus de 60 protéines qui régulent la majorité des transports membranaires intracellulaires. Elles interviennent dans la sélection des vésicules, la fusion des membranes, la formation ciliaire...

Elles assurent leurs fonctions en passant d'une forme active liée au GTP à une forme inactive liée au GDP ce qui constitue le cycle des Rab GTPases (schématisé en Figure 19) (Hutagalung and Novick 2011; Hervé and Bourmeyster 2018). La forme active Rab-GTP est monomérique et membranaire. L'hydrolyse du GTP conduit à son inactivation (Rab-GDP) et à son extraction des

membranes cibles. Rab-GDP peut alors être retrouvée sous forme monomérique dans le cytosol ou dimérique fixée aux membranes (Pasqualato 2004,2005). Ce cycle d'activation/inactivation de Rab est régulé par différents partenaires des Rabs. Les changements d'état actif/inactif sont en effet catalysés par les protéines GEFs (guanine nucleotide exchange factor) permettant le remplacement du GDP en GTP et les protéines GAPs (GTPase accelerating protein) permettant l'hydrolyse du GTP en GDP. La protéine GDI (GDP dissociation inibitor) a pour rôle d'extraire la forme Rab-GDP inactive des membranes et joue le rôle de protéine chaperonne des Rab-GDP cytosoliques. Au contraire, les protéines GDF (dissociation factor) vont aider à sa ré-insertion dans la membrane cible (Figure 20).

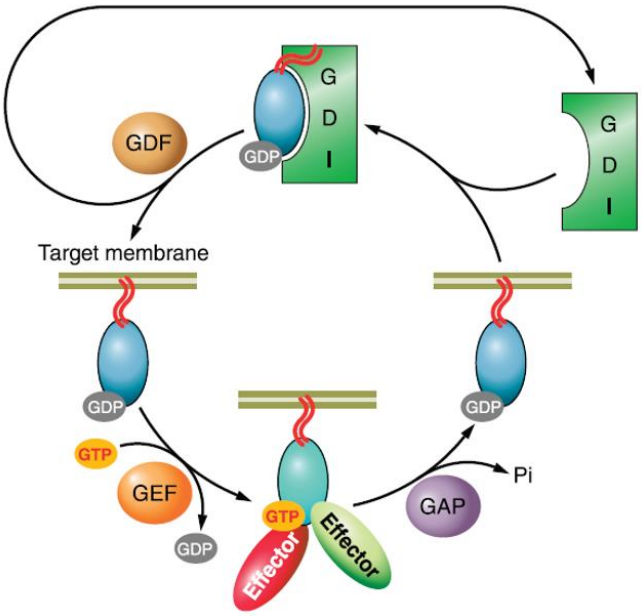


Figure 20. Cycle des Rab-GTPases. Ce schéma représente le cycle d'activation-inactivation des Rab-GTPases facilité par les protéines GDI (GDP dissociation inibitor), GEF (guanine nucleotide exchange factor) et GAD (GTPase accelerating protein). Extrait de Hutagalung and Novick 2011.

3.2. Structure de Rab11a

Chez les mammifères, la sous-famille des protéines Rab11 est composée de Rab11a, Rab11b et Rab25 (aussi appelée Rab11c). Rab11a est une protéine monomérique de 216 acides aminés d'une masse de 24 kDa (Kikuchi et al. 1988). Les structures cristallographiques des formes actives (complexée au GTP) et inactives (complexée au GDP) ont été résolues en 2004 par l'équipe de Pasqualato (Pasqualato et al. 2004). Les protéines Rab11 ont une structure similaire à celle des autres Rab-GTPases, composée de 6 brins β et de 5 hélices α (Figure 21). Elles possèdent 2 régions appelées Switch 1 et 2 qui jouent un rôle important dans les interactions avec les nucléotides GTP/GDP. La liaison entre les nucléotides et les régions switch va entrainer des modifications conformationnelles (Pasqualato et al. 2004; Pfeffer 2005). En C-terminal, une région hypervariable, composée de 43 aa, contient deux cystéines liées de façon covalente à

une ancre geranylgeranyl. Cette ancre permet l'association aux membranes et va jouer un rôle essentiel dans l'interaction avec les protéines régulatrices des transports cellulaires.

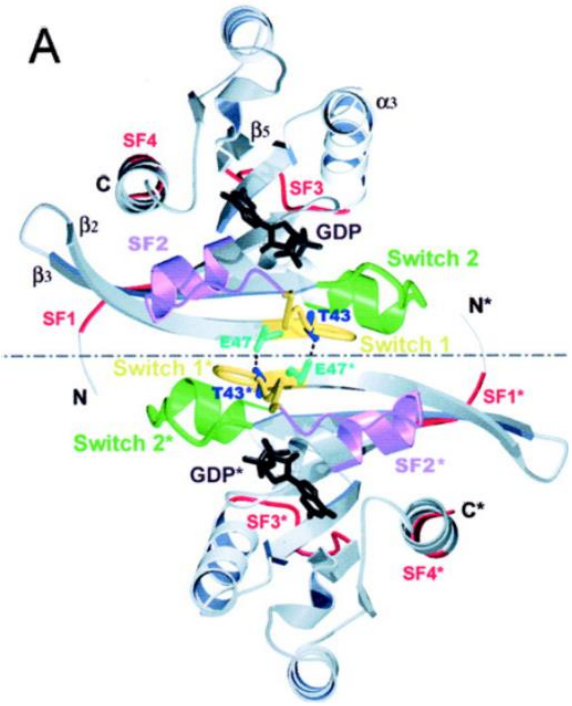


Figure 21. Structure de la protéine Rab11a. Le dimère Rab11-GDP dont l'axe non cristallographique est représenté par une ligne brisée. Les acides aminés et les éléments structurels de la molécule symétrique sont indiqués par un astérisque (*). Les régions de commutation (switch) sont indiquées en jaune et en vert et sont enterrées dans l'interface.

3.3. Rôles cellulaires de Rab11

Rab11 est impliquée dans une grande variété de trafics cellulaires. Elle est localisée sur les membranes du trans Golgi Network (TGN), du post Golgi et sur les vésicules de recyclage à la membrane. Elle se place à l'intersection entre le trafic des vésicules d'endocytose et d'exocytose (Welz, Wellbourne-Wood, and Kerkhoff 2014) en recyclant des vésicules de la voie d'endocytose et des vésicules issues du Golgi à la membrane plasmique (Figure 22). Même s'il existe un consensus général, les trafics peuvent varier d'un type cellulaire à l'autre.

La voie Rab11 a de nombreux rôles. Elle fut initialement décrite comme la voie responsable du recyclage, dit « lent », de la transferrine à la membrane. La voie Rab11 permet de recycler les protéines endocytées vers la membrane plasmique.

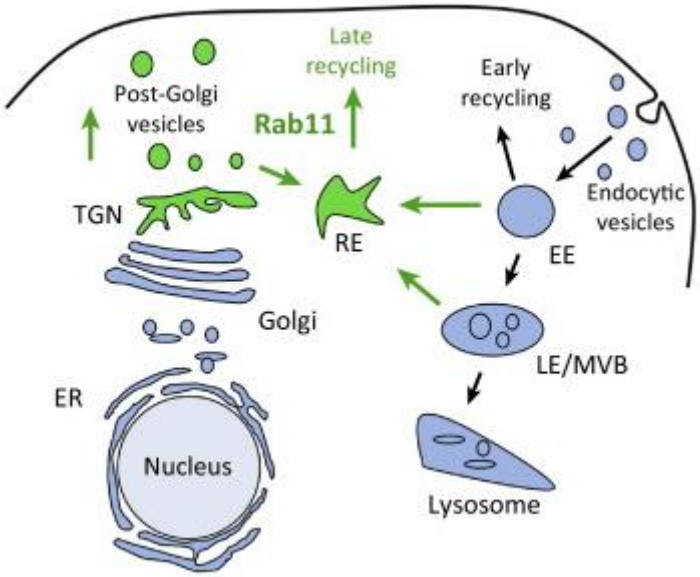


Figure 22. Processus de transport de vésicules régulées par Rab11. Dans les voies de transport membranaire, Rab11 se localise au TGN, aux vésicules post-Golgi de la voie sécrétoire et au réticulum endoplasmique (RE). La diversité du trafic de Rab11 est montrée par des flèches vertes et indiquent la direction du transport de Rab11 dans différents types de cellules et dans différentes conditions cellulaires. Extrait de Welz 2014.

Cellules polarisées

La voie Rab11 est principalement connue pour son rôle essentiel dans l'établissement et le maintien des membranes basales et apicales des cellules polarisés. Ainsi que dans celles des jonctions adhérentes et serrées (Goswami et al. 2021). En effet les surfaces apicales des cellules polarisées ont une composition différente de la surface basale. En apicale se trouve du cholestérol, sphingolipide, glycolipide ainsi que plusieurs types de récepteur (Zegers and Hoekstra 1998) au contraire la membrane basale est plutôt composée de E-cadhérine, intégrine et facteur de croissance (Lock and Stow 2005). Les cellules polarisées possèdent un système spécialisé de recyclage à la membrane apicale, aussi appelé ARE marqué par la protéine Rab11, dont le rôle va être de recycler les protéines apicales préalablement endocytées (Jing and Prekeris 2009). De plus, Rab11 régule également le transport post Golgi impliqué notamment dans la ciliogénèse en interaction avec d'autres protéines tel que Rabine8 et Rab11-FIP3 (Vetter et al. 2015).

Homéostasie de la voie endosome-lysosome

Du fait de son rôle central dans les transports endo-exocytose, Rab11 a un impact important dans divers processus de transport. Il a été rapidement démontré que Rab11 était essentielle pour le transport du TGN à la membrane basolatérale de marqueurs (W. Chen et al. 1998; Lock and Stow 2005) et dans le transport d'enzyme de glycosylation (Kitano et al. 2021). Malgré un rôle mineur de Rab11b, Rab11 participe à l'homéostasie de la voie endosome-lysosome et Rab11a permet le recyclage du récepteur au Mannose-6-phosphate des endosomes au TGN (Zulkefli et al. 2019).

Rab11 influence plusieurs processus cellulaires tels que la cytokinèse, la phagocytose, la migration et la prolifération cellulaire, l'assemblage immunologique des synapses et l'autophagie (Welz, Wellbourne-Wood, and Kerkhoff 2014).

3.4 Effecteurs moléculaires de Rab11

La voie de recyclage des endosomes est modulée par la famille des protéines interagissant avec les protéines Rab11 (Rab11-FIPs pour Family interacting protein) (Horgan and McCaffrey 2009). Elles font le lien entre les vésicules d'endocytose et les moteurs moléculaires. La famille Rab11-FIPs comprend 5 membres (Figure 22). La partie C-ter est très conservée et contient le domaine de liaison à Rab11 (Rab11 binding domain : RBD). La partie N-ter des Rab11-FIPs est composée soit d'un domaine C2 soit d'un domaine EF-hands (EF) qui sont impliqués dans l'interaction avec les bicouches lipidiques des membranes vésiculaires. Les Rab11-FIPs sont capables de former divers polymères, mais Rab11 semble interagir sélectivement avec les homodimères en formant un hétérotétramère comme le montre la Figure 23 (Machesky 2019; Kearney and Khan 2020).

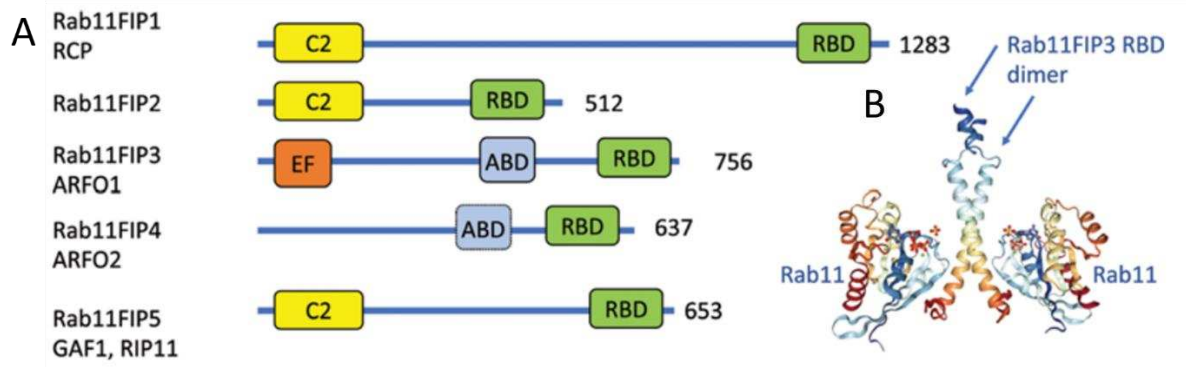


Figure 23. Protéines Rab11-FIPs. A) Les domaines sont représentés par des boîtes. Le domaine C2 (jaune) EF (orange) permet l'interaction aux membranes, RBD (vert) est le domaine de liaison de Rab11, ABD (bleu clair) est le domaine de liaison de la GTPase Arf. Les chiffres indiquent le nombre d'acides aminés. B) La structure de droite montre le dimère RBD de Rab11FIP3 en complexe avec deux molécules de Rab11. Extrait de Machesky 2019.

Les différentes Rab11-FIPs sont :

- Rab11-FIP1, existe sous 3 isoformes (Jin and Goldenring 2006). L'isoforme C, également appelée RCP, est la plus étudiée et est principalement associée aux transports des structures contenant de la transferrine et aux endosomes marqués Rab11 (Peden et al. 2004). De plus sa phosphorylation par MARK2 régule la polarité de cellules polarisées MDCK (McRae et al. 2017).

- Rab11-FIP2 régule la polarisation des cellules, la composition dans les jonctions serrées et adhérentes (Lapierre et al. 2012) ainsi que le trafic de plusieurs récepteurs tels que le récepteur CXCR2 (Fan et al. 2004) et le récepteur de la transferrine (Lindsay and McCaffrey 2002). De plus, le domaine central de Rab11-FIP2 peut interagir avec une protéine motrice du cytosquelette d'actine, la myosine Vb (Hales, Vaerman, and Goldenring 2002).

- Rab11-FIP3 est plutôt impliquée dans le contrôle de la forme (Bouchet et al. 2016), de la mobilité cellulaire (Jing et al. 2009) et dans le trafic membranaire durant la cytokinèse (Horgan et al. 2004).

- Rab11-FIP4 est majoritairement exprimée dans les tissus neuronaux et régule la prolifération et la différentiation rétinienne (Muto, Aoki, and Watanabe 2007). Tout comme Rab11-FIP3, elle peut intervenir dans le trafic membranaire durant la cytokinèse (Fielding et al. 2005).

- Rab11-FIP5/Rip11 médie le transport vers la voie de recyclage lent (des endosomes précoces aux endosomes de recyclage) et permet l'interaction avec le moteur moléculaire KIF3a (Schonteich et al. 2008).

3.5 Moteurs moléculaires associés aux mouvements des vésicules Rab11

Rab11 est capable d'interagir avec différents moteurs moléculaires soit directement soit via les effecteurs des Rab11-FIPs (Figure 24). Les vésicules Rab11 positives sont transportées sur les réseaux d'actine et sur les MT (Welz, Wellbourne-Wood, and Kerkhoff 2014). Un des moteurs est la kinésine KIF13a. Celle-ci qui semble interagir avec Rab11-GTP indépendamment des effecteurs Rab11-FIPs (Delevoye et al. 2014; Ramos-Nascimento et al. 2017). Rab11-GTP peut également interagir avec le moteur KIF3b via l'effecteur Rab11-FIP5 (Schonteich et al. 2008). Quant à Rab11-GDP, elle peut interagir avec la kinésine KIF5a via la protrudine. Cette liaison aurait pour but de maintenir Rab11 dans son état inactif et de transporter Rab11 vers le site cible (Matsuzaki et al. 2011). Le transport rétrograde met en jeu des interactions entre Rab11 et les chaines légères 1 et 2 de la dynéine grâce aux effecteurs Rab11-FIP3 (Horgan et al. 2010a). Sur les filaments d'actine, seule la myosine Vb est connue comme moteur moléculaire de Rab11 via l'interaction avec Rab11-FIP2 (Lindsay and McCaffrey 2002; Pylypenko et al. 2018).

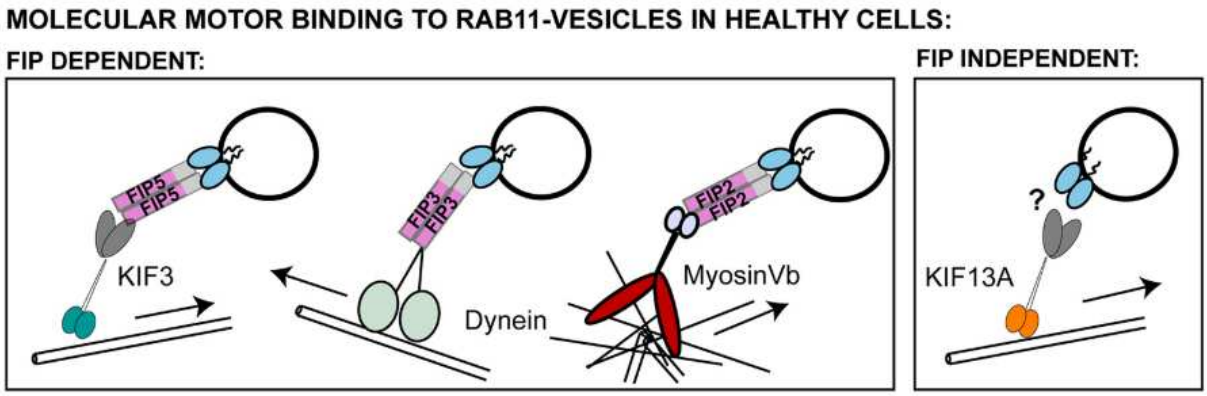


Figure 24. Interaction entre Rab11 et les moteurs moléculaires. Le schéma représente l'interaction entre Rab11 et les moteurs moléculaires. Cette interaction peut nécessiter les effecteurs Rab11-FIPs. Ramos-Nascimento 2017.

3.6 Implication de Rab11 et de ses partenaires dans la multiplication du RSV

L'implication de la voie de recyclage des endosomes (Rab11 positif) dans les étapes terminales du cycle du virus respiratoire syncytial a été mis en évidence dans quelques études. Un crible d'interatomique en micro-fluidique a révélé une interaction potentielle entre la protéine de matrice virale M et la protéine Rab11a et Rab11b. Néanmoins ces interactions n'ont pas pu être confirmées lors des expériences de co-immunoprécipitation de M et Rab11 (Kipper et al. 2015).

L'équipe de JR. Crowe a suggéré que la voie Rab11 était impliquée dans les étapes terminales de la multiplication du RSV dans un contexte d'infection en cellules polarisées. Ils ont induit l'expression d'une version tronquée, dominant négatif, fluorescente de la myosine Vb (MyoVb-tail-GFP). L'expression de cette MyoVb-tail-GFP entrainait une diminution du titre viral de 2 à 4 log et une diminution de la propagation virale aux cellules voisines. De plus, la transfection entrainait une réorientation du bourgeonnement du côté basolatéral et une localisation perturbée de la protéine F. L'expression d'une forme tronquée de Rab11-FIP1 et de Rab11-FIP2 diminuent d'un log le titre viral (Brock et al. 2003) (Utley et al. 2008). L'expression d'une forme tronquée de Rab11-FIP2, incapable d'interagir avec les membranes (Rab11-FIP2ΔC2), conduit aussi à un allongement des filaments viraux et une accumulation de Rab11-FIP2ΔC2 au niveau des corps d'inclusion et des filaments viraux. Pour rappel, Rab11-FIP2 permet l'interaction entre la myosine Vb et Rab11. Ces résultats suggèrent un rôle du transport Rab11 actine dépendants dans les étapes terminales de la multiplication du RSV (Utley et al. 2008). Il faut toutefois noter que l'effet de l'expression des formes tronquées de la myosine Vb ou des FIP sur les étapes d'entrée du RSV n'a pas été analysée

dans ces travaux. Ainsi la diminution des titres viraux observée pourrait résulter, au moins en partie, d'un défaut d'entrée.

Enfin une étude récente montre que l'infection par le RSV perturbe le fonctionnement de la voie Rab11. En effet, l'étude du trafic des vésicules Rab11 en microscopie montre une augmentation significative de la vitesse des vésicules Rab11 et du caractère rectiligne de leurs trajectoires (Bhagwat et al. 2020a).

Matériels et Méthodes

1. Matériels

Cellules

Types cellulaires	Origines	Milieu de culture
HEp-2	Cellules épithéliales humaines dérivées de carcinome du col utérin	MEM* (Gibco) GlutaMAX + 10% Sérums de veau foetal (SVF) et 1% pénicilline-streptomycine (PS, Gibco)
A549	Cellules épithéliales alvéolaires humaines dérivées d'un carcinome pulmonaire	DMEM** (DMEM, Gibco) GlutaMAX + 10% SVF + 1% PS
A549-HA-Rab11-WT et A549-HA-Rab11-S25N	Cellules épithéliales alvéolaires humaines dérivées d'un carcinome pulmonaire Surexprimant la protéine HA-Rab11 (WT) modifié S25N dominant négatif (DN) (de Castro Martin et al. 2017)	DMEM** (DMEM, Gibco) GlutaMAX + 10% SVF + 1% PS + 1µg/mL puromycine (Sigma)
BSR-T7	Dérivées de la lignée BHK-21, des cellules épithéliales de rein de hamsters, exprimant constitutivement la polymérase du bactériophage T7.	DMEM GlutaMAX + 10% SVF + 1% PS
BCI-NS1 (Walters et al. 2013)	Cellules de l'épithélium respiratoires immortalisées	Milieu de prolifération : BEGM (Lonza, cat # CC-3170) Milieu de différenciation : DMEM/F12 (Sigma, D8437) + 2% Ultroser G (Sartorius)

* Minimum Essential Media
** Dulbecco's Modified Eagle Medium

Les cellules sont passées deux fois par semaine lorsque le tapis cellulaire atteint une confluence d'environ 90%. Après un rinçage au Phosphate Buffered Saline (PBS, Gibco), les cellules sont incubées en Trypsine-Etylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA) 0,05% (Gibco) pendant 5 min à 37°C puis reprises en milieu approprié. Les cellules sont dénombrées en cellule Kova puis remises en culture dans un support approprié à 37% sous CO^2 5%.

Virus

Les virus RSV-WT#18, RSV-GFP-N #3 exprimant une GFP-N, RSV-mCherry#3 exprimant une protéine mCherry, RSV-m-GFP#5 exprimant une protéine mGFP, RSV-Luciférase #32 exprimant une protéine Luciférase et RSV-Δ-NS2#2 sont produits par génétique inverse au sein de notre équipe (Rameix-Welti et al. 2014).

Anticorps

	Fournisseur	Référence	Dilution utilisée
N lapin	INRAe Jouy-en-Josas		WB et IF : 1/50 000
P lapin			WB : 1/1000
M lapin			WB : 1/3000
M2-1 lapin			WB : 1/5000
M souris	INRAe	/	IF : 1/200
Rab11a lapin	Thermofisher	# 71-5300	IF : 1/50 WB : 1/1000
EEA1 lapin	Cell signaling	(C45B10) mAb #3288	IF : 1/200
P souris	B16/021	(Richard et al. 2018)	IF : 1/1000
F souris	Abcam	B016 ab24011	IF : 1/600
HA rat	Roche	11867423001	IF : 1/500
HA lapin	Cell signaling	(C29F4) #3724	WB : 1/800

Les anticorps en provenance de l'INRAe ont été produits par immunisation de lapin par la protéine N, P, M ou M2-1 purifiée.

Les anticorps secondaires utilisés en immunofluorescense et Western Blot (WB) sont des anticorps commerciaux (respectivement ThermoFisher et Promega) ciblant les chaîne lourdes et légères des immunoglobulines de lapin, souris ou rat. Les Anticorps d'IF sont couplés à un fluorochrome Alexa Fluor et utilisés au 1/1000ème tandis que les anticorps de WB sont couplés à la peroxydase de Raifort et utilisés au 1/10 000ème.

2. Méthodes

Marquage par immunofluorescence

Les cellules sont rincées au PBS puis fixées au PBS-Paraformaldéhyde 4% pendant 10 min à température ambiante (TA) puis remises en PBS et conservées à 4°C. Les cellules sont perméabilisées et saturées en PBS-BSA1%-Triton 0,25% pendant 10 min à TA puis rincées en PBS, incubées pendant 1h à TA avec l'anticorps primaire dilué à la concentration souhaitée en PBS-BSA 1%. Après 3 rinçages en PBS, les cellules sont incubées de 30 min à 1 h avec l'anticorps secondaire dilué en PBS-BSA 1% à l'obscurité avec addition ou non de Hoechst 33342 (Sigma). Après 3 rinçages au PBS et séchage des lamelles, celles-ci sont montées sur lame en Prolong Diamond (ThermoFisher).

Infection virale et amplification

Réverse génétique

La veille, des cellules BSR-T7 exprimant la polymérase T7 sont ensemencées à une concentration de 1.10^6 par puits de P6. Quatre µg de plasmides dont P à 1 µg, N à 1 µg, L à 0,5 µg, M2-1 à 0,25 µg M2-1 et un plasmide d'expression de l'ARN génomique du RSV à 1,25 µg (pacNR-RSV-GFP-N ou pacNR-RSV-Δ-NS2) sont incubés avec 200 µL d'OptiMEM. En parallèle, 200 µL d'OptiMEM et 10 µL de Lipofectamine 2000 (ThermoFisher), puis ajoutés au mix plasmides-OptiMEM. Le mélange est déposé sur les cellules préalablement rincées et incubées dans du DMEM-2%SVF sans antibiotique. Après 72 h p.t. les cellules sont récoltées une partie

est congelées pour le titrage et constitue le passage P0 et 500 µL sont utilisées pour infecter des cellules HEp-2 précédemment ensemencées à 1.10^6 la veille en P6. Après 72 h p.i. les cellules sont récoltées de la même manière que précédemment et constitue le P1, 500 µL sont utilisées pour infecter une T150 de cellules HEp-2 à 80% de confluence (Rameix-Welti et al. 2014; Bouillier, Rincheval, et al. 2019).

Amplification virale

L'amplification virale est réalisée sur cellules HEp-2 à une MOI de 0,01 à 0,05 en MEM GlutaMAX-0%SVF-1%PS. Après une adsorption de 2h sous agitation douce, l'inoculum est retiré et remplacé par du milieu MEM GlutaMAX-2%SVF-1%PS à 37°C sous CO^2. Après 72 heures post infection (hpi) et/ ou en présence d'un effet cytopathogène (ECP) supérieur à 70%, les cellules et le milieu sont récoltés par grattage avant une homogénéisation vigoureuse par vortex. Un milieu de conservation (0,5 M HEPES, 1 M MgSO4, pH 7,5) est ajouté à 10%. Le stock est clarifié par centrifugation pendant 5 min à 500 rpm. Le surnageant est aliquoté en fiole de 0,5 à 2 mL puis congelé dans de l'alcool à -80°C pendant 24 h avant d'être remis à -80°C. Les virus recombinants utilisés pour les expériences sont d'un passage 2 à 4 (soit P0 correspondant à la réverse génétique sur BSR-T7, P1 au passage pendant 72h sur HEp-2 puis un nouveau passage sur HEp-2 constituant le P2).

Infection de cellules par le RSV

Les cellules sont ensemencées la veille pour atteindre une confluence de 70-90% le jour de l'infection. Elles sont rincées au PBS, puis l'adsorption est réalisée avec une dilution virale à une MOI souhaitée dans du milieu de culture à 0%SVF-1%PS. Après 2 h sous agitation, l'inoculum est retiré et remplacé par du milieu de culture 2%SVF-1%PS. Cette dernière étape définit le temps 0 de l'infection.

Mesure de l'activité luciférase des cellules infectées par le RSV-Luc

Des cellules A549 en plaque 96 puits à fond blanc préalablement transfectées par des siRNA ou non sont infectées à différentes MOI (de 0,02 et 1) par le RSV-Luc pendant le temps indiqué puis sont lysées dans 50 µL du tampon de lyse (Tris 25 mM pH 7,8, MgCl2 8 mM, Triton X-100 à 1%, 15% Glycérol, dithiothréitol 1 mM) pendant 10 min. L'activité luciférase du lysat est mesurée 1 seconde après addition de 100µL de tampon de lyse + D-luciferine (Sigma) + ATP 10 µM à 37°C sur le M2000PRO Infini Tecan.

Clonage

Construction du plasmide pmCherry-Rab11a

Une séquence mCherry est amplifiée par PCR (polymerase chain reaction) à l'aide d'amorces spécifiques (Tableau 2) à partir de 50 ng de plasmide pCITE-mCherry-N. La réaction s'effectue dans un volume final de 50 µL dans le tampon recommandé par le fabricant en présence de dNTP (0,5 mM), des amorces spécifiques (0,2 µM chacune) et de 20 U de Phusion DNA polymerase (Thermo). Trente-cinq cycles d'amplification (95°C 30'' ; 55°C 1' ; 72°C 1'/kb) sont réalisés dans un thermocycleur DNA Engine PTC-200 Peltier Thermal Cycler (Biorad). La séquence GFP du plasmide peGFP-Rab11a fourni par Dr Sauvonnet est remplacée par le

mCherry, précédemment produit, entre NheI et XhoI puis le plasmide est amplifié en E.coli DH10β chimiocompétente et purifié par Midiprep (Macherey-Nagel) pour obtenir le plasmide pmCherry-Rab11a.

Tableau 2. Amorces utilisées pour le clonage de pmCherry-Rab11a.

mCherry_NterRab_NheI_for	TTTTTGCTAGCCTAGCaccATGGTGAGCAAGGGCGAGG
mCherry_NterRab_XhoI rev	TTTTTCTCGAGCTTGTACAGCTCGTCCATGCCG

Construction du plasmide pacNR-Δ-NS2

Un fragment vecteur-NS1 a été amplifié à partir de la séquence pacNR-RSV#18 avec les amorces figurant en tableau 3 sur la séquence matrice pacNR-RSV#18. La séquence du plasmide matrice pacNR-RSV#18 située entre KpnI et SmaI et correspondant à la séquence promotrice, NS1 et NS2 a été enlevé et remplacé par un fragment vecteur-NS1 ligué par complémentarité de séquence par Gibson. Le plasmide est amplifié et purifié à partir de bactérie E.coli chimiocompétente.

Tableau 3. Amorces utilisées pour générer le plasmide pacNR-RSV-Δ-NS2.

NS1_rev	tcttctatcttatatggtac CCTTAAGTTTTATATTAACTAATGGTGCTAGTGAC
vector_fwd	aatcgtatgtgtatgatcccGGGTTTTGCCGGCTTTTC

Préparation de bactéries chimiocompétentes

Une préculture de bactérie DH10β est effectuée en milieu LB (Luria-Broth, Sigma®) sans antibiotique à partir avec de bactérie réisolée sur boîte, puis incubée à 37°C sous agitation. Quand l'absorbance à 560 nm de la culture (mesurée par spectrophotométrie (Ultrospec2100 pro, Amersham®)) atteint une densité optique de 0,3, les bactéries sont incubées sur glace pendant 20min puis centrifugées à 4000 g pendant à froid 5 min avant d'être resuspendues en tampon TFB1 16 mL (30 mM d'acétate de potassium, 10 mM de chlorure de calcium, 50mM de chlorure de manganèse, 100 mM de chlorure de rubidium et 15% de glycérol) puis incubées sur glace 20min. Les bactéries sont ensuite culotées par centrifugation, resuspendues à froid en tampon TFB2 4mL (10 mM MOPS, 75 mM de chlorure de calcium, 10 mM de chlorure de rubidium, 15% glycerol) et aliquotées à froid avant d'être congelées par immersion dans l'azote liquide puis stocké à -80°C.

Transfection des cellules

Transfection de plasmides et infection

Les cellules HEp-2 ou A549 sont ensemencées la veille a une concentration de $2{,}5.10^5$ sur lamelle en puits de plaque 24 puits (P24) ou en IBIDI 35mm. Les plasmides pKIF13a et pKIF13a-ST (fournie par le Dr Delevoye) et pmCherry-Rab11a sont transfectées à 0,5 µg par puits et 1,25 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) en milieu DMEM-2%SVF sans antibiotique selon les recommandations du fabricant. Une heure après les cellules sont infectées à une MOI de 1 avec les virus RSV-WT ou RSV-GFP-N.

Transfection de siRNA

Les siRNA utilisés correspondent à un pool de 4 siRNA différents ciblant le même gène (ON-TARGETplus SMARTpool, Dharmacon). Les siRNA sont stockés à une concentration de 10 µM dans de l'eau pure et conservés à -80°C.
Les siRNA dirigés contre les moteurs moléculaires sont dilués au 1/100 dans de l'Opti MEM (Invitrogen) avec du Dharmafect (Dharmacon) au 1/50ème. Le mélange est incubé 30 min à température ambiante. En parallèle, on ensemence un puits de P96 avec 75 µL cellules A549 à 3. 10^4 en suspension dans du DMEM 10% SVF sans antibiotique. Puis le mélange siRNA-Dharmafect-OptiMEM est déposé sur les cellules, à raison de 25 µL. Après 48 h p.t. les cellules sont infectées comme indiqué précédemment.
La transfection des siRNA dirigés contre la protéine Rab11a est réalisée avec la LipoRNAiMax (ThermoFisher) selon les recommandations du fabricant. En bref, 10 ng de siRNA et 0,375 µL de LipoRNAiMax sont dilués dans 6,75 µL d'OptiMEM (Invitrogen) et incubés 5 min à TA avant d'être ajoutés à 110 µL d'une suspension de $2{,}10^4$ cellules A549 en milieu complet sans antibiotique.

Analyse d'image

Colocalisation

La colocalisation est réalisée grâce au logiciel ICY. Les spots correspondant dans les canaux de fluorescence correspondant à N et Rab11 sont détectés par « Spot Detection » avec un filtre de taille fixé 1 à 100 pixels (image 512x512 objectif *63 zoom 4) prenant en compte le 3D. Le Scale 2 est fixé à 60% pour N et 110% pour Rab11. La colocalisation est réalisée avec « Colocalisation Studio Objet » avec une distance entre les N et Rab11 fixée de 1 à 3 pixels maximum.

Quantification de l'aire des particules

Les cellules A549 infectées par RSV-WT fixées et immunomarquées sont imagées au confocal SP8 Leica. Les images sont ensuite analysés par ImageJ/Fiji à l'aide plugin CASQITO (de Noiron et al. 2021) avec sélection du threshold manuelle et unique pour chaque cellule. Les aires des particules vont être triées en fonction de leur taille grâce aux Pack office Excel.

Coimmunoprécipitation

Lyse cellulaire

Les cellules A549 ou exprimant HA-Rab11a infectées par RSV-GFP-N, RSV-L-GFP, RSV-GFP ou RSV-WT pendant 16 heures ont été lysées dans un tampon de lyse co-IP (Tris 25mMpH 7.2 ; NaCl 150 mM ; IGEPAL® CA-630 0.2% (Sigma) ; glycérol 10% (v/v) ; EDTA 0. 5mM ; antiprotéase et phosphatase (Thermofisher)), puis incubées pendant la nuit à 4 °C avec des billes GFP-Trap (Chromotek) ou des billes Magnetic-HA (Thermofisher) selon les recommandations du fabricant. Les billes ont été rincées trois fois dans un tampon de dilution de co-IP (Tris 25 mM pH 7,2 ; NaCl 150 mM), puis éluées dans un tampon Laemmli à 95 °C et analysées par SDS-PAGE.

Western Blot

Les échantillons sont chauffés 5 min à 95°C puis les protéines sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide 10%Mini-PROTEAN TGX Stain-free (Biorad) ou gradient 4-20% Precast (Biorad) en tampon Tris-Glycine-SDS 0,1% à 120V pendant 45 min. Les protéines totales sont visualisées par fluorescence UV grâce au composé présent dans le Stain-free. Les protéines sont transférées sur membrane PVDF (Biorad) par le système de transfert Turbo Trans-Blot (Biorad). Les protéines transférées peuvent être visualisées par fluorescence UV sur membrane PVDF. Après 1 h de saturation à TA en PSB-Tween 20 0,25%-Régilait 1%, la membrane est incubée avec l'anticorps primaire dilué en PBS-Tween 20 0,25%-BSA 1% 2h à TA. Après 3 rinçages en PBS-Tween 20 0,25%, la membrane est incubée 1 h avec l'anticorps secondaire dilué en PBS-Tween 20 0,25%-BSA1%. La membrane est rincée 3 fois en PBS-Tween 20 0,25%. La présence de péroxydase de raifort (HRP) est révélée après une incubation de 2 min dans du WesternBright Sirius HRP substrat (Advansta) et le signal luminescent est enregistré par caméra à haute intensité (Chemidoc 1000, Biorad).

Pour la visualisation spécifique de la protéine L, les extraits protéiques en tampon Laemmli sont dénaturés par chauffage à 37°C pendant 1 h puis mis sur glace. Le transfert sur PVDF est réalisé en TG- 10% éthanol pendant 2h à 100V.

Marquage et dépolymérisation du cytosquelette

Les cellules A549 ou HEp-2 sont marquées ou non au SiR-tubulin Kit (SC002) (Spirochrome). Suivant le protocole du fournisseur le SiR-actin/tubulin est dilué à 1000 nm dans 300 µL dans du milieu de culture cellulaire (DMEM+10%SVF+PS) et vortexé et incubé 30 minutes. Afin, d'inhiber la pompe d'efflux cellulaire, ajout de Vérapamil à 10 µM dilué dans 500 µL le milieu de culture cellulaire juste avant l'analyse.

La dépolymérisation des microtubules dépend de la manipulation. Pour une dépolymérisation très rapide (10 min) la concentration de Nocodazole (Sigma) est de 20 µM, pour 1h de 10 µM et pour une longue durée de 2 µM. La dépolymérisation rapide des filaments d'actine est effectuée à 2 µM par de la cytochalasine D (Sigma).

Imagerie de cellules vivantes et analyse des trajectoires

Les expériences de vidéo-microscopie ont été réalisées sur des cellules A549 ou HEp-2 ensemencées sur des Ibidi µ-Slide Angiogenesis (Ibidi), infectées et traitées comme décrit ci-dessus. Des acquisitions time-lapse d'une minute ont été réalisées à 37°C et 5% de CO^2 à l'aide d'un microscope confocal inversé avec un objectif à immersion d'huile 100x (Plan-APOCHROMAT), une tête à disque rotatif CSU-X1 (Yokogawa, Japon) et une caméra sCMOSPRIME 95B (Photometrics). L'ensemble du dispositif était piloté par le logiciel MetaMorph (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Une à trois sections z avec un pas de 0,8 µm ont été acquises à des intervalles de 70 à 210 ms pendant 1 min. L'intensité du laser était réglée entre 10 et 20 % de puissance, et le temps d'acquisition était de 50 ms. Les données brutes ont été traitées à l'aide du logiciel ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD,

USA) pour effectuer des projections maximales des images de piles z et une soustraction du fond. L'analyse des traces a été effectuée sur le logiciel Imaris 9.5.0 (Bitplane Inc.). Les points fluorescents ont été identifiés à l'aide de l'algorithme de génération de points intégré à Imaris (avec une taille de point d'ensemencement de 250 nm). La génération des spots a été réalisée manuellement pour chaque ensemble de données en utilisant l'intensité au centre de chaque spot comme seuil. Le seuil de qualité a été fixé au-dessus de 20,0. Les spots ont été suivis dans le temps afin de générer des statistiques de mouvement pour chaque cellule en utilisant l'algorithme de mouvement autorégressif (distance maximale 1 µm, taille maximale de l'écart 2). Le fichier de sortie Imaris "Position.csv" a ensuite été utilisé pour calculer les caractéristiques de chaque trajectoire (durée de la trajectoire, longueur de la trajectoire, déplacement de la particule, vitesse maximale observée sur la trajectoire, vitesse moyenne de la trajectoire) et pour filtrer les trajectoires en utilisant le script PYTHON dédié disponible sur GitHub (https://github.com/mawelti/RSV-RNP-TrackAnalysis). Toutes les trajectoires inférieures à 4 pas de temps ont été filtrées. Les coordonnées de la zone des IBs ont été saisies manuellement afin de supprimer les fausses trajectoires générées par de fréquentes fausses détections dues à un bruit de fond élevé à proximité des IBs. Les trajectoires dont la vitesse instantanée est toujours inférieure à 50% de la vitesse instantanée maximale ont également été filtrées afin de supprimer les liens artéfactuels entre deux objets lents. La vitesse instantanée lissée a été calculée comme le rapport entre la distance minimale entre la première et la quatrième de 4 positions consécutives et l'intervalle de temps entre ces positions. Nous avons choisi de lisser la vitesse instantanée car l'intervalle de temps entre 2 images étant très petit (0,07 à 0,21s), un déplacement de 250 nm correspondant à l'erreur de position de la microscopie à fluorescence (diffraction) aboutissait à une vitesse instantanée élevée (1,2 à 3,6 µm/s). Pour comparer l'effet des traitements, des comparaisons statistiques entre les médianes ont été effectuées dans le logiciel Prism (Graphpad Inc.) comme indiqué dans les légendes. Tous les tests utilisés dans ce rapport sont bilatéraux. Pour la visualisation, les données brutes ont été traitées avec le logiciel ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Les piles d'images ont été traitées comme des projections maximales et visualisées après un filtre gaussien fixé à 0,5.

Objectif

Malgré des années de recherches sur le virus respiratoire syncytial, aucun antiviral ni vaccin n'est actuellement commercialisé à l'exception d'un anticorps monoclonal humanisé, le Palivizumab. Celui-ci est utilisé en prévention des formes sévères chez les nouveau-nés à haut risque et son rapport cout-bénéfice reste discuté. Les étapes d'entrée étant les plus documentés, la majorité des antiviraux en développement ont pour cible ces étapes et notamment la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire. En revanche, les étapes tardives virales sont encore étudiées et mal comprises. L'équipe ATIP-Avenir a pour projet depuis 2019 d'étudier l'ensemble des étapes de la formation des inclusions cytoplasmique (IB) jusqu'au bourgeonnement viral.

Mon projet de thèse a pour but d'élucider les mécanismes du transport des RNPs depuis les IBs, où elles sont produites, vers la membrane plasmique, où les virions sont assemblés. En effet, les RNPs sont des objets volumineux qui ne peuvent pas diffuser librement dans le cytoplasme (Novak, Kraikivski, and Slepchenko 2009). Notre hypothèse est donc qu'elles utilisent des structures cellulaires pour assurer leur transport comme cela a été démontré pour de nombreux virus.

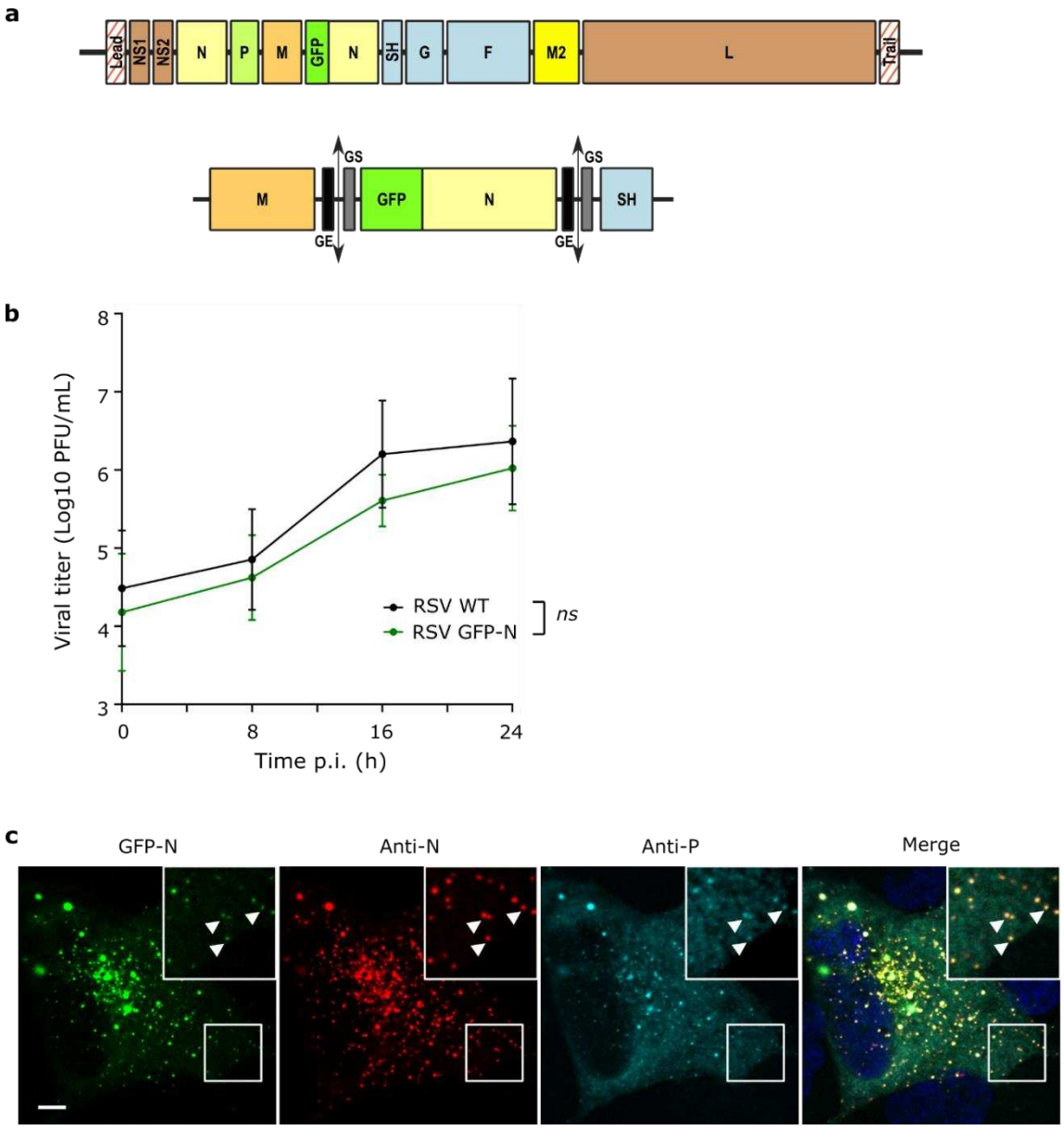
Pour identifier les mécanismes de transport des RNPs, nous analyserons leurs mouvements dans des cellules infectées. Notre stratégie repose sur la production d'un outil nous permettant de visualiser les RNPs dans des cellules vivantes. Le laboratoire a, en effet, produit un RSV recombinant dont la RNP est fluorescente. Ce virus nous permettra pour la première fois de visualiser des RNPs en mouvement en direct. Pour disséquer les mécanismes du transport des RNPs, nous avons mis en place une méthode d'analyse automatisée des mouvements des RNPs. Cette méthode repose sur des outils de microscopie de pointe et des logiciels d'analyse d'image. La caractérisation fine des mouvements de centaines de RNPs nous permettra d'évaluer l'impact de la perturbation des réseaux du cytosquelette, des moteurs moléculaires et des voies cellulaires de transport. De plus cet outil va nous permettre de suivre les mouvements en fonction d'autres protéines cellulaires connues dans le transport de RNPs virales.

Résultats

1. Développement du RSV recombinant pour caractériser le mouvement intracellulaire des RNP.

Pour étudier la dynamique des RNPs dans les cellules vivantes, la protéine N du RSV a été fusionnée à une étiquette fluorescente pour générer des RNPs fluorescentes. Nous avons précédemment démontré qu'une fusion N-ter de la protéine N n'affecte pas les activités de transcription-réplication si elle est co-exprimée avec une protéine N de type sauvage (Rincheval et al. 2017a). Nous avons donc conçu et obtenu un RSV recombinant exprimant à la fois la N de type sauvage et une GFP-N en insérant la séquence codante de la GFP-N flanquée des séquences de signaux de début et de fin de transcription entre les gènes M et SH dans notre vecteur génétique inverse (Figure 25a) (M.-A. Rameix-Welti et al. 2014; Bouillier, Rincheval, et al. 2019). Pour vérifier si la GFP-N interfère avec la croissance virale, nous avons comparé la cinétique d'un cycle de croissance d'un RSV de type sauvage (WT) et du RSV exprimant la GFP-N (ci-après dénommé RSV-GFP-N) (Figure 25b). La croissance du RSV-GFP-N était similaire à celle du RSV de type sauvage et a atteint des titres d'environ 10^6 PFU/mL en 24 h, ce qui montre que l'ajout de la GFP-N n'a pas altéré de manière significative la multiplication virale. Nous avons ensuite étudié la localisation de la protéine GFP-N par rapport à la protéine N de type sauvage et aux structures virales connues telles que les IBs et les filaments viraux. Des cellules HEp-2 ont été infectées par le RSV-GFP-N pendant 24 h et la localisation intracellulaire des protéines N, P et F du RSV a été déterminée par imagerie confocale après immunomarquage de chacune des protéines. Les signaux GFP ont été enregistrés en parallèle. Comme décrit précédemment, les IBs, les points cytoplasmiques et les filaments viraux ont été observés par immunomarquage de N et P, et la coloration de F a révélé les filaments viraux (Fig. 25d). Les signaux GFP sont parfaitement colocalisés avec les colorations N et P dans les IBs, les filaments viraux et les petits puncta dans le cytoplasme. De façon particulièrement intéressante, nous avons noté une colocalisation parfaite des signaux GFP avec les colorations N et P dans les points cytoplasmiques qui pourraient être considérés comme des RNPs (Figure 25c et 25d). De plus, nous avons observé une colocalisation des signaux GFP avec la coloration F dans les filaments viraux (Figure 25d, panneau F). Ces données suggèrent fortement que la GFP-N est incorporée avec le type sauvage N dans les

RNPs. Dans l'ensemble, le RSV-GFP-N a été considéré comme un nouveau marqueur pour évaluer le trafic des RNPs dans le cytoplasme pendant l'infection.



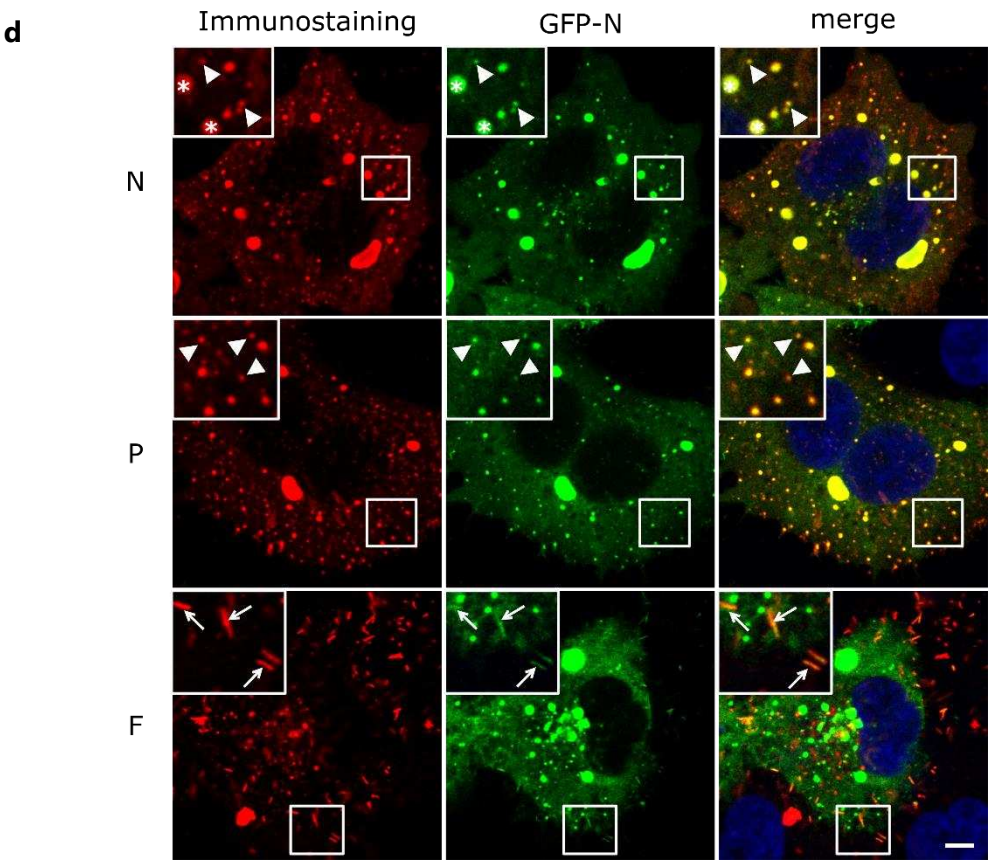


Figure 25. Représentation schématique du clone infectieux RSV-GFP-N (non à l'échelle). Les cadres codant pour les protéines sont représentés par des cases colorées, les régions leader et trailer par des cases hachurées. Les régions intergéniques sont représentées par des lignes horizontales noires. La séquence codante GFP-N a été insérée entre les gènes M et SH avec un signal de fin de gène (GE) et un signal de début de gène (GS) comme décrit dans Méthodes. b) Propriétés de croissance du RSV-GFP-N. Les cellules HEp-2 ont été infectées avec le RSV-GFP-N ou le RSV WT à une MOI de 1 à 37°C et les virus ont été récoltés aux temps indiqués p.i. et titrés par titrage en plage de lyse sur les cellules HEp-2. Les résultats sont la moyenne ± l'écart-type de trois expériences indépendantes. Les titres du RSV-GFP-N et du RSV aux différents points de temps ne sont pas significatifs en utilisant l'ANOVA à deux voies (ns pour RSV versus RSV GFP-N ; ns pour l'interaction) suivie du test de comparaison multiple de Sidak. c) Colocalisation de la GFP-N avec les protéines N et P de type sauvage dans les cellules infectées par RSV-GFP-N. Des cellules HEp-2 ont été infectées par le RSV-GFP-N. A 24 h p.i. les cellules ont été colorées avec des anticorps contre N (rouge) et P (cyan) et Hoechst 33342 (merge). La protéine GFP-N est visualisée par sa fluorescence verte spontanée. Les RNPs sont indiquées par des têtes de flèches blanches. Des images représentatives sont montrées, d) Localisation des protéines GFP-N et des protéines N, P et F de type sauvage dans les cellules infectées par le RSV-GFP-N. Des cellules HEp-2 ont été infectées par le RSV-GFP-N. A 24 h p.i. les cellules ont été colorées avec des anticorps contre N, P ou F (rouge) et Hoechst 33342 (merge). La protéine GFP-N a été visualisée par sa fluorescence verte spontanée. Les IBs sont indiquées par une étoile, les RNPs sont indiquées par des têtes de flèches blanches et les filaments viraux sont indiqués par des flèches blanches. Des images représentatives de deux expériences indépendantes sont présentées. Les piles d'images (3 étapes z) ont été traitées comme des projections maximales et visualisées après un filtre gaussien fixé à 0,5. Barre d'échelle 5 µm.

2. Caractérisation et quantification des mouvements des RNPs du RSV

Pour évaluer la dynamique des RNPs dans les cellules vivantes, nous avons analysé les cellules HEp-2 ou A549 infectées par le RSV-GFP-N pendant 18-20 h par vidéo-microscopie. Des images à haut débit ont été acquises sous un microscope confocal à disque rotatif (film supplémentaire 1). De nombreux petits points GFP positifs sont visibles. La plupart des points présentent des mouvements lents avec des changements de direction rapides et soudains, tandis que certains présentent des trajectoires rapides (tête de flèche blanche, Figure 26a). Les particules se déplaçant très rapidement sont apparues étirées (Figure 26a). Le suivi automatique de particule unique des points positifs pour la GFP a été entrepris à l'aide du logiciel Imaris (film supplémentaire 2) et a donné lieu à des centaines de trajectoires par cellule (266 à 2342, moyenne de 993 sur 23 cellules dans 4 expériences indépendantes). Les trajectoires situées à proximité des IBs ont été supprimées de l'analyse car de légers changements de fluorescence au sein des IB étaient susceptibles d'induire des signaux faussement positifs (Figure 27a). Nous avons également filtré les trajectoires dans lesquelles les vitesses instantanées des particules restaient toujours inférieures à 50% de leur vitesse instantanée maximale tout au long de la trajectoire enregistrée afin de supprimer les liens artéfactuels entre les trajectoires de deux objets se déplaçant lentement (voir Figure 27b et légende).

Nous avons ensuite quantifié plusieurs paramètres caractérisant le mouvement intracellulaire des RNPs. Le déplacement est caractérisé par 1) la longueur de la trajectoire qui correspond à la somme des longueurs de déplacement entre deux points temporels et 2) le déplacement de la trajectoire, qui correspond à la distance minimale entre la première et la dernière position de la particule (Figure 26b). La vitesse de la trace est le rapport entre le déplacement de la trace et la durée de la trace. On s'attend donc à ce que le déplacement et la vitesse de la trajectoire soient élevés pour les particules présentant un mouvement orienté sur une longue distance. La vitesse instantanée lissée est le rapport entre la distance minimale entre la première et la quatrième de 4 positions consécutives et l'intervalle de temps entre ces positions (voir Figure 27f et la légende correspondante). En nous concentrant sur les vitesses instantanées de particules uniques se déplaçant rapidement, nous avons observé que les mouvements rapides se produisent par intermittence (Figure 26c). Ainsi, nous avons également calculé la vitesse maximale de la trajectoire correspondant à la vitesse instantanée lisse maximale de la

trajectoire. La distribution cumulative du déplacement de la trajectoire pour 6 cellules dans une expérience est présentée dans la Figure 26e. Environ 10% des particules suivies présentent un déplacement supérieur à 1,8 µm alors que la plupart d'entre elles présentent un faible déplacement (médiane allant de 0,29 à 0,42 µm). De même, l'analyse cumulative des vitesses maximales des particules montre qu'environ 10% des RNP présentent des vitesses maximales supérieures à 1,7 µm/s (Figure 26d). La valeur médiane de chaque paramètre reflète les caractéristiques générales des mouvements de la particule dans une cellule individuelle et fournit une valeur unique qui peut être utilisée pour comparer davantage les groupes traités. Les médianes des vitesses maximales, des vélocités et des déplacements des trajectoires ne sont pas significativement différentes dans 4 expériences indépendantes sur deux types de cellules différents (HEp-2 ou A549). Ceci indique une généralisation potentielle du comportement de la RNP pendant l'infection par le RSV dans ce modèle et indique que ces paramètres sont appropriés pour des comparaisons de groupes supplémentaires (Figure 26f, 26g, 26h).

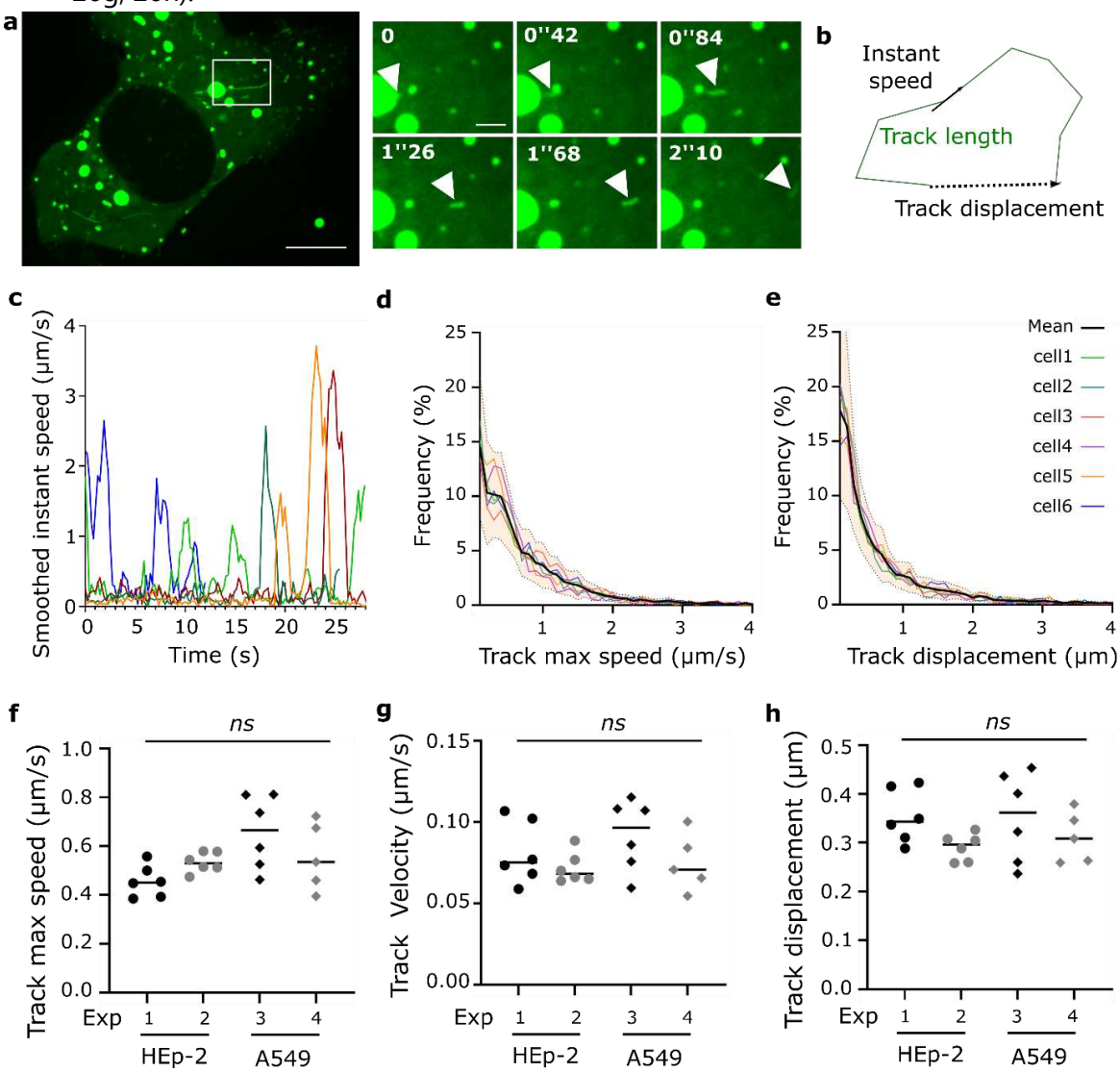


Figure 26. Caractérisation des mouvements intracellulaires des RNP dans les cellules infectées par le RSV-GFP-N. Les images en direct de cellules HEp-2 ou A549 infectées par le RSV-GFP-N pendant 18 à 20h sont analysées à l'aide du logiciel Imaris comme décrit dans la section méthodes. a) Comportement dynamique des RNP du RSV dans les cellules HEp-2. Les piles d'images (3 pas de z) ont été traitées comme des projections maximales et visualisées après filtre gaussien fixé à 0,5, la grande vue est une projection temporelle de 12 images consécutives (0,21 s entre les images). Barre d'échelle 10 µm. La série temporelle zoomée montre une RNP en mouvement rapide pointée par les têtes de flèches blanches, barre d'échelle 2 µm. Des images représentatives de 12 films provenant de 2 expériences indépendantes sont présentées. b) Illustration schématique des paramètres de caractérisation du mouvement (vitesse instantanée, longueur de la trajectoire, déplacement de la trajectoire). c) Vitesses instantanées lissées des particules se déplaçant rapidement tracées en fonction du temps depuis la première détection (chaque couleur représente une particule, exemples représentatifs). d, e) Distribution cumulative de la vitesse maximale de la trajectoire et du déplacement de la trajectoire de 6 cellules HEp-2 individuelles provenant d'une expérience. f, g et h) Chaque point est la médiane de la vitesse maximale de la trajectoire, de la vitesse de la trajectoire et du déplacement de la trajectoire d'une cellule individuelle. ns : Aucune différence statistique entre 4 expériences indépendantes sur des cellules HEp-2 et A549 en utilisant le test ANOVA de Brown-Forsythe et Welch.

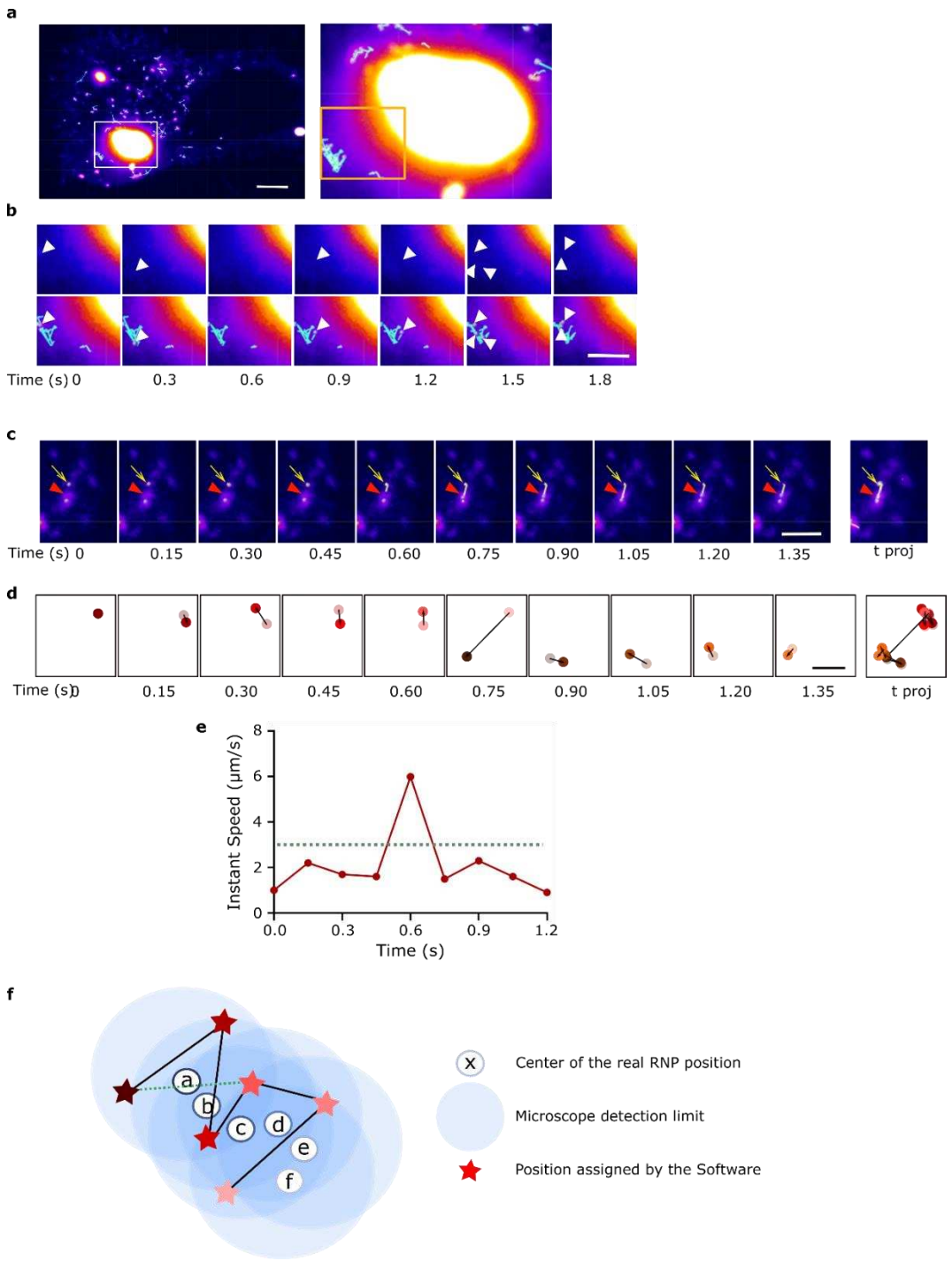


Figure 27. Illustration et schéma des erreurs de suivi. a, b) Illustration du faux suivi près des IB. a) Projection temporelle de 14 images consécutives sur 195 s montrant les détections de points (sphères grises) et le suivi (queues de dragon cyan) par le logiciel Imaris sur des HEp-2 infectées par le RSV-GFP-N comme décrit dans la section méthodes. Des traces artéfactuelles sont visibles près du grand IB. Barre d'échelle 5µm. Un zoom de la région est montré à droite. b) Images consécutives de la zone encadrée en orange (pour plus de clarté, une image sur deux est supprimée). Le panneau supérieur montre les images originales, le panneau inférieur montre les images avec les taches et les traces. Les taches détectées utilisées pour générer les traces sont indiquées par des flèches blanches sur les deux panneaux. Notez qu'aucune tâche n'est visible sur les images originales. Les traces détectées dans la région encadrée sur le panneau a) seront supprimées de l'analyse. Barre d'échelle 2µm c, d, e) Illustration d'un faux suivi dû à un mauvais

lien entre 2 objets se déplaçant lentement. c) Images consécutives montrant les détections de taches (sphères grises) et le suivi (queue de dragon jaune) par le logiciel Imaris sur des HEp-2 infectées par le RSV-GFP-N comme décrit dans la section méthodes. Dans cet exemple, la première particule détectée est pointée par la flèche jaune et est animée d'un mouvement lent non dirigé. Au temps 0,75 s, un nouveau spot est détecté (flèche rouge) et est associé à la trace du premier. Ce deuxième spot présente également un mouvement lent. Les flèches jaunes et rouges indiquent la même position sur chaque image. Barre d'échelle 2µm. Le spot est supposé avoir parcouru approximativement 0,8 µm en 0,15 s résultant en une vitesse instantanée de 5,3 µm/s entre ces positions. Cette trajectoire sera filtrée car toutes les autres vitesses instantanées sont inférieures à 2,6 µm/s (50% de la vitesse instantanée maximale de la trajectoire). d, e) Schéma de la fausse trajectoire résultant d'une mauvaise liaison entre 2 spots se déplaçant lentement. Dans chaque image, la position précédente est indiquée en couleur pâle et le déplacement est indiqué par une flèche noire. Barre d'échelle 0,5 µm. Au temps 0,75 s la position précédente du premier spot est liée à la position d'une autre particule. Les vitesses instantanées résultant de cet exemple schématique sont représentées en e. Cette trajectoire sera filtrée car toutes les vitesses instantanées restent inférieures à 50% de la vitesse instantanée maximale de la trajectoire (ligne verte pointée). f) Représentation schématique des positions réelles consécutives (lettres encerclées) et des positions détectées (étoiles colorées) d'une RNP se déplaçant lentement. En raison des erreurs de position de la microscopie limitée diffractée, la distance calculée entre les positions a et b peut atteindre jusqu'à 200 nm. Comme l'intervalle entre 2 images consécutives est de 0,07 s, la vitesse instantanée calculée peut atteindre 3 µm/s alors que la particule reste quasi-immobile. Pour éviter ce problème, nous avons calculé la vitesse instantanée lisse qui est le rapport entre la distance minimale entre la première et la quatrième des 4 positions consécutives et l'intervalle de temps. Dans cet exemple, la distance entre a et d est d'environ 200 nm et le temps entre les images est de 0,28 s, résultant en une vitesse instantanée lisse d'environ 0,7 µm/s.

3. Les mouvements rapides des RNPs du RSV dépendent du réseau MT

Les mouvements directionnels, rapides et discontinus des RNPs suggèrent un transport dépendant des MT. Nous avons étudié la localisation des RNPs par rapport aux MT dans des cellules HEp-2 et A549 infectées par le RSV de type sauvage (WT) pendant 20 h. N et MT ont été immunomarqués et les cellules ont été analysées sur un microscope confocal à super résolution (Airyscan, Leica). Les images à haute résolution des cellules infectées ont révélé que les MT étaient décorées de multiples RNPs (Figure 28). Pour visualiser les mouvements des RNPs par rapport aux MT, les cellules A549 infectées par le RSV-GFP-N ont été traitées avec du docetaxel -AF 647, une molécule fluorescente qui lie les polymères MT. Cela a permis la coloration des MT sur cellules vivantes et l'acquisition d'images bicolores en time-lapse. Les RNPs fluorescentes se déplaçant rapidement le long des structures microtubulaires étaient clairement visibles, démontrant le transport des RNP le long du réseau MT (Film supplémentaire 3 et Figure 29a). L'acquisition en deux canaux de couleur a empêché toute analyse quantitative des trajectoires des RNPs. Afin de disséquer davantage l'implication du

réseau MT dans les mouvements des RNPs, nous avons analysé les effets de la dépolymérisation des MT sur la taille des particules et des mouvements des RNPs. Après traitement des cellules A549 en début d'infection avec du DMSO (contrôle), du Nocodazole (NZ) permettant de dépolymériser les MT, ou de la Cytochalasine D (CytoD) dépolymérisant les filaments d'actine. Puis l'aire des particules a été mesurée et les proportions de chaque objet ont été réparties en fonction de leur taille (petit < 0,15 ; moyen 0,15-1 ; gros ≥0,15). Nous avons constaté une légère augmentation de la quantité des moyens et gros objets lors d'un traitement NZ (Figure 30a et 30b). Au contraire, un traitement CytoD entrainait une augmentation de la proportion des petits objets au détriment des moyennes et gros objets (Figure 30a et 30b). Pour étudier les mouvements, des cellules vivantes infectées par le RSV-GFP-N ont été imagées avant et après un traitement de 10 minutes avec du NZ à forte concentration (20 µM). Il est important de noter que notre protocole a permis d'imager les mêmes cellules avant et après le traitement médicamenteux. De façon remarquable, le traitement au NZ a aboli presque tous les mouvements rapides et dirigés (Films supplémentaires 4). En revanche, les cellules traitées avec de la cytoD présentaient toujours des RNP en mouvement rapide (Film supplémentaire 5). Enfin, nous avons appliqué notre pipeline de suivi des particules GFP sur des cellules traitées avec du NZ ou des cellules contrôle (DMSO), et nous avons observé une diminution significative du déplacement, de la vitesse et de la vitesse maximale des trajectoire (Fig 29d, 29e, 29f, Films supplémentaires 6 et 7). Une projection centrée des trajectoires d'une cellule pendant 60 s est présentée dans la Figure 29b et 29c pour illustrer la forte réduction du déplacement des trajectoires dans les cellules traitées au NZ. Dans l'ensemble, ces données ont révélé que le mouvement rapide des RNP dépend du réseau de MT. En accord avec le rôle des MT dans le transport des RNP, le traitement au NZ des cellules infectées par le RSV après les étapes d'entrée diminue significativement la production de virions comme indiqué précédemment (Figure 31).

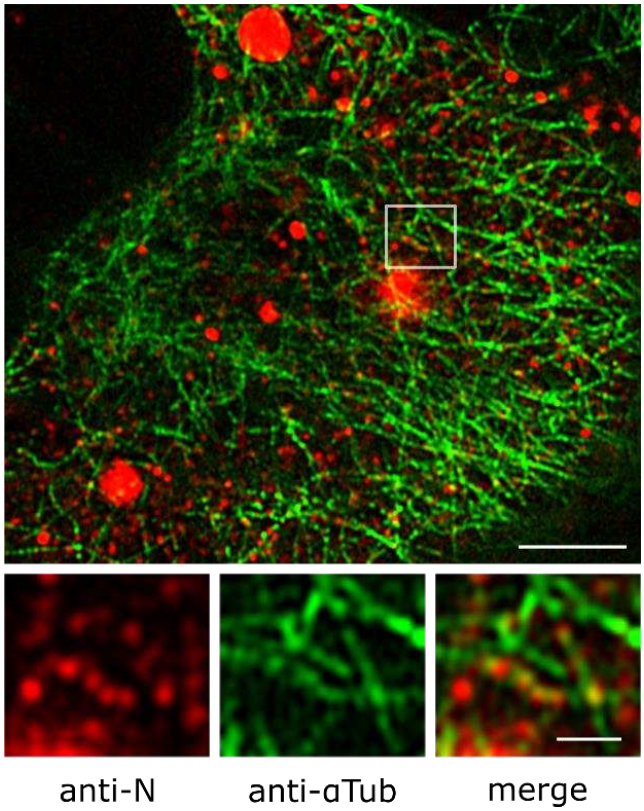


Figure 28. Les RNPs le long du réseau de MT. Des cellules A549 ont été infectées par le RSV pendant 20 h. Les RNPs (en rouge) et l'α-tubuline (en vert) sont révélés par immunomarquage. Les images à haute résolution ont été générées à l'aide d'un microscope confocal avec détecteur Airyscan. Les images ont été visualisées après un filtre gaussien fixé à 0,5. Une image représentative d'une cellule entière sur 5 cellules dans 3 expériences est montrée. Les RNPs décorant le réseau MT sont montrées sur la zone de zoom. Barres d'échelle 5 µm et 1 µm.

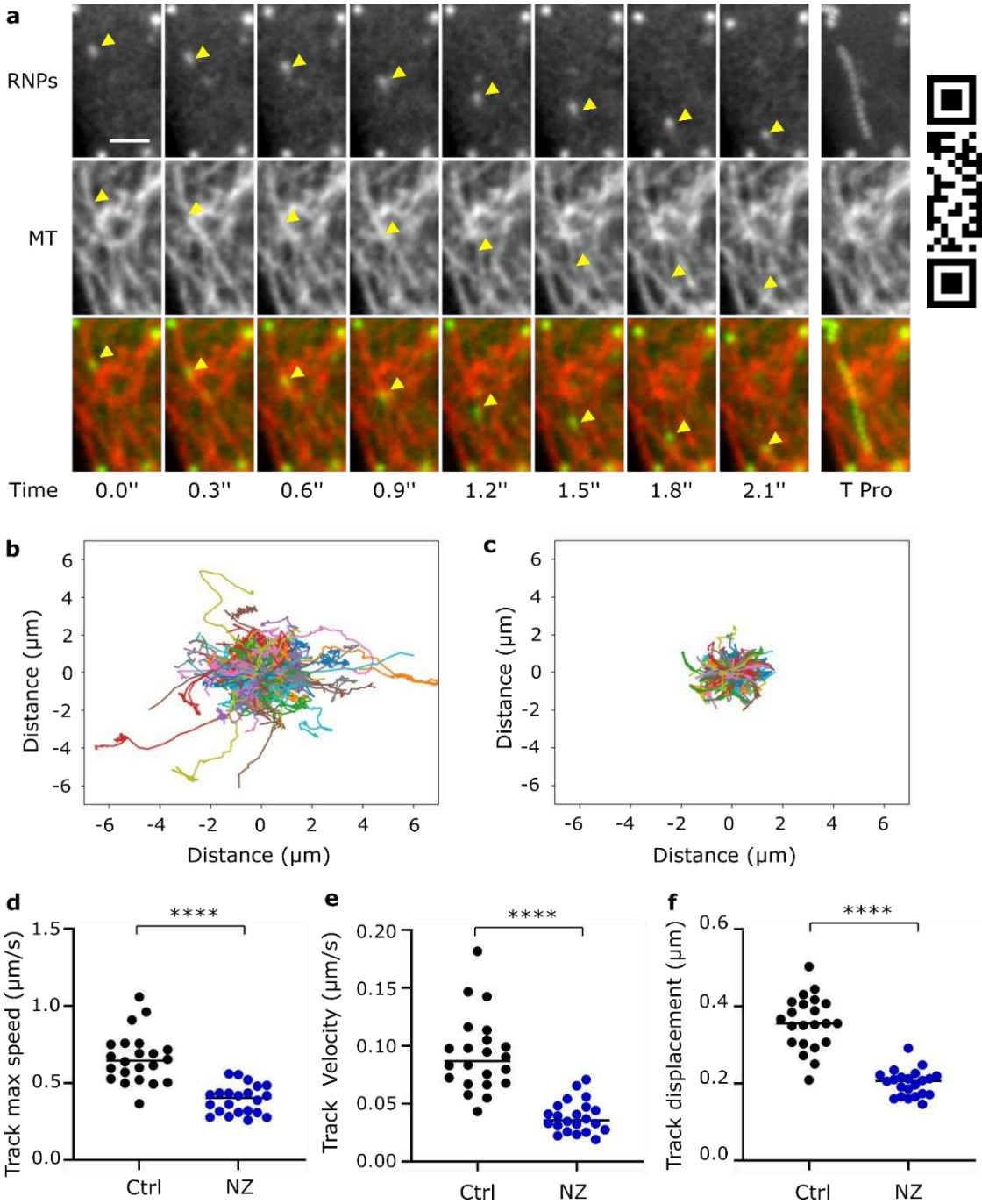


*Figure 29. Les mouvements rapides des RNPs à longue distance dépendent du réseau de microtubules. a) Série temporelle d'images en direct des RNPs (en vert) se déplaçant le long des MT colorés par le docetaxel-647 fluorescent (en rouge) dans des cellules A549 infectées par le RSV-GFP-N. Les piles d'images (2 z-steps) ont été traitées comme des projections maximales et visualisées après un filtre gaussien fixé à 0,5. Les flèches jaunes indiquent la position d'une RNP en mouvement. La dernière image montre une projection temporelle (T Pro). Barre d'échelle 2µm. b à f) Les cellules HEp-2 infectées par RSV-GFP-N ont été traitées à 17 h p.i. avec du nocodazole (10 µM, NZ) ou du DMSO (Ctrl) pendant 1 h avant l'imagerie en direct et l'analyse des traces. b, c). Projection centrée des traces de RNPs dans une cellule traitée par du DMSO (c) ou traitée au nocodazole (d) analysée pendant 60 s. Images représentatives. d, e, f) Chaque point de données représente la médiane de la vitesse maximale, de la vélocité et du déplacement de la trajectoire d'une cellule individuelle. **** p< 0,0001 en utilisant le test t avec la correction de*

Welch. Les données proviennent de 22 cellules (DMSO) et 23 cellules (NZ) de 3 expériences indépendantes.

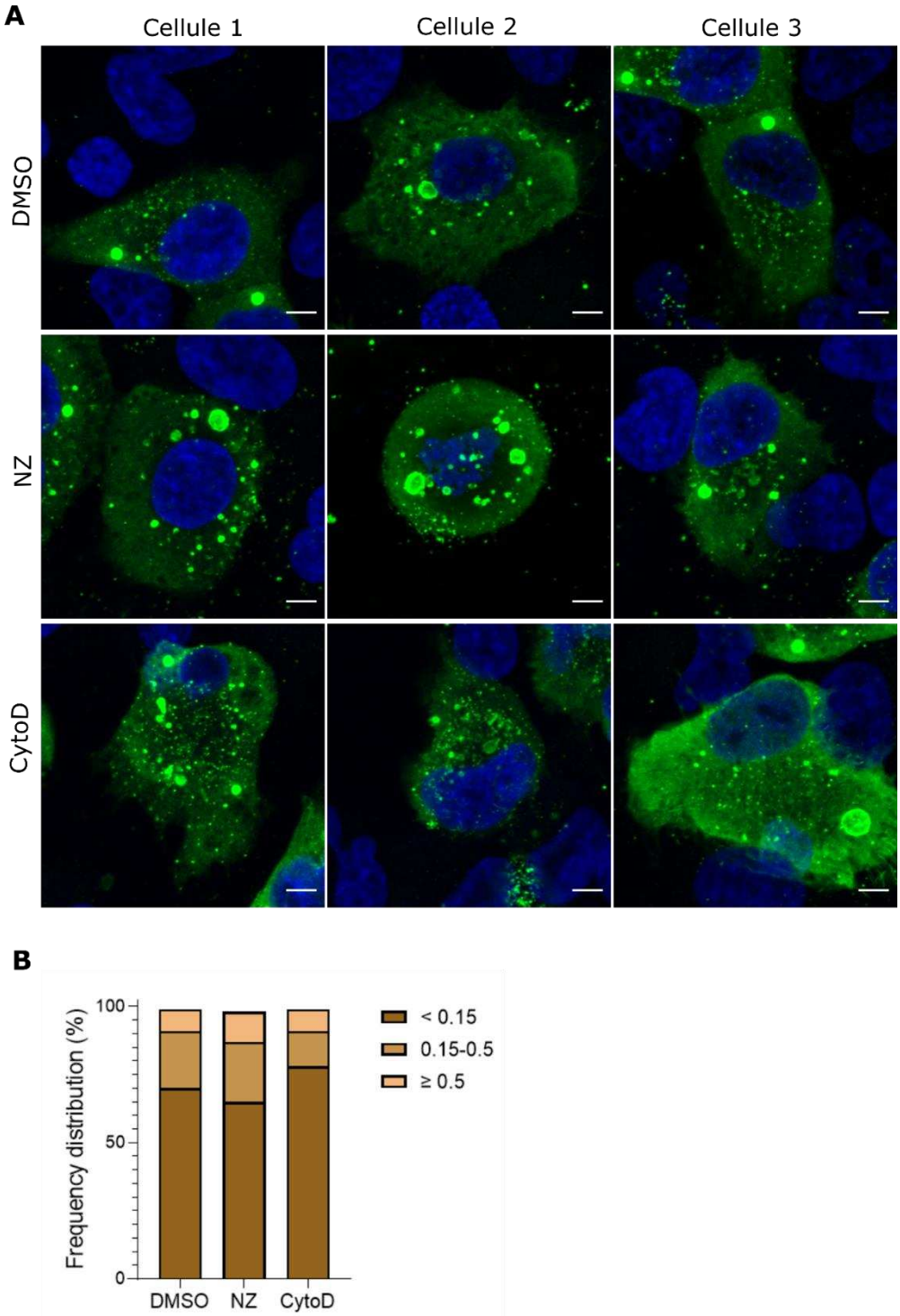


Figure 30. Effet de la dépolymérisation du cytosquelette sur la distribution des RNPs. Cellules A549 infectées par RSV-WT. Cellules traitées aux DMSO (contrôle) et CytoD à 0 h.p.i et NZ à 4 h.p.i. puis fixées à 22h.p.i. A) Immunomarquage des protéines N (vert) et du noyau (bleu). B) L'aire (µm^2) des particules virales sont quantifiées en utilisant le logiciel ImageJ (NIH). La distribution de fréquence de trois catégories de taille dans les zones (en µm2) des objects (petit,

moyen et grand) a été tracée. Le graphique montre les données provenant de 20 cellules d'une expérience. Barre d'échelle 5 µm.

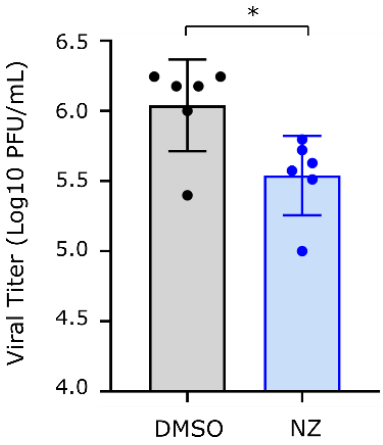
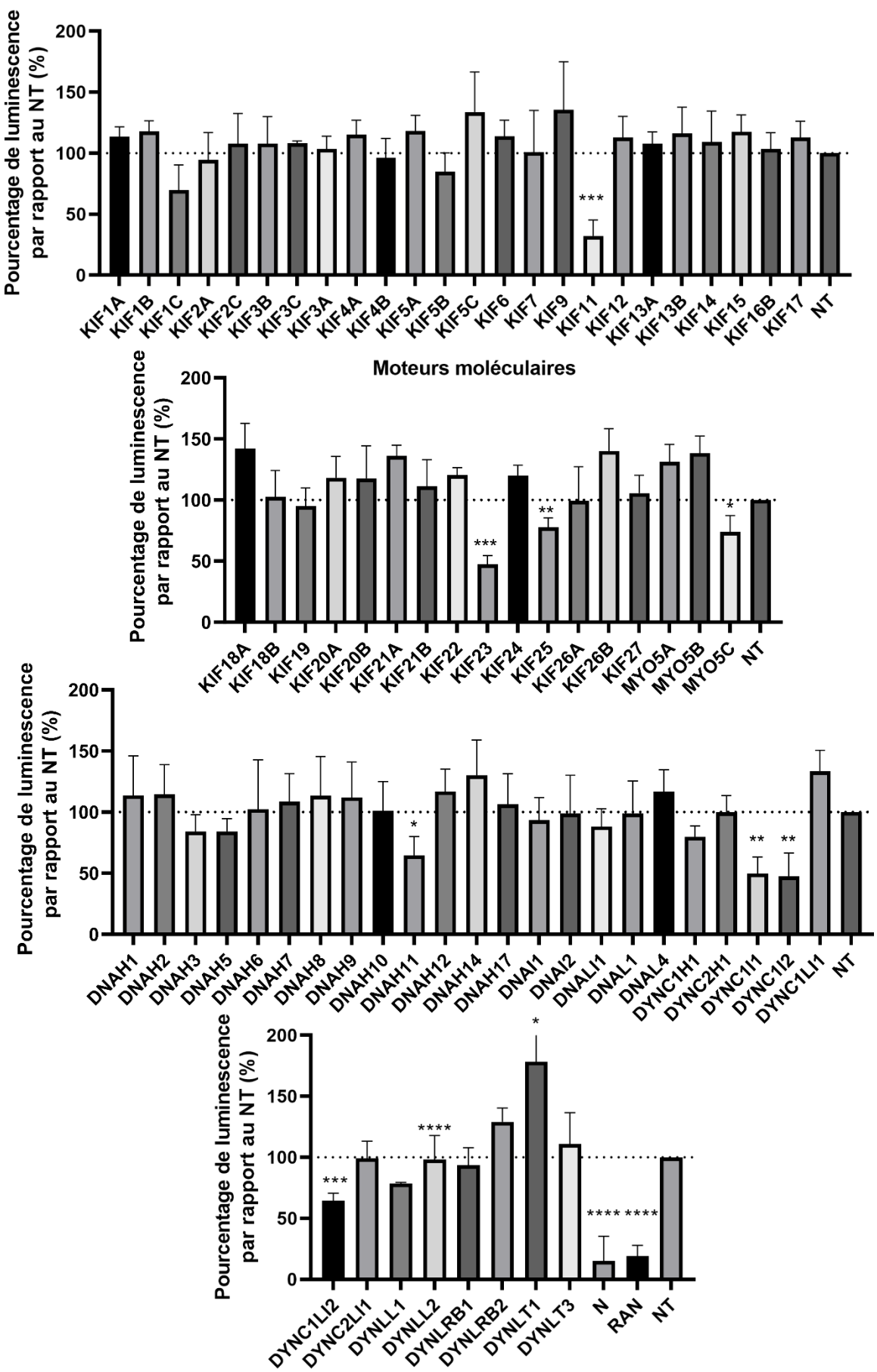


*Figure 31. La dépolymérisation des microtubules entrave la croissance du RSV. Les cellules A549 ont été infectées avec le RSV à une MOI élevée et une faible concentration de Nocodazole 2 µM (NZ) ou de DMSO a été ajouté 2 h après l'infection. A 24 h, le titre viral de chaque échantillon a été déterminé par un titrage en plage de lyse. Les moyennes ± s.d. de 2 expériences en triplicata sont présentées. * p < 0,05 en utilisant le test de comparaison de Kolmogorov-Smirnov.*

4. Identification des moteurs moléculaires responsables du transport des RNPs

Pour identifier les moteurs moléculaires susceptibles d'être responsable des mouvements rapides observés lors des films précédemment acquis, nous avons établi un crible siRNA d'un ensemble de 38 kinésines, de 31 dynéines (dont les deux chaines lourdes) et des trois myosines V. Pour vérifier la transfection des siRNA, nous avons utilisé un pool de 4 siRNA contrôle (non targeting (NT)) ainsi que des siRNA N dirigés contre la protéine N du virus et RAN dirigés contre une protéine cellulaire comme témoin positif. Les cellules A549 sont infectées à 48 h p.t. à une MOI de 0,02 avec un virus exprimant la protéine rapportrice luciférase (RSV-Luc). Ainsi la multiplication virale a été évaluée après 48 h p.i. en se basant sur l'expression du gène rapporteur (M.-A. Rameix-Welti et al. 2014). Pour écarter une diminution de l'expression du rapporteur lié à un défaut lors de l'entrée ou de la transcription-réplication, la même expérience a été réalisée à forte MOI en cycle unique. Dans ces conditions le signal luciférase ne dépend pas des étapes tardives. Nous avons constaté une diminution de la multiplication virale lors de l'inhibition des kinésines KIF11, KIF23 et KIF25 ainsi que pour les dynéines DNA11, DYNC1I1 et DYNC1I2 et la myosine Vc à faible MOI (Figure 32a), mais aussi à forte MOI (Figure 32b). Les étapes précoces du cycle viral étant affectées, il n'est pas possible de conclure sur le rôle de ces moteurs dans l'export des RNPs. A noter, la kinésine KIF13 est un moteur prédominant du transport des RNPs d'Influenza (Ramos-Nascimento et al. 2017) mais ne présente aucun effet dans le cadre de la multiplication du RSV (Figure 32).

a


Pourcentage de luminescence par rapport au NT (%)
200
150
100
50
0
***
KIF1A KIF1B KIF1C KIF2A KIF2C KIF3B KIF3C KIF3A KIF4A KIF4B KIF5A KIF5B KIF5C KIF6 KIF7 KIF9 KIF11 KIF12 KIF13A KIF13B KIF14 KIF15 KIF16B KIF17 NT
Moteurs moléculaires
***
**
*
KIF18A KIF18B KIF19 KIF20A KIF20B KIF21A KIF21B KIF22 KIF23 KIF24 KIF25 KIF26A KIF26B KIF27 MYO5A MYO5B MYO5C NT
*
**
**
DNAH1 DNAH2 DNAH3 DNAH5 DNAH6 DNAH7 DNAH8 DNAH9 DNAH10 DNAH11 DNAH12 DNAH14 DNAH17 DNAI1 DNAI2 DNALI1 DNAL1 DNAL4 DYNC1H1 DYNC2H1 DYNC1I1 DYNC1I2 DYNC1LI1 NT
*
***
****
**** ****
DYNC1LI2 DYNC2LI1 DYNLL1 DYNLL2 DYNLRB1 DYNLRB2 DYNLT1 DYNLT3 N RAN NT

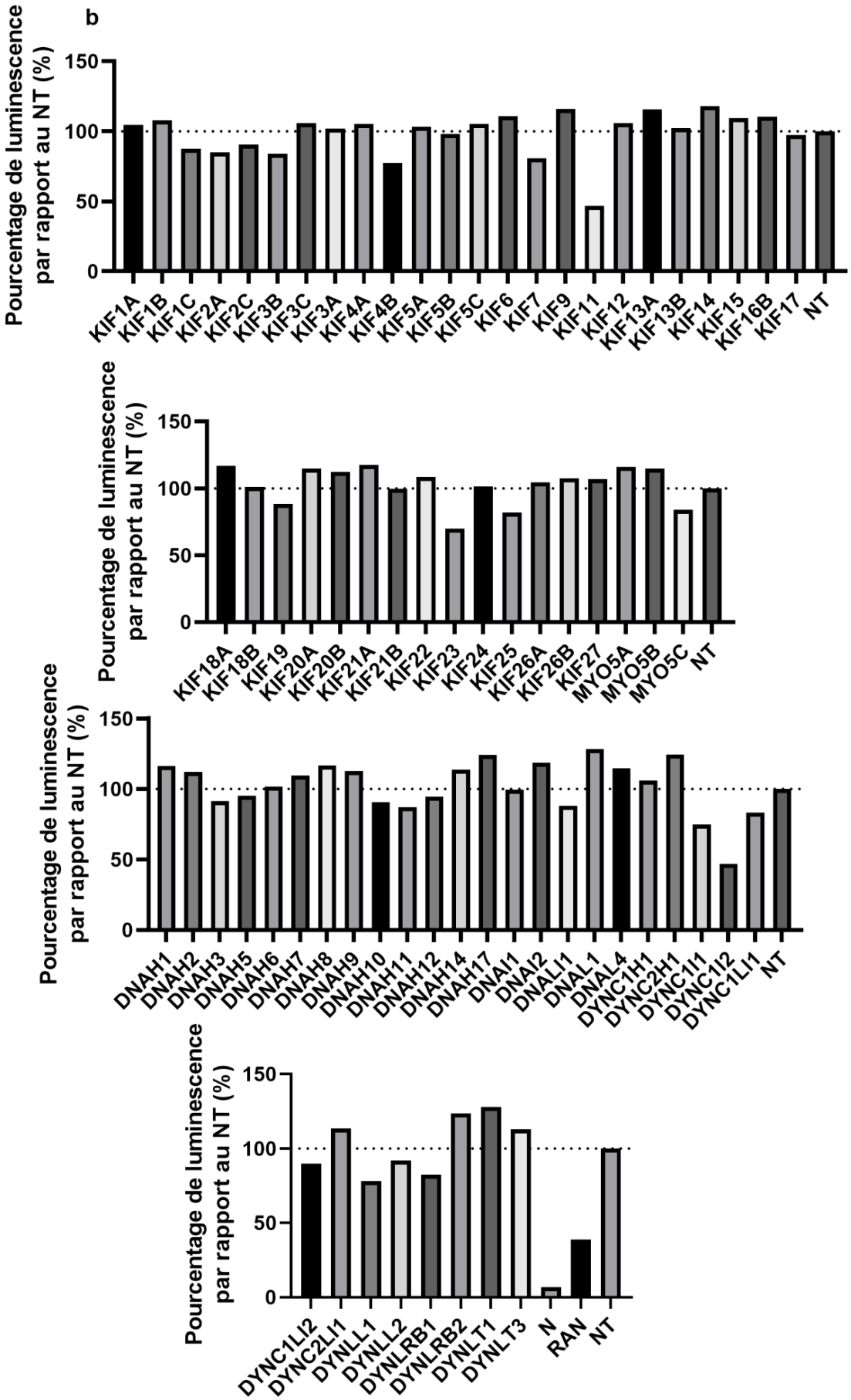
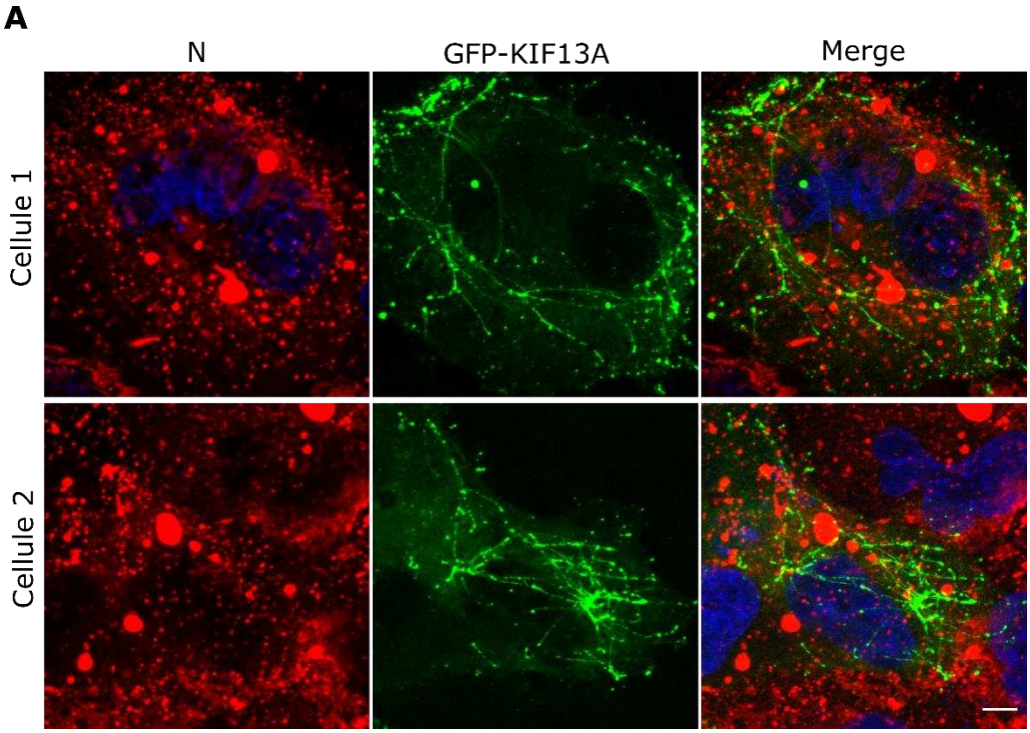

b
Pourcentage de luminescence par rapport au NT (%)
150
100
50
0
KIF1A
KIF1B
KIF1C
KIF2A
KIF2C
KIF3B
KIF3C
KIF3A
KIF4A
KIF4B
KIF5A
KIF5B
KIF5C
KIF6
KIF7
KIF9
KIF11
KIF12
KIF13A
KIF13B
KIF14
KIF15
KIF16B
KIF17
NT
KIF18A
KIF18B
KIF19
KIF20A
KIF20B
KIF21A
KIF21B
KIF22
KIF23
KIF24
KIF25
KIF26A
KIF26B
KIF27
MYO5A
MYO5B
MYO5C
DNAH1
DNAH2
DNAH3
DNAH5
DNAH6
DNAH7
DNAH8
DNAH9
DNAH10
DNAH11
DNAH12
DNAH14
DNAH17
DNAI1
DNAI2
DNALI1
DNAL1
DNAL4
DYNC1H1
DYNC2H1
DYNC1I1
DYNC1I2
DYNC1LI1
DYNC1LI2
DYNC2LI1
DYNLL1
DYNLL2
DYNLRB1
DYNLRB2
DYNLT1
DYNLT3
N
RAN

Figure 32. Crible d'interférence ARN des partenaires moteurs potentiel des RNPs sur la multiplication du RSV. Des cellules A549 traitées par siRNA dirigés contre différents partenaires potentiels des RNPs ont été infectées après 48 h par du RSV-Luciférase à faible MOI 0,02 a) et forte MOI 1 (b). La mesure de la luminescence a été mesurée et normalisée avec le signal obtenu pour le siRNA contrôle (NT non targeting. Les t-test realisés grâce au logiciel GraphPad Prism (p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001 ; *** p<0,0001). Les données représentées correspondent à 3 expériences indépendantes réalisées en duplicat pour le faible MOI et une fois pour la forte MOI.*

En parallèle, des cellules A549 ont été transfectées de façon transitoire avec un vecteur d'expression mGFP-KIF13a et infectées avec le RSV-WT avant d'être immunomarquées pour visualiser la protéine N sauvage. Nous avons observé la présence de filaments KIF13a comme cela avait déjà été rapporté dans des études précédentes (Delevoye et al. 2014; Ramos-Nascimento et al. 2017). Le positionnement des RNPs du RSV semblait aléatoire et ne nous a pas permis d'observer une colocalisation entre les RNPs et les filaments KIF13a (Figure 33a). De plus, la proportion de RNPs proches de la membrane ne semblait pas augmentée, mais aucune quantification n'a été menée sur ces expériences (Figure 33a). De la même manière, la transfection d'un plasmide d'expression de la protéine KIF13a dépourvue de moteur moléculaire (GFP-KIF13a-ST) ne présentait pas un phénotype de distribution différent par rapport aux cellules transfectées par GFP-KIF13a ni de colocalisation (Fig 33b).



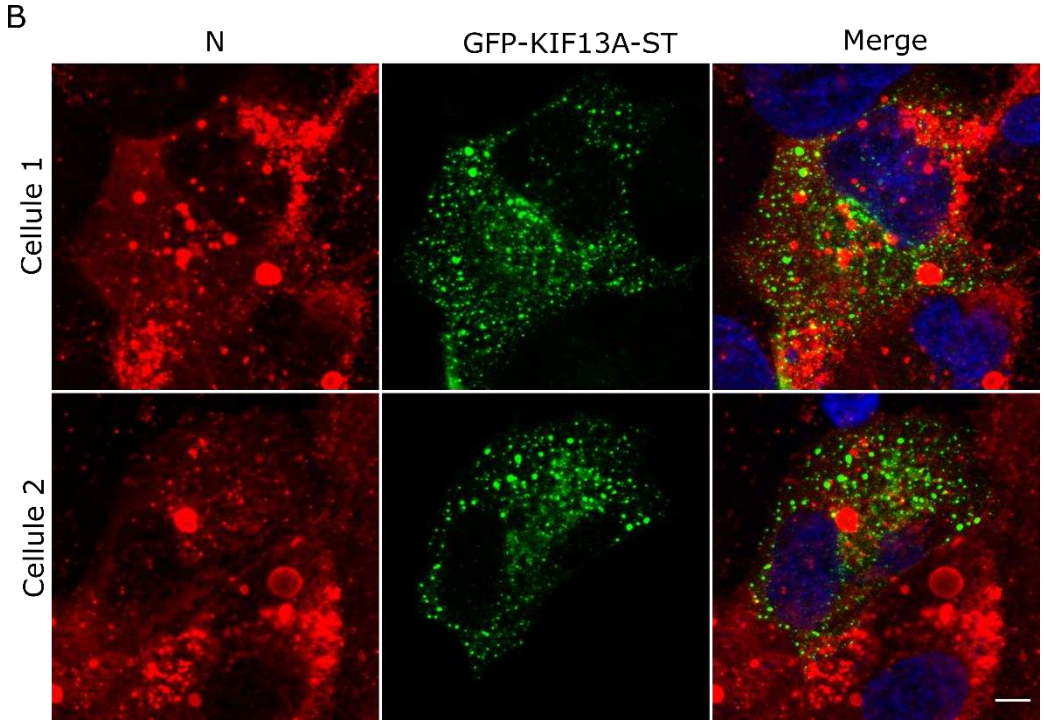


Figure 33. Absence de colocalisation des RNPs avec KIF13a. Cellules A549 transfectées transitoirement par GFP-KIF13a ou GFP-KIF13a-ST (dépourvue du domaine moteur) et infectées par RSV-WT. Fixation des cellules à 24 h .p.i. et immunomarquage de la protéine N (rouge) et du noyau (bleu). Acquisition au microscope confocal SP8 Leica. Projection maximale des Z par le logiciel ImageJ. Barre d'échelle 5 µm

5. Rab11 et les RNPs colocalisent dans les cellules infectées.

Les vésicules des endosomes de recyclage, marquées par la petite Rab11-GTPase, sont connues pour être impliquées dans le trafic des RNPs de plusieurs virus ARN à brin négatif (Vale-Costa and Amorim 2016). Pour étudier l'implication des endosomes de recyclage dans le trafic des RNP du RSV, nous avons analysé les localisations intracellulaires de Rab11a et des RNPs du RSV. Nous avons infecté des cellules A549 exprimant de manière constitutive HA-Rab11a (A549-HA-Rab11a) avec le RSV WT (de Castro Martin et al. 2017). Aux points de temps indiqués, les cellules ont été fixées et les protéines N et HA-Rab11a ont été détectés par immunomarquage. Les colorations N et HA ont révélé de nombreux points cytoplasmiques individuels, correspondant respectivement aux RNPs et aux endosomes Rab11a positifs, qui présentaient une colocalisation partielle (Figure 34a). Pour quantifier la colocalisation entre les points positifs Rab11a et N, nous avons extrait les détections de spots et effectué une analyse de colocalisation basée sur les objets à l'aide du logiciel Icy. Cette méthode segmente d'abord les spots et analyse ensuite leur distribution relative avec des statistiques de second ordre

permettant une quantification robuste des objets colocalisés. Cette analyse a révélé qu'environ 30% des spots N colocalisent avec des vésicules positives pour Rab11a entre 12 et 18 h p.i., avec une légère diminution à 24 h p.i.. En revanche, moins de 10% des spots N sont colocalisés avec EEA1, un marqueur d'endosomes précoces utilisé comme contrôle négatif (Figure 34b). Des résultats similaires ont été obtenus dans les cellules A549 et HEp-2 (Figure 35). Ces données suggèrent une implication de Rab11a dans le trafic des RNPs.

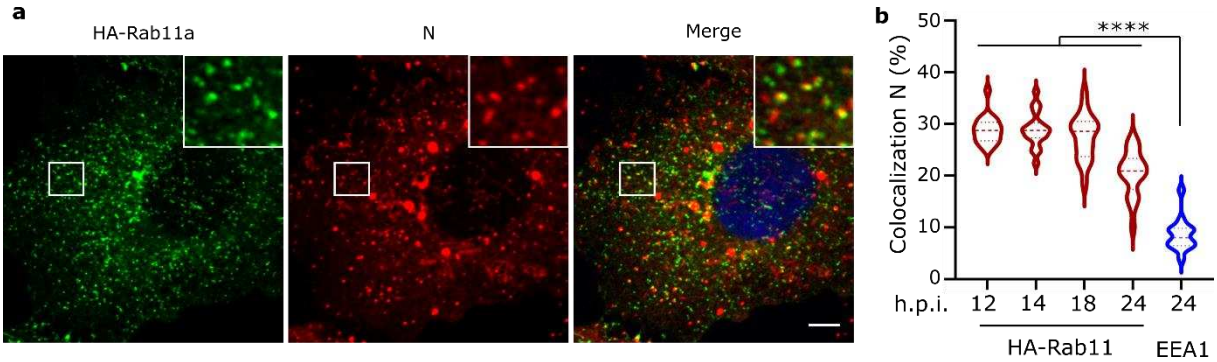


*Figure 34. Colocalisation des RNPs et de Rab11a dans les cellules infectées par le RSV. a) Cellules A549-HA-Rab11a infectées par le RSV pendant 18 h. Rab11a (vert) et RNPs (rouge) ont été détectés par immunomarquage de HA et N. Les images ont été visualisées après filtre gaussien fixé à 0,5. Barre d'échelle de 5 µm. Les zones encadrées englobent les spots Rab11a et N montrés agrandis. b) Pourcentage de spots N colocalisant avec des spots positifs HA-Rab11a ou EEA1 calculé à l'aide du logiciel Icy. Les diagrammes en violon montrent la médiane (ligne centrale) et les premier et troisième quartiles (charnières supérieure et inférieure). Les résultats proviennent de 70 cellules issues de 3 expériences indépendantes. **** p < 0,0001 en utilisant le test ANOVA de Brown-Forsythe et Welch suivi du test de Dunn pour les comparaisons multiples.*

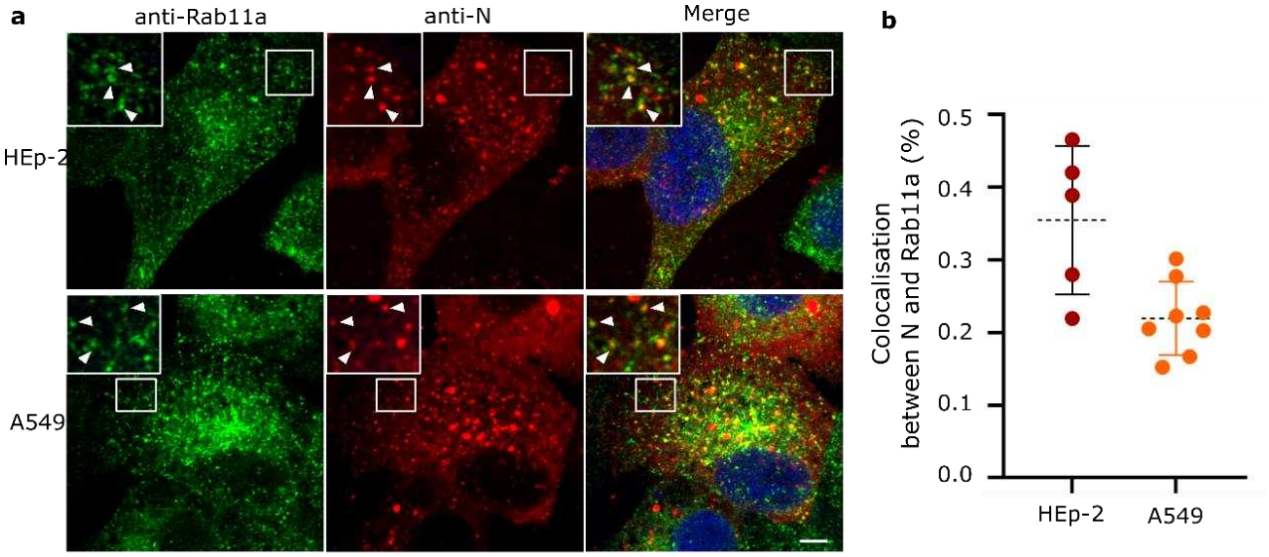


Figure 35. Colocalisation des RNPs et de Rab11a dans les cellules infectées par le RSV. a) Cellules HEp-2 et A549 infectées par le RSV pendant 24 h. Rab11a (vert) et RNP (rouge) ont été détectés par immunomarquage. Des images représentatives d'une expérience sont présentées. Les piles d'images (3 pas z) ont été traitées en tant que projections maximales et visualisées après filtre gaussien fixé à 0,5. Barre d'échelle de 5 µm. Les zones encadrées comprennent les spots Rab11 et N pointés par des flèches blanches (zoom). b) Pourcentage de spots N colocalisant avec des spots positifs Rab11a calculé à l'aide du logiciel Icy. Les résultats des cellules individuelles d'une expérience sont représentés par la moyenne et l'écart-type.

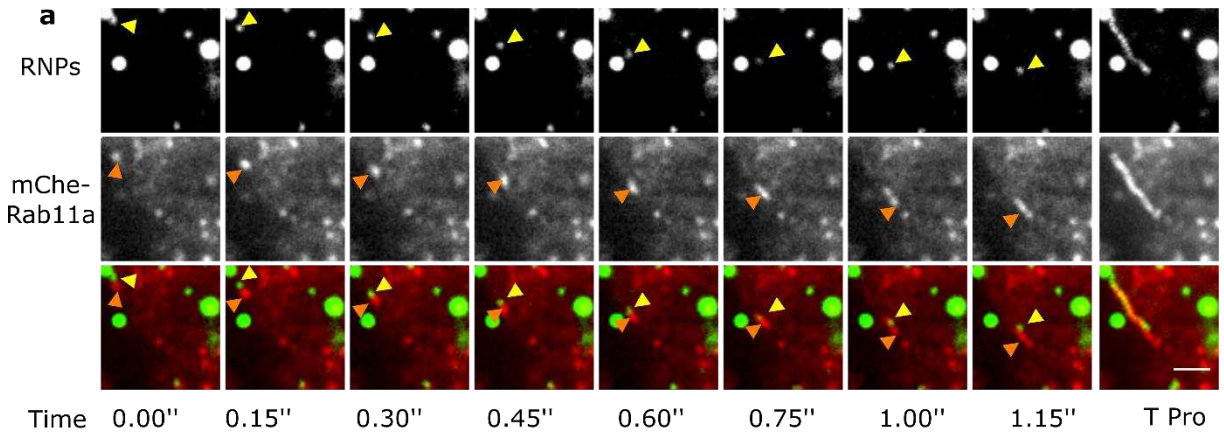
6. La voie Rab11 est impliquée dans les mouvements rapides et dirigés des RNPs

Pour déterminer si Rab11a pourrait être impliqué dans le trafic des RNP, nous avons mis en place une expérience pour visualiser les mouvements des RNP et de Rab11 dans des cellules infectées vivantes. Des cellules A549 et HEp-2 ont été infectées par le RSV-GFP-N et transfectées de façon transitoire avec un vecteur d'expression mCherry-Rab11a. A 18-20 h p.i., nous avons réalisé une imagerie time-lapse en double couleur pour évaluer la dynamique de Rab11a et des RNPs. Il est intéressant de noter que nous avons observé des RNPs se déplaçant rapidement en même temps que des vésicules Rab11a positives, ce qui démontre qu'au moins une partie des RNP se déplaçant rapidement sont associées à des structures Rab11a positives (Figure 36a et Film supplémentaire 8). De manière frappante, les RNPs sont apparus comme tirés par les spots positifs Rab11. Les RNPs associés aux vésicules positives Rab11 n'étaient plus mobiles lorsque les cellules étaient traitées au NZ, ce qui suggère que ces mouvements étaient dépendants des MT (Film supplémentaire 9). Les paramètres d'acquisition à double couleur empêchent malheureusement le suivi automatique des RNPs et de Rab11a dans cette expérience.

Pour démontrer davantage le rôle essentiel de Rab11 dans l'exportation des RNPs, nous avons réalisé des expériences de déplétion des protéines par siRNA. Des cellules A549 ont été transfectées de façon transitoire avec un petit ARN interférent (siRNA) ciblant Rab11a ou de siRNA contrôle (NT) pendant 48h et ensuite infectées avec RSV-GFP-N pendant 18-20 h avant l'imagerie en direct. Une analyse Western blot des lysats de cellules entières à l'aide d'un anticorps contre Rab11a a montré une diminution considérable des niveaux de Rab11a dans les cellules traitées par siRNA ciblant Rab11a par rapport au contrôle (Figure 36h). Les mouvements des RNPs ont été quantifiés comme décrit ci-dessus. La vitesse médiane, la vitesse maximale et le déplacement de la trajectoire étaient significativement réduits dans les cellules siRNA Rab11a par rapport au contrôle (Figure 36, Films supplémentaires 10 et 11). La

projection centrée des trajectoires d'une cellule illustre la réduction du déplacement des trajectoires. Ces résultats suggèrent que Rab11a est impliqué dans le trafic des RNPs.

Puisque nos données indiquent que le RSV détourne la voie Rab11a pour l'exportation des RNPs, nous avons examiné si l'infection par le RSV avait un impact sur la fonction des endosomes de recyclage (ER). À cette fin, nous avons exploré le recyclage de la transferrine, qui dépend du fonctionnement des ER. Des cellules A549 infectées par le RSV ou non infectées ont été incubées en présence de transferrine fluorescente et ont ensuite été placées dans un milieu frais. La fluorescence cytoplasmique (correspondant à la transferrine non recyclée) a été quantifiée après 0 et 20 min d'incubation dans le milieu frais (Figure 37). Il est intéressant de noter que les cellules infectées présentent une augmentation du recyclage de la transferrine par rapport aux cellules non infectées, ce qui suggère une accélération du trafic des ER. Dans l'ensemble, ces données suggèrent que le RSV utilise non seulement la voie du recyclage des endosomes mais manipule également son fonctionnement.



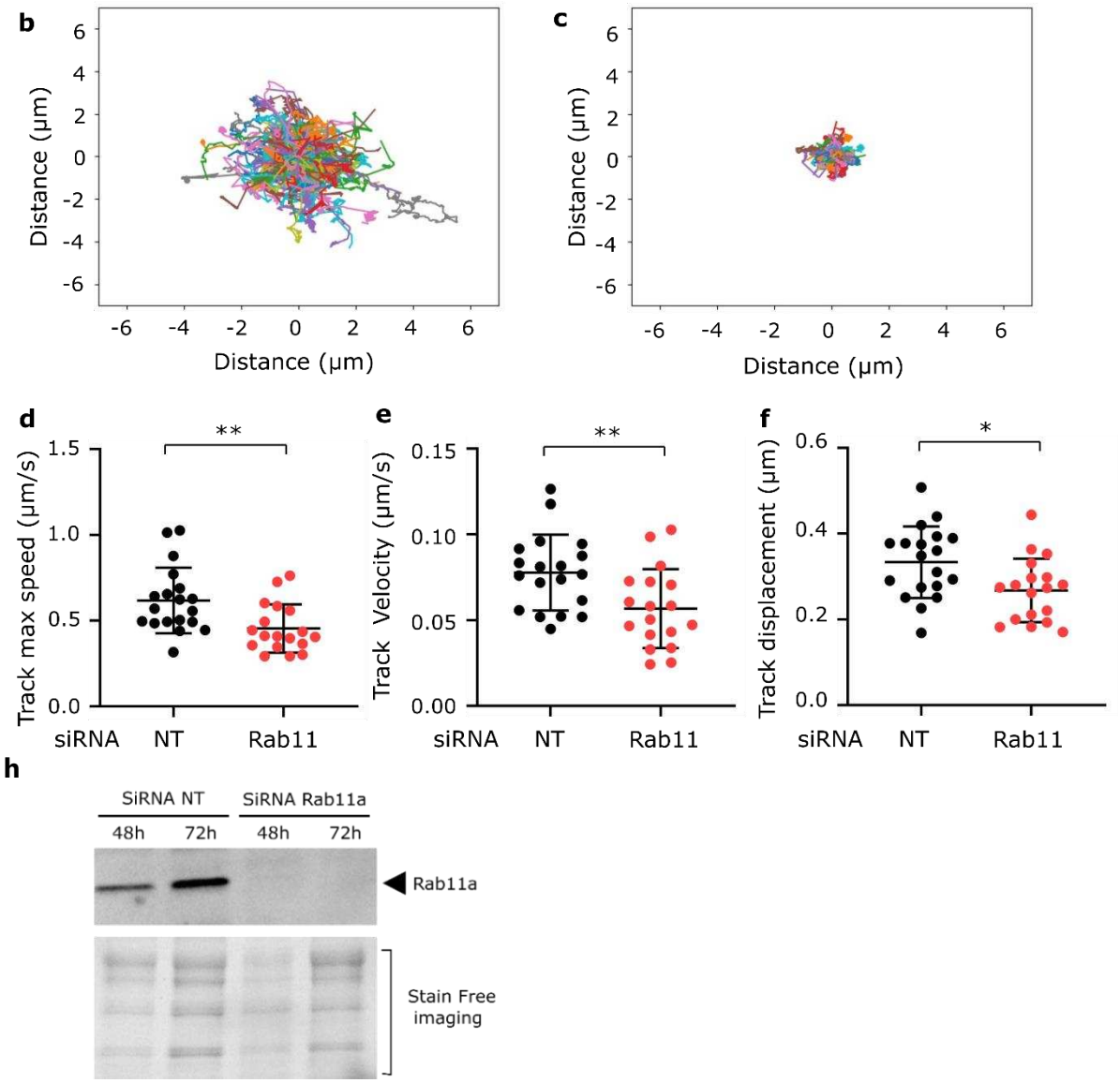


*Figure 36. Rab11 est impliquée dans les mouvements rapides et dirigés des RNPs. a) Série temporelle d'images en direct de cellules A549 exprimant transitoirement mCherry-Rab11a (en rouge) et infectées pendant 18 h par RSV-GFP-N (en vert). Les images ont été visualisées après un filtre gaussien fixé à 0,5. Les positions d'une RNP se déplaçant avec un objet positif mCherry-Rab11a sont indiquées par des têtes de flèches jaunes (RNP) et orange (Rab11a). La dernière image montre une projection temporelle (T Pro). Barre d'échelle 2 µm. b à f) Les cellules A549 ont été transfectées transitoirement avec des siRNA ciblant Rab11a ou non (NT) pendant 48 h puis infectées avec RSV-GFP-N pendant 18 h avant l'imagerie en direct et l'analyse des traces. b, c) Projection centrée des traces de RNP dans des cellules NT (c) ou Rab11a (d) KO analysées pendant 60s. Images représentatives. d, e et f) Chaque point de données représente la médiane de la vitesse maximale, de la vélocité et du déplacement de la trajectoire d'une cellule individuelle. ** p<0,01, p<0,05 en utilisant le test t avec la correction de Welch. Les données proviennent de 19 cellules (NT) et 18 cellules (Rab11a) de 3 expériences indépendantes. Flashcode pour visualiser les vidéos. h) Extinction de l'expression de Rab11a dans les cellules transfectées par un SiRNA. Les cellules A549 ont été traitées par le siRNA Rab11a ou le siRNA non ciblé (contrôle) pendant 48h et 72h. Les lysats cellulaires ont été soumis à une SDS-PAGE et*

sondés par des anticorps dirigés contre Rab11a. La visualisation de toutes les protéines a été réalisée par révélation Stain Free.

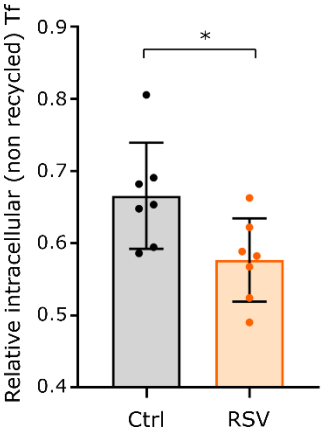


*Figure 37. L'infection par le RSV augmente le recyclage du Tf. Les cellules HEp-2 infectées par le RSV-GFP ou non infectées pendant 24 heures ont été incubées avec de l'Alexa 647 Tf pendant 10 minutes puis lavées et incubées dans un milieu frais pendant 10 min. Les cellules ont été fixées à 0 et 20 minutes et observées en microscopie confocale. La quantité totale d'Alexa 647 Tf par cellule a été quantifiée. La moyenne ± s.d. de la quantité relative d'Alexa 647 Tf après 20 min de poursuite est indiquée. * p < 0,05 en utilisant le test t avec la correction de Welch. Les données proviennent de 7 cellules d'une expérience représentative sur 2.*

7. Validation biochimique de l'association RNP-Rab11a

Nous avons ensuite évalué l'association entre les RNPs et Rab11a en effectuant une analyse de co-immunoprécipitation (IP). Des cellules A549 exprimant de manière stable HA-Rab11a ont été infectées pendant 16h avec RSV-GFP-N ou RSV exprimant GFP (RSV-GFP) comme contrôle. Les lysats cellulaires ont été incubés avec des billes recouvertes d'anticorps anti-GFP et une IP a été réalisée. Les échantillons de pré-purification et d'IP ont été analysés par Western blot pour révéler N, P et HA-Rab11 (Figure 38). Les protéines N et P de type sauvage ont été purifiées efficacement avec la protéine GFP-N, ce qui suggère que la RNP entière est co-immunoprécipitée avec la GFP-N. La protéine HA-Rab11a a également été co-immunoprécipitée à plusieurs reprises avec la GFP-N alors qu'aucune bande correspondante n'était visible dans le contrôle. Conformément aux expériences de colocalisation et de trafic, seule une petite fraction de Rab11a a été co-immunoprécipitée avec les RNPs. L'IP miroir a été réalisée sur des cellules A549-HA-Rab11 infectées par le RSV WT pendant 16 h en utilisant des anticorps anti-HA (Figure 38b). La protéine N a été trouvée dans la fraction IP des cellules exprimant Rab11HA mais pas dans les cellules A549 de type sauvage utilisées comme contrôle. Il est intéressant de noter que la protéine P a également été co-immunoprécipitée avec HA-Rab11a, ce qui suggère que Rab11 interagit avec la RNP. Pour approfondir ce point, nous avons réalisé des expériences IP similaires sur des cellules infectées par un RSV recombinant exprimant une protéine L fusionnée à la GFP (RSV-L-GFP). La GFP est insérée dans la région charnière 2 de L. L'analyse Western blot de la fraction IP n'a pas révélé la GFP-L, probablement en raison d'un manque de sensibilité et d'un mauvais transfert d'une grande protéine comme la L. Cependant, N et P ont été co-immunoprécipités, validant ainsi

l'IP et confirmant la capture de la RNP avec la GFP-L (Figure 38a). Enfin, nous avons détecté HA-Rab11a de manière répétée et spécifique dans l'échantillon IP, ce qui est cohérent avec une interaction entre Rab11a et la RNP.

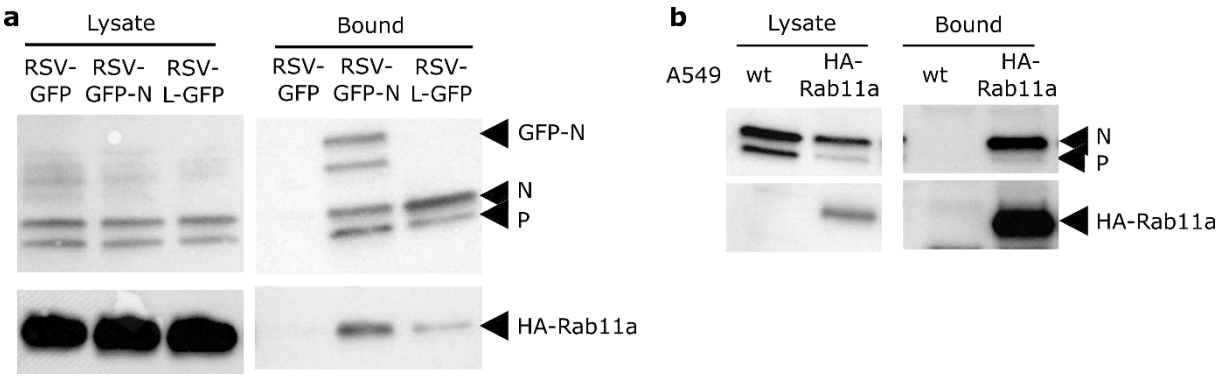


Figure 38. Co-immunoprécipitation de Rab11a et des RNPs du RSV dans les cellules infectées. a) Les cellules A549 exprimant de manière stable HA-Rab11a ont été infectées par RSV-GFP, RSV-GFP-N ou RSV-L-GFP comme indiqué pendant 16h, lysées et incubées avec des billes contre la GFP. Les lysats cellulaires et les fractions liées ont été analysés par Western-blot en utilisant des anticorps polyclonaux de lapin anti-N, anti-P et anti-HA. Une expérience représentative sur 3 (RSV-GFP-N) ou 2 (RSV-L-GFP) est présentée. (b) Les cellules A549 WT ou exprimant de manière stable HA-Rab11a comme indiqué ont été infectées par le RSV pendant 16h, lysées et incubées avec des billes recouvertes d'anticorps dirigés contre HA. Une analyse Western blot des protéines co-immunoprécipitées est présentée. Une expérience représentative sur 2.

L'interaction entre la RNP et Rab11a peut être médiée par un complexe protéique ou par une des protéines virales composant la RNP. Pour cela, nous avons transfecté transitoirement les cellules A549-HA-Rab11a ou A549 avec des plasmides codants pour les protéines qui composent la RNP ou avec la protéine de matrice. Les cellules ont été lysées 24hpt et les protéines ont été coimmunoprécipités avec des billes recouvertes d'anticorps dirigés contre le tague HA. Les échantillons ont été relevés par Western Blot avec des anticorps dirigées contre chacune des protéines (N, P, M2-1 ou M) et contre le tague HA (Figure 39). La coimmunoprécipitation de HA ne montre aucune interaction avec les protéines P, M2-1 et M à l'exception de N. Pour autant, les cellules A549 ne présentant pas de Rab11 tagué HA présentent une bande similaire à celle observée avec les A549-HA-Rab11. Ces résultats montrent que la protéine N interagit de manière non spécifique sur les billes et ne permet pas de conclure sur une éventuelle interaction entre les deux. De plus, aucune des protéines N P M et M2-1 testées ne semble interagir avec HA-Rab11.

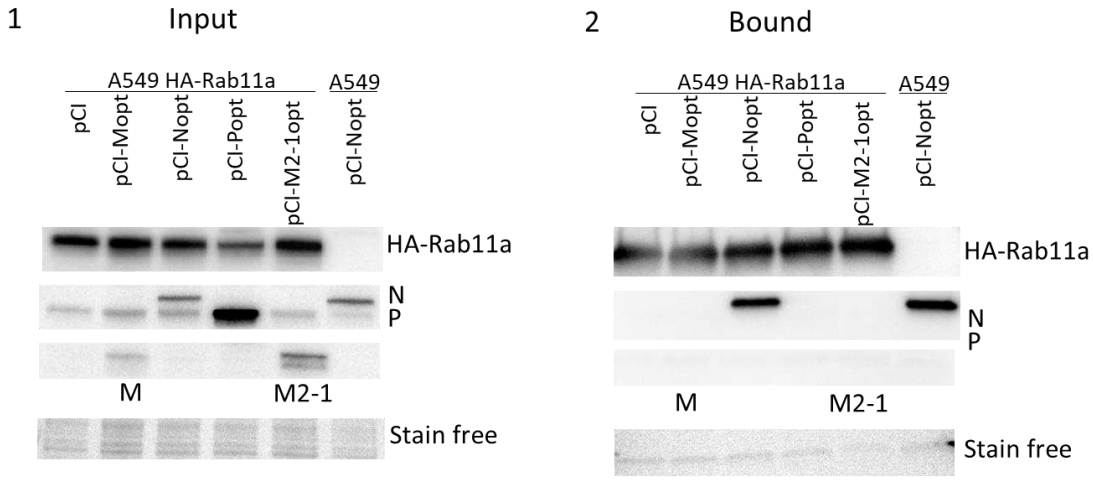


Figure 39. Absence d'interaction entre les protéines N, P, M et M2-1 et Rab11a. Les cellules A549-HA-Rab11a ont été transfectées transitoirement avec les protéines virales N, P, M ou M2-1, lysées à 24hpt puis coimmunoprécipité avec des billes anti-HA et révélé sur Western Blot avec des anticorps dirigés contre les protéines susmentionnées.

Pour explorer l'implication de la polymérase L du RSV ou d'un complexe protéine dans l'interaction avec Rab11, nous avons transfectée un ensemble de plasmide codant pour les différentes protéines virale de la RNP dans des cellules A549-HA-Rab11a.

Des coimmunoprécipitations de cellules A549-HA-Rab11 exprimant un complexe protéique de la RNPs n'ont pas permis de révéler d'interaction (données non montrées). La transfection de plusieurs plasmides étant difficile, ces résultats ne sont pas interprétables. De plus, aucun contrôle positif d'immunoprécipitation n'avait été inclus dans ces expériences.

Pour vérifier l'apparition d'événements rares d'interaction au cours de la transfection, non distinguables en CoIP, nous avons transfecté dans les cellules A549-HA-Rab11a les protéines minimales nécessaire à la formation de pseudo corps d'inclusion (Galloux et al. 2020), soit N et P, puis nous avons ajouté les autres protéines de la RNP et observé la colocalisation avec HA-Rab11. Comme prévu, les cellules infectées par le RSV présentaient une colocalisation partielle des RNPs avec Rab11a (Figure 40a). De rares cellules transfectées par les protéines N, P et présentant des pseudo IB, montraient une colocalisation partielle des pseudos RNPs avec Rab11a tandis que de nombreuses cellules transfectées avec N, P, L ou N, P, L, M2-1 présentaient une colocalisation importante entre les pseudos RNPs et les protéines Rab11 (Figure 40b). L'ensemble de ces résultats montre que les protéines N et P ne sont pas suffisantes pour permettre une colocalisation avec Rab11 mais que la présence de L entraine une forte colocalisation des pseudos RNPs avec Rab11. La protéine M2-1 ne semble pas avoir d'influence sur la colocalisation.

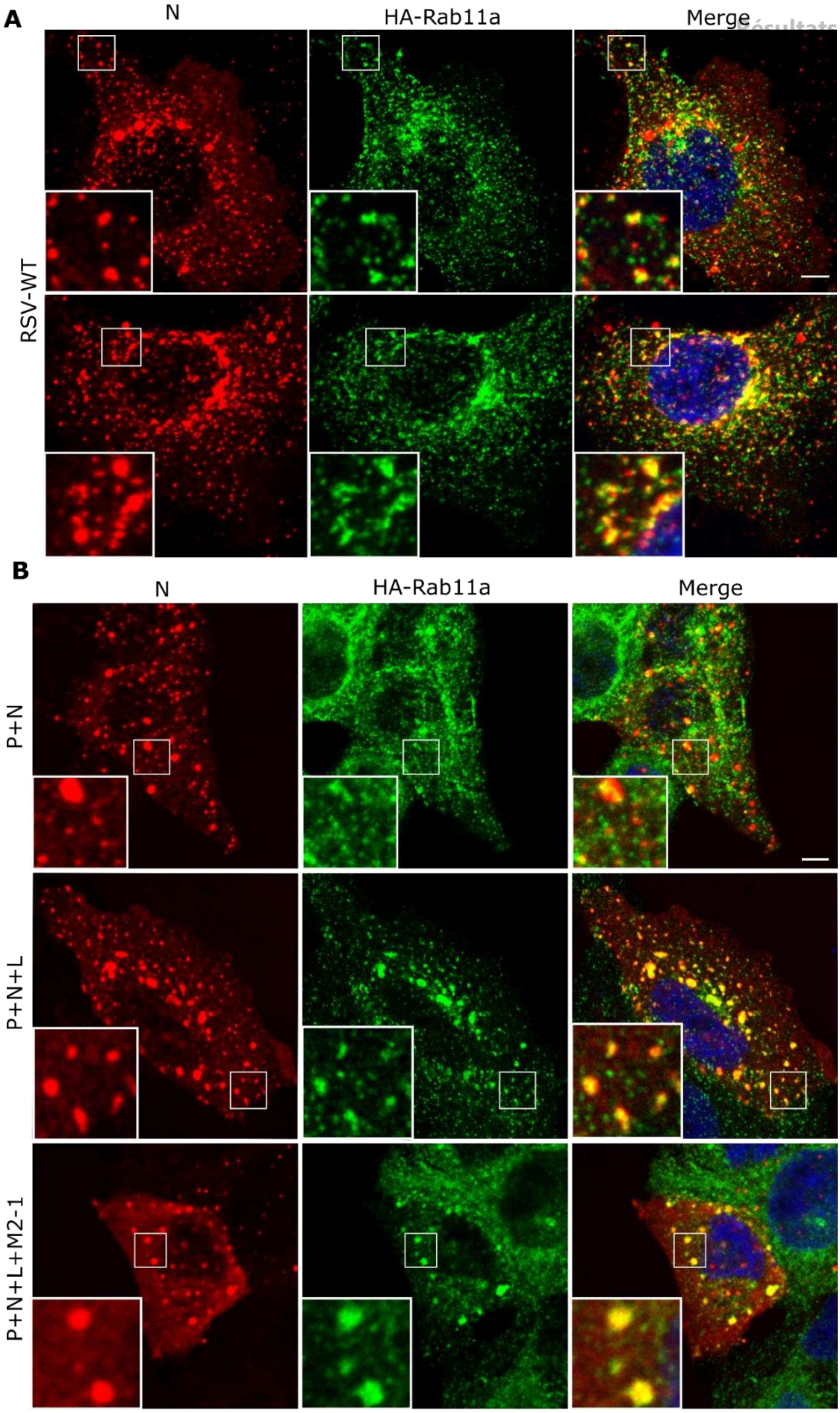

A
N
HA-Rab11a
Merge
RSV-WT
B
N
HA-Rab11a
Merge
P+N
P+N+L
P+N+L+M2-1

Figure 40. Colocalisation des protéines de la RNPs avec Rab11a. A) Les cellules A549-HA-Rab11a ont été infectées et fixées à 24 h les protéines N (rouge) et HA-Rab11a (vert) ont été immunomarquées. B) Les protéines N, P, L, M2-1 ont été transfectées transitoirement dans des cellules A549-HA-Rab11a. Les protéines HA-Rab11 ont été immunomarquées en vert et la protéine N en rouge. Les cellules ont été observées au microscope confocal SP8 Leica. Maximal Z projection de 3Z. Cette expérience a été réalisée deux fois. Barre d'échelle 5 µm.

8. Impact de Rab11 sur la production virale

Nos résultats montrent l'implication des protéines Rab11a dans le transport des RNPs du RSV. Nous avons voulu vérifier l'effet de l'absence de Rab11 sur la libération virale. Pour cela, nous avons traité des cellules A549 avec des siRNA dirigés contre Rab11a ou NT. A 48 h p.t. nous avons soit infecté avec un RSV-GFP et titré le surnageant des 24 h p.i. en plage de lyse soit infecté les cellules avec un RSV-Luc et mesuré la luminescence à 48 h p.i (Figure 41a et 41b). En parallèle, des cellules exprimant de manière constitutive la protéine HA-Rab11 sauvage (WT) ou la protéine HA-Rab11-S25N (dominant négative DN) ont été infectées et titrées comme indiqué précédemment (Figure 41c et 41d). Le titrage viral ne révèle aucune différence de titre virale entre les cellules traitées au siRNA NT et siRNA Rab11a (Figure 41a) ainsi que pour les cellules Rab11-WT et DN (Figure 41b). Au contraire, lors d'une infection avec le RSV-Luc on observe une diminution de la multiplication virale à faible MOI et à forte MOI. Ainsi les données semblent indiquer un impact de Rab11 dans les étapes d'entrées virales.

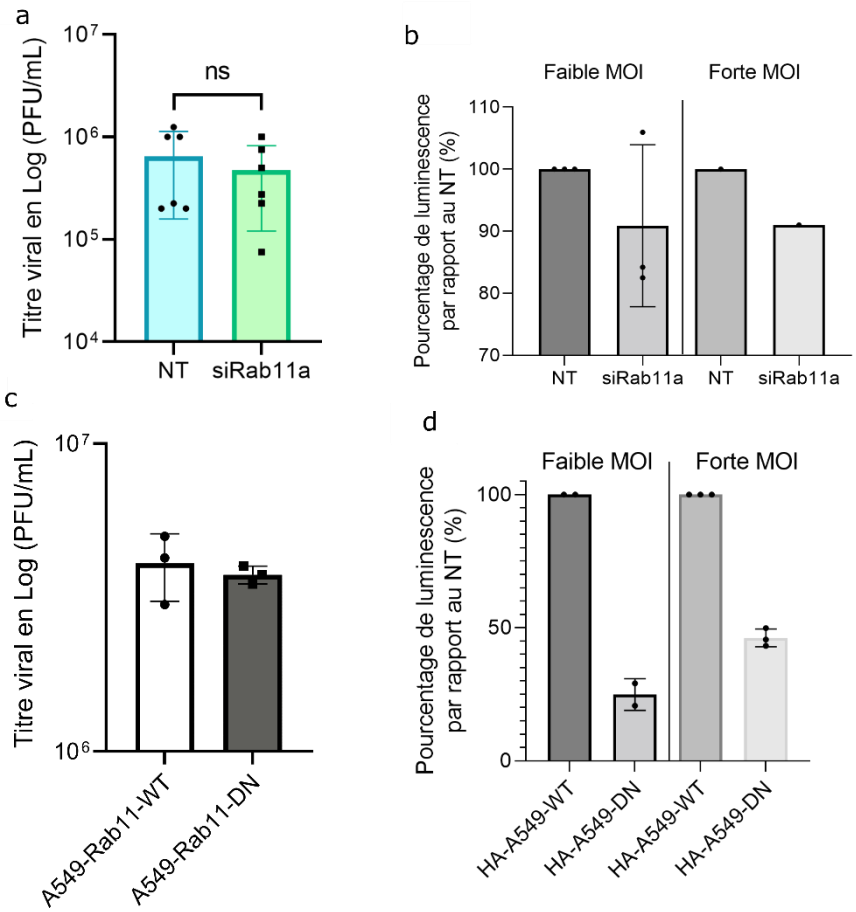


Figure 41. L'impact de Rab11a sur la multiplication virale. a) Des cellules A549 ont été traité par des siRNA non targeting (NT) ou contre Rab11a, et infecté à 48 h.p.t. par a) à forte MOI par RSV-mGFP, à 24 h.p.i. le surnageant est titré en plage de lyse b) par RSV-Luc et la luminescence est mesurée à 40hpi pour la faible MOI (0,02) et 20 h p.i. pour la forte MOI (1) . Les cellules A549 modifié pour exprimer une version Rab11a sauvage (WT) ou une version Rab11a-S25N dominant négative (DN) sont infectées par c) RSV-GFP puis titrées en plage de lyse d) RSV-Luc puis la luminescence est mesurée à 20 h p.i. pour la faible MOI et 40hpi pour la forte MOI.

9. Construction d'un outil viral pour l'observation de l'infection dans des cellules polarisées

Les études de l'équipe de Katoh révèle des différences de titre viraux et de libération entre les cellules polarisées et non polarisées (Katoh et al. 2015). Pour autant, l'infection par le RSV de cellules polarisées est difficile. En effet, l'infection va entrainer une sortie des cellules infectées de l'épithélium donnant un aspect « œuf au plat » aux cellules infectées (Liesman et al. 2014). Pour parer au « shedding » cellulaire, nous avons construit et obtenu par génétique inverse un virus déficient en protéine NS2 par simple recombinaison entre les protéines NS1 et N. Des cellules BCI-NS1 polarisées et différenciées ont été infectées par le RSV-Δ-NS2 puis immunomarquées après 48 h p.i. (Figure 42). Comme attendu, les cellules n'ont pas été extraite de l'épithélium et il est possible d'apercevoir les filaments viraux (vert) ainsi que les corps inclusions (bleu). Cet outil va permettre de visualiser la localisation d'éléments cellulaires tels que Rab11 par rapport au RNPs et d'étudier la libération virale sur un modèle adapté.

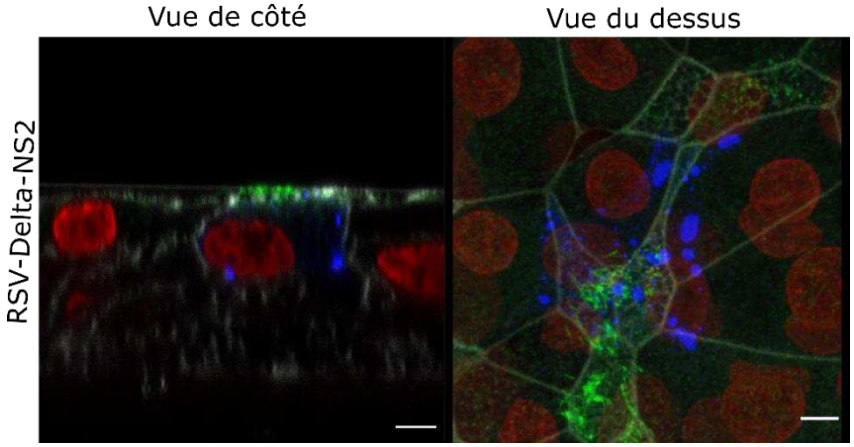


Figure 42. Infection de cellules polarisées avec un RSV déficient en protéine NS2. Les cellules BCI ont été infectée par le RSV-Δ-NS2. La protéine N (bleu), F (vert) et l'actine (jaune) ont été immunomarqués et observés au microscope confocal SP8 Leica. Les Z de la vue du dessus ont été empilés. Scale bar 5µm

Légende des Films supplémentaires

Film supplémentaire 1. Dynamique des RNP dans les cellules infectées. Microscopie time-lapse des RNP dans des cellules HEp-2 infectées par le RSV-GFP-N pendant 18-20 h.p.i. Les cellules ont été imagées comme décrit dans la section méthodes toutes les 0.21s pendant 1 min avec un confocal Spinning disk X1. Les vidéos résultantes ont été visualisées sous Image J (6 f.p.s) après une projection z maximale de 3Z. Une vidéo représentative de 2 expériences indépendantes est présentée. Barre d'échelle de 5 µm.

Film supplémentaire 2. Analyse des trajectoires des RNP. Le suivi automatique des RNP en mouvement a été réalisé à l'aide du logiciel Imaris, comme décrit dans la section méthodes. Les vidéos résultantes ont été visualisées sous le logiciel Imaris. Les résultats du suivi sur les images time lapse montrées dans le film supplémentaire 1 sont présentés ici. Les trajectoires sont matérialisées par des queues de dragon. Barre d'échelle de 5 µm.

Film supplémentaire 3. RNP se déplaçant le long des microtubules. Microscopie à intervalles réguliers de cellules A549 infectées par le RSV-GFP-N pendant 18-20 h p.i et traitées par le docétaxel-647. Les cellules ont été imagées comme décrit dans la section méthodes toutes les 0,15s pendant 1 min avec un confocal Spinning disk X1. Les vidéos résultantes ont été visualisées sous Image J (8 f.p.s) après une projection z maximale de 2Z. Une section d'une vidéo représentative de 3 expériences indépendantes est présentée. Barre d'échelle de 5 µm. La flèche verte pointe une RNP se déplaçant le long des microtubules.

Films supplémentaires 4 et 5. Les mouvements des RNP s'arrêtent après la dépolymérisation des microtubules mais pas de l'actine. Microscopie à intervalles réguliers de cellules A549 infectées par le RSV-GFP-N pendant 18h. Les images ont été prises toutes les 0,63s (film 4) ou 0,53s (film 5) dans une chambre contrôlée par CO2 et chauffée à 37 °C, avec un microscope confocal inversé Olympus FV3000. Les cellules ont d'abord été imagées pendant 3 minutes, avant tout traitement médicamenteux. Les cellules ont ensuite été traitées avec du nocodazole (NZ) 20 µM (film supplémentaire 4) pendant 10 min ou avec de la Cytochalasine D (CytoD) 2 µM pendant 15 min (film supplémentaire 5), et des images ont été prises pendant 3 min supplémentaires (à droite). Les vidéos résultantes ont été visualisées à l'aide du logiciel Image J (8 f.p.s) après une projection z maximale de 3Z. Une vidéo représentative d'une expérience dans laquelle 3 vidéos ont été acquises est montrée. Barre d'échelle de 5 µm.

Films supplémentaires 6 et 7. Altération du trafic des RNP par dépolymérisation des microtubules. Microscopie à intervalles réguliers de cellules A549 infectées par RSV-GFP-N pendant 18-20 h.p.i puis traitées avec du DMSO (contrôle, film supplémentaire 6) ou du Nocodazole 2 µM (film supplémentaire 7) pendant une heure. Les cellules ont été imagées comme décrit dans la section méthodes toutes les 0.15s pendant 1 min avec un disque de Spinning confocal X1. Les vidéos résultantes ont été visualisées sous Image J (12 f.p.s) après une projection z maximale de 2Z. Une vidéo représentative de 3 expériences est montrée. Barre d'échelle 5 µm.

Film supplémentaire 8. Dynamique des RNP et des vésicules de Rab11a. Microscopie à intervalles réguliers de cellules A549 exprimant de manière transitoire Cherry-Rab11a et infectées par RSV-GFP-N pendant 18-20 h.p.i. Les cellules ont été imagées comme décrit dans la section méthodes toutes les 0,07s pendant 1 min avec un disque rotatif confocal X1. Une vidéo représentative de 3 expériences est présentée. Les vidéos résultantes ont été visualisées sous Image J (8 f.p.s). Barre d'échelle 5µm. Les flèches blanches indiquent les RNP (vertes) se déplaçant avec Rab11a (blanc).

Film supplémentaire 9. Altération des RNP associées à la mobilité de Rab11a par dépolymérisation des microtubules. Microscopie à intervalles réguliers de cellules A549 exprimant transitoirement Cherry-Rab11a et infectées par RSV-GFP-N pendant 18-20 h.p.i. puis traitées pendant 10 minutes avec du nocodazole 20 µM. Les cellules ont été imagées comme décrit dans la section méthodes toutes les 0,07 pendant 1 min avec un Spinning disk confocal X1. Une vidéo représentative de 2 expériences est montrée. Les vidéos résultantes ont été visualisées sous Image

J (8 f.p.s). Barre d'échelle 5µm. Les flèches blanches indiquent les RNP (vertes) associées à Rab11a (rouge).

Films supplémentaires 10 et 11. Altération du trafic des RNP par l'extinction de l'ARN de Rab11a. Les cellules A549 ont été transfectées avec un siRNA non ciblant (contrôle, film supplémentaire 10) ou un siRNA ciblant Rab11a (film supplémentaire 11) pendant 48h et ensuite infectées avec le RSV-GFP-N. À 18-20 h.p.i., les cellules ont été imagées comme décrit dans la section méthodes toutes les 0,15 pendant 1 min avec un confocal Spinning disk X1. Les vidéos résultantes ont été visualisées sous Image J (12 f.p.s) après une projection z maximale de 2Z. Une vidéo représentative de 3 expériences est montrée. Barre d'échelle 5µm.

Discussion - Perspectives

1. Construction d'un virus fluorescent

Depuis plusieurs années, de nombreuses équipes cherchent à mieux comprendre le cycle viral en observant les mouvements de particules uniques. Diverses méthodes de marquage ont été développées à cet effet. Elles reposent sur des sondes nucléotidiques, de petites molécules organiques, de protéines fluorescentes ou encore de nanocristaux semi-conducteur (Wang et al. 2018; Liu et al. 2020). Les sondes sont des petits fragments nucléotidiques couplés à des molécules fluorescentes. Elles sont complémentaires d'une région du génome viral et vont s'hybrider sur celui-ci. Ainsi les génomes viraux sont marqués par la sonde fluorescente qui pourra être suivie *in vitro*. Ce type de marquage a permis de révéler le mouvement des filaments viraux du RSV (Santangelo and Bao 2007). Bien que le signal émis par la sonde fluorescence soit intense, les cellules présentent un bruit de fond important qui ne permet pas de distinguer précisément les génomes viraux dans le cytoplasme. Une autre méthode consiste à utiliser des molécules organiques fluorescentes qui vont pouvoir s'accrocher aux protéines d'intérêt. Ce marquage permet de visualiser diverses protéines cellulaires ou virales ainsi que de détecter les modifications de pH (Le Guern et al. 2020). Cette méthode a permis de décrire les stratégies d'entrée de certains virus comme les virus de la rage ou les virus Influenza (Xu et al. 2015; Rust et al. 2004). L'intensité et la stabilité du signal fluorescent de ces petites molécules est un avantage de cette méthode mais elle implique une modification des protéines à visualiser en amont et surtout la réalisation d'une étape de marquage *in vitro*. L'expression d'une protéine d'intérêt fusionnée à une protéine fluorescente est une méthode classique de marquage des protéines cellulaires ou virales. Toutefois la localisation et la fonction de la protéine d'intérêt peuvent être perturbées par la fusion avec ces étiquettes volumineuses. La position de l'insertion doit être déterminée avec précautions. Cette stratégie de marquage a été largement utilisée pour suivre les mouvements de RNPs virales. Elle a notamment permis de visualiser le transport des RNPs des virus Influenza, Sendai ou VSV (Avilov, Moisy, Munier, et al. 2012; Lakdawala et al. 2014; Yacovone et al. 2016; Holzwarth et al. 2020; Dolnik et al. 2014; Grikscheit et al. 2020). Les nanocristaux vont permettre de marquer un élément d'intérêt avec de la biotine et de suivre cet élément grâce au couplage de la Streptavidine avec des nanocristaux fluorescents. Cette méthode est très utilisée pour observer l'entrée des particules virales

notamment en marquant l'enveloppe virale (Zheng et al. 2017; Zhang et al. 2018). Cette méthode a pour avantage d'avoir une fluorescence très stable et avec peu bruit de fond mais son temps d'émission est court.

Pour le suivi de l'export des ribonucléoprotéines du RSV, nous avons opté pour un marquage de la nucléoprotéine virale N par une protéine fluorescente, la green fluorescente protein (GFP) fusionnée en N-terminal. Nos études précédentes avaient montré qu'en présence de protéine sauvage N, la GFP-N n'altérait par la réplication virale (Rincheval et al. 2017b). La séquence codant la protéine GFP-N a été insérée entre les protéines M et SH du génome viral et le virus RSV-GFP-N a été produit par réverse génétique (M.-A. Rameix-Welti et al. 2014). Grâce au gradient de transcription du génome viral, cette insertion en aval du gène de la protéine N sauvage, permet une expression de GFP-N plus faible que celle de la N sauvage. Le génome viral est encapsidé par plusieurs milliers de protéines N (10 nucléoprotéines pour 70 nucléotides par tour d'hélice). Le signal produit par les GFP-N incorporées est ainsi suffisant pour être observable en microscopie. Pour vérifier la pertinence du modèle, nous avons confirmé que les protéines GFP-N colocalisaient avec les ribonucléoprotéines virales en marquant les protéines N et P sauvages par immunofluorescence. De plus, comme attendu, GFP-N est retrouvée dans les corps d'inclusion (IBs) et les filaments viraux au même titre que la N sauvage. De plus, nous avons montré que la multiplication virale n'était pas affectée par la présence d'une GFP-N supplémentaire. Cet outil nous a permis de visualiser directement les RNPs du RSV par microscopie pour la première fois.

2. Technique d'analyse microscopique et suivi des particules virales

Pour visualiser les particules virales il existe plusieurs systèmes d'imagerie présentant chacun leurs défauts et leurs avantages (Huang and Xie 2014). Le choix du système d'imagerie dépend de la question posée. Pour étudier les mouvements d'objets très petits et potentiellement rapides comme les RNPs dans des cellules infectées, il était essentiel d'avoir des images très rapprochées dans le temps. Nous avons tout d'abord utilisé un microscope confocal à scanner résonant qui permet des acquisitions rapides. En revanche, le ratio signal/bruit de fond n'était pas suffisant pour permettre une analyse automatisée des mouvements des RNPs. Nous avons donc choisi d'utiliser un microscope confocal à disque tournant qui nous permettait d'obtenir une acquisition rapide, de l'ordre de 0,07 s par plan, avec un rapport signal sur bruit de fond suffisant pour permettre une analyse automatisée des mouvements. Une alternative possible,

serait l'utilisation d'un microscope à feuille de lumière comme cela a été fait pour des études de mouvements (Buglak et al. 2021). Toutefois, l'objectif de ce type de microscope doit être immergé dans l'échantillon ce qui constitue un frein dans un contexte infectieux.

Depuis quelques années, l'analyse des mouvements des particules virales a permis de décrypter certains processus des cycles viraux. Notamment, l'importance des microtubules ou de l'actine dans l'entrée des virions jusqu'à la région périnucléaire comme le virus de la grippe, de la dengue, adénovirus, RSV, HIV (Wang et al. 2018). L'analyse des mouvements des particules repose soit sur un suivi manuel des spots soit un suivi automatisé. Le suivi manuel est simple mais devient rapidement contraignant lorsque la surface et le nombre de particules augmente. Le suivi automatique peut sembler plus reproductible et plus adapté pour une analyse à grande échelle mais présente des contraintes. L'analyse des mouvements des RNPs du RSV fut difficile car 1) les mouvements des RNPs sont rapides ; 2) elles se déplacent dans n'importe quelle direction ce qui imposait l'analyse de la totalité de la cellule ; 3) le logiciel détecte aussi la fluorescence émise par les corps d'inclusion ou les filaments viraux ce qui peut perturber l'analyse. Nous avons utilisé le module « spot protocole » du logiciel Imaris pour effectuer un suivi des particules virales et quantifier leurs mouvements. Nous avons mis en place un système de tri semi-automatique pour filtrer les trajectoires artéfactuelles liées à la fluorescence des IBs ou à la création d'un lien artificiel entre 2 tracks d'objets peu mobiles. Nous avons ainsi déterminé différents paramètres qui caractérisent les mouvements des RNPs. Nous nous sommes concentrés sur l'étude de la vitesse maximale car elle apportait une information sur les réseaux et moteurs moléculaires utilisés, à la distance de déplacement et à la vitesse médiane des particules. L'ensemble de ces données ont pour but de caractériser le déplacement des RNPs mais également de comparer les déplacements lors d'un traitement visant à perturber le trafic de celle-ci.

3. Caractérisation des mouvements des RNPs

La caractérisation des mouvements des éléments viraux ou cellulaires peut donner de nombreuses indications sur le réseau du cytosquelette utilisé ainsi que sur les moteurs moléculaires. Très peu d'études portent sur la sortie des RNPs du RSV. Grâce à la construction du virus RSV-GFP-N, nous avons pu caractériser pour la première fois les mouvements des RNPs en nous intéressant spécifiquement aux étapes d'export des IBs jusqu'à la membrane. Pour optimiser l'observation d'événements d'export, les vidéos ont été acquises après 18 h

d'infection. Au contraire des quantifications manuelles faites pour le virus de Sendai (Chambers and Takimoto 2010), l'analyse automatique des mouvements des RNPs, nous a permis de collecter les données d'un grand nombre de trajectoires de RNP tout en limitant l'intervention de l'expérimentateur. L'observation des mouvements montrait une majorité de RNPs peu mobiles voir stationnaires tandis qu'une plus faible proportion présentait des mouvements rapides et dirigés. Ce type de mouvement a déjà été décrit pour plusieurs virus ARN négatifs tels que les virus Influenza, Sendai et le virus de la stomatite vésiculaire (Chambers and Takimoto 2010; Holzwarth et al. 2020; M J. Amorim et al. 2011; Avilov, Moisy, Munier, et al. 2012). L'analyse des mouvements individuels des RNPs du RSV révèle que 10% des particules présentent une vitesse maximale supérieure à 1,7 µm/s. Les quelques études ayant quantifié les mouvements d'autres virus montraient des vitesses maximales supérieures à 1 µm/s (Chambers and Takimoto 2010; Momose et al. 2011; Avilov, Moisy, Munier, et al. 2012) ainsi que des vitesses instantanées variables au cours du temps (Avilov, Moisy, Munier, et al. 2012). Les changements rapides de vitesse pourraient indiquer un accrochage/décrochage des RNPs à différents moteurs moléculaires et/ou des changements de réseau. Les mouvements observés et quantifiés sont semblables entre les deux types cellulaires, A549 et HEp-2 ce qui suggèrent que les mécanismes mis en jeu pourraient être les mêmes au moins dans ces 2 types cellulaires. La reproductibilité des résultats d'une expérience à l'autre et entre les types cellulaires valide l'utilisation de cette méthode pour l'étude de l'effet de drogues ou d'inhibition de l'expression de protéines cellulaires.

4. Implication des microtubules dans le transport des RNPs

L'analyse des mouvements des particules virales révèle des vitesses caractéristiques de celles connues pour les réseaux de microtubules (Hirschberg et al. 1998). Nous avons observé les RNPs du RSV disposées sur les microtubules comme cela avait été mis en évidence pour les virus Influenza et VSV (Momose et al. 2007; Das et al. 2006). En marquant les MT en live, nous avons pu capturer le mouvement de RNPs du RSV le long des MT montrant clairement un mécanisme de transport basé sur les MT comme pour le virus Sendai et le virus de la rougeole (Chambers and Takimoto 2010; Nakatsu et al. 2013).

Le rôle critique des MT dans les mouvements rapides des RNPs du RSV est démontré par l'arrêt brutal de ces mouvements lors de la dépolymérisation des microtubules comme pour le virus de Sendai (Chambers and Takimoto 2010). Nos analyses quantitatives montrent une

diminution significative des vitesses et du déplacement des RNPs lors de la dépolymerisation des MT. Les microtubules sont aussi très utilisés dans le transport des RNPs de *Rhabdoviridae* (Zan et al. 2017). Au contraire, les RNPs des *Filoviridae* sont transportées exclusivement sur le réseau d'actine (Gordon et al. 2019). Pour le virus d'influenza, le déplacement des RNPs est affecté aussi bien lors de la dépolymérisation des MT que de l'actine. En effet, les traitements par le NZ et la CytoD individuellement ont peu d'effet sur les vitesses rapides des RNPs suggérant l'utilisation des deux réseaux pour le transport des RNPs d'Influenza (Avilov, Moisy, Naffakh, et al. 2012; M J. Amorim et al. 2011). De même des résultats contradictoires retrouvent ou non des mouvements de RNPs le long des MT (Momose et al. 2011; Avilov, Moisy, Munier, et al. 2012). Pour le VSV, les mouvements des RNPs sont perturbés par un traitement NZ mais aussi par la dépolymérisation de l'actine. De plus, la dépolymérisation des MT n'affecte que très partiellement la sortie virale. Ces données suggèrent l'utilisation des deux réseaux pour le transport des RNPs du VSV (Yacovone et al. 2016; Das et al. 2006; Holzwarth et al. 2020).

Nous avons observé que la dépolymérisation des microtubules entraînait une augmentation de la taille les inclusions virales comme décrit pour le virus de Sendai, des oreillons et du VSV (Chambers and Takimoto 2010; Nakatsu et al. 2013; Momose et al. 2011; Katoh et al. 2015; Das et al. 2006). Ces données suggèrent une accumulation des RNPs dans les usines virales par défaut d'export, confirmant nos résultats.

L'importance de l'intégrité du réseau de MT pour la multiplication du RSV est confirmée par la chute du titre viral observée en présence de NZ. Cette diminution reste partielle, de l'ordre d'un log, ce qui indique l'existence de voies de suppléante. Une chute comparable du titre viral est retrouvée pour le VSV, le virus de Sendai ou celui des Oreillons, alors que la production de virus Influenza n'est pas affectée (Kallewaard, Bowen, and Crowe 2005; Momose et al. 2007; Chambers and Takimoto 2010; Katoh et al. 2015; Das et al. 2006).

En conclusion, nos résultats démontrent que le RSV utilise principalement les MT pour assurer les déplacements rapides et orientés de ses RNPs. Le réseau d'actine avec la myosine Vb interviendrait dans la libération des virions (Kallewaard, Bowen, and Crowe 2005; Utley et al. 2008; Brock et al. 2003). Un modèle possible serait un transport sur les MT jusqu'au réseau d'actine sous-cortical puis un transfert des RNPs sur celui-ci.

5. Identification de moteurs moléculaires impliqués dans le mouvement des RNPs

Ayant démontré un transport des RNPs sur les MT, nous avons réalisé une recherche systématique pour identifier les différents moteurs moléculaires responsables. Celle-ci consistait à inhiber l'expression des kinésines, dynéines et certaines myosines une à une par RNA interférence avec des siRNA spécifiques, puis à étudier l'impact de cette inhibition sur la multiplication virale à faible MOI en multicycle et à forte MOI en cycle unique. Ces expériences n'ont pas permis d'identifier le moteur moléculaire impliqué dans l'export des RNPs. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'échec de ce crible. Sur le plan technique tout d'abord, nous n'avons pas vérifié l'efficacité de chaque pool de siRNA. Il est possible que certains siRNA n'aient inhibé que partiellement la production des protéines cibles. Nous n'avons observé aucun effet de l'inhibition de la myosine Vb préalablement identifiée comme un moteur moléculaire important dans la multiplication virale du RSV (Brock et al. 2003). Ces résultats négatifs suggèrent que l'expérience réalisée n'est pas adaptée pour détecter un défaut dans les étapes terminales. L'infection par le RSV entraine en effet la formation de syncytia, qui pourraient permettre une propagation du virus malgré un défaut de sortie des RNPs. De plus, il existe de nombreux moteurs moléculaires pouvant être utilisés pour le transport des RNPs. Le fait que l'on ne voit aucun effet sur un moteur en particulier peut être le reflet de l'utilisation de plusieurs moteurs.

Parallèlement, nous nous sommes concentrés sur la kinésine KIF13a connue pour être un moteur moléculaire prédominant dans le transport des RNPs du virus d'Influenza et Lassa (Ramos-Nascimento et al. 2017; Fehling et al. 2013). Les travaux réalisés sur ces virus ont montré une forte colocalisation entre KIF13a et les RNPs dans les cellules infectées. Pour le virus Influenza, l'absence du domaine moteur de KIF13a ou son l'inhibition entraîne une rétention des RNPs dans le cytoplasme cellulaire tandis que la surexpression de KIF13a induit une relocalisation des RNPs au voisinage de la membrane plasmique (Fehling et al. 2013; Ramos-Nascimento et al. 2017). Dans nos expériences, nous n'avons pas observé de colocalisation évidente entre les RNPs du RSV et GFP-KIF13a, ni d'accumulation des RNPs en périphérie lors d'une surexpression de KIF13a. Toutefois les expériences ont été réalisées sur cellules fixées entrainant une déstabilisation des filaments tubulaires créés par la surexpression de KIF13a. De plus, les RNPs étant majoritairement stationnaires, ses observations ne nous

permettent pas de conclure sur l'implication de KIF13a dans le transport des RNPs. Il pourrait être envisagé d'observer le mouvement des RNPs en live par rapport aux filaments KIF13a fluorescent. Il est en effet possible que l'analyse de la multiplication virale ne permette pas de mettre en évidence le rôle de KIF13a mais que l'impact d'une inhibition de celle-ci sur les mouvements des RNPs soit quantifiable par notre méthode de tracking. En conclusion, nos expériences ne permettent pas de conclure sur l'implication de KIF13a dans le transport de RNPs du RSV mais elles permettent d'affirmer que ce moteur n'a pas un rôle prédominant dans ce transport.

6. La voie de recyclage des endosomes dans le transport des RNPs

Les étapes terminales du cycle viral du RSV sont très mal connues, en particulier les mécanismes d'export des RNPs ont été peu étudiés. Deux études, réalisées par la même équipe, suggèrent l'implication de l'endosome de recyclage dans les étapes tardives de la multiplication du RSV. L'expression de dominants négatifs de la myosine Vb et de Rab11-FIP2 réduit en effet la production virale de 1 à 2 log (Brock et al. 2003; Utley et al. 2008).

Nos résultats suggèrent que l'endosome de recyclage, marqué par la protéine Rab11, est impliqué dans le transport des RNPs du RSV. En effet, nos expériences révèlent une colocalisation entre les RNPs du RSV et les protéines Rab11a (endogène et tagué HA). L'observation des mouvements des RNPs dans des cellules exprimant une protéine Rab11a fluorescente a permis de visualiser directement les mouvements conjoints de la RNP et de Rab11a. Dans ces vidéos, la vésicule Rab11a précède la RNP et semble la tirer derrière elle. Rab11 est impliqué dans le déplacement des RNPs d'autre virus à ARN négatif (Bruce et al. 2012; Vale-Costa and Amorim 2016).

L'implication de Rab11 dans les étapes tardives de la multiplication de différents *Paramyxoviridae* est clairement établie. Notamment, les RNPs du virus Sendai colocalisent et circulent avec les protéines Rab11. Et l'absence de Rab11 provoque une accumulation des RNPs dans le cytoplasme qui n'a pas été observée dans nos résultats préliminaires sur le RSV (Chambers and Takimoto 2010; Stone et al. 2016). Des résultats similaires sont obtenus pour le virus de la rougeole et le virus parainfluenza (Nakatsu et al. 2013; Stone et al. 2016).

Katoh *et al*, ont comparé l'importance de la voie Rab11 dans le transport des RNPs du virus des oreillons dans des cellules MDCK polarisées ou non polarisées. L'effet de l'inhibition de

Rab11 sur la production virale est 10 fois plus important dans les cellules polarisées (Katoh et al. 2015). Ces résultats suggèrent que la voie Rab11 est utilisée préférentiellement dans les cellules polarisées au détriment des voies alternatives utilisées dans les cellules non polarisées.

Le rôle de Rab11 dans le transport des RNPs des virus Influenza a fait l'objet de nombreuses publications (Maria João Amorim 2019). Les RNPs des virus Influenza, comme celles du RSV, colocalisent et circulent avec Rab11 (Momose et al. 2007; Jo et al. 2010; M J. Amorim et al. 2011; Eisfeld et al. 2011; Momose et al. 2011; Avilov, Moisy, Naffakh, et al. 2012) et une interaction entre les RNPs et Rab11 a été révélée par coimmunoprécipitation (Eisfeld et al. 2011; Momose et al. 2011). Même si le modèle complet n'est pas encore clair, l'ensemble des données suggèrent que les RNPs d'Influenza se regroupent au niveau du centrosome après leur sortie du noyau et y recrutent les vésicules Rab11 (de Castro Martin et al. 2017). Des protéines modulatrices des microtubules (YB-1) vont contribuer aux interactions entre Rab11 et les RNPs ainsi qu'au chargement de Rab11 sur les microtubules (Kawaguchi et al. 2015). Les expériences sur cellules polarisées montrent l'importance de Rab11 dans la localisation apicale des segments d'ARN viraux (Momose et al. 2011). C'est, semble-t-il, au cours du transport vers les sites de bourgeonnement que le tri des RNPs a lieu (Lakdawala et al. 2014; Han et al. 2021). Le génome des virus Influenza est, en effet, composé de 8 segments ARN négatifs qui sont répliqués indépendamment et qui s'associent entre eux avant le bourgeonnement. Le rapprochement des segments pendant le transport pourrait favoriser cette association. Un des modèles propose la formation de bio-condensats concentrant les RNPs et englobant des vésicules Rab11 (Alenquer et al. 2019).

L'infection par les virus Influenza modifie profondément le compartiment Rab11. Elle induit un réarrangement membranaire résultant en la formation de vésicules groupées Rab11 positives avec une simple ou une double membrane et une augmentation de la taille des vésicules (Vale-Costa et al. 2016). Le trafic vésiculaire de Rab11 est fortement diminué dans les cellules infectées ce qui pourrait être lié à une compétition entre les RNPs et les effecteurs de Rab11 (Bhagwat et al. 2020b). Dans le cas du RSV, on observe aussi un effet de l'infection sur le compartiment Rab11 avec au contraire une accélération du trafic des vésicules Rab11 et du recyclage de la transferrine.

Pour la première fois dans les études des *Mononegavirales*, notre étude a permis de caractériser l'impact de l'inhibition de Rab11a sur le mouvement des RNPs du RSV. Les résultats montrent

qu'en l'absence de Rab11 endogène les vitesses maximales et les distances de déplacement des RNPs diminuent significativement. En revanche, nous n'avons pas pu conclure sur l'effet d'une inhibition de Rab11a sur la production virale car les résultats sont contradictoires. Ceci peut s'expliquer par l'existence de plusieurs voies de transport, capables de suppléer à l'inhibition de Rab11a. Il faut, de plus, noter que Rab11b n'est pas inhibée dans ces expériences. Des explorations complémentaires sont nécessaires. Le rôle de Rab11 dans la multiplication virale serait peut-être plus net dans des cellules polarisées comme observé pour le virus des oreillons (Katoh et al. 2015).

Le détournement de la voie Rab11 n'est pas retrouvé pour tous les *MNV*. Ainsi les *Rhadoviridae* comme le VSV et le virus de la rage n'utilisent pas Rab11 pour l'export des RNPs (Han et al. 2021; Xu et al. 2015). Pour les *Filoviridae* les étapes de sortie semblent aussi impliquer la voie Rab11 mais pas les étapes exports des RNPs (Nanbo and Ohba 2018). En effet, une étude récente révèle la présence de protéine Rab11 dans les pseudos particules virales et l'inhibition de Rab11 provoque une modification de la distribution des RNPs ainsi qu'une diminution de la production de certaines protéines virales. Pour autant, les images de microscopie ne semblent pas révéler de colocalisation entre les RNPs et Rab11 ce qui évoquerait un lien indirect de Rab11 dans la multiplication virale de Ebola (Nanbo and Ohba 2018). En effet, Rab11 possède de multiples rôles et se trouve à l'intersection de nombreuses voies endosomales (Welz, Wellbourne-Wood, and Kerkhoff 2014).

La voie Rab11 étant très importante dans le maintien et le fonctionnement des cellules polarisées, il est intéressant de constater que de nombreux virus à ARN négatif ayant pour cibles les cellules polarisées détournent tous cette même voie pour assurer le transport de leurs RNPs.

De plus, nos résultats préliminaires sur la multiplication virale sont contradictoires et ne permettent pas de déterminer l'importance de Rab11 dans la multiplication virale. Certains résultats montrent que l'inhibition de Rab11 inhibe l'entrée virale tandis que d'autres ne montrent aucune différence dans la multiplication virale par titrage en plage de lyse. Ces premiers résultats doivent encore faire l'objet d'études.

7. Protéines de la RNP impliqué dans l'interaction avec Rab11

Dans des expériences de coimmunoprécipitation (co-IP), Rab11a capture la RNP du RSV et inversement. Ces résultats indiquent une interaction, pas nécessairement directe, entre Rab11a et au moins l'un des éléments de la RNP. Toutefois nous n'avons pas identifié ici quelle était la protéine virale engagée dans cette interaction. Des expériences co-IP avec chacune des protéines P, M2-1 et N individuellement n'a pas révélé d'interaction avec Rab11a. De même les expériences de co-IP n'ont pas mis en évidence d'interaction entre Rab11 et la protéine de matrice du RSV en accord avec les résultats d'études antérieures pour le RSV et pour le virus de Sendai (Kipper et al. 2015; Genoyer et al. 2020).

D'autres études sur le virus de Sendai et les virus Influenza démontrent une interaction entre la polymérase virale et Rab11 (Genoyer et al. 2020; Veler et al. 2022; M J. Amorim et al. 2011). La polymérase du RSV semble être un candidat de choix dans l'interaction avec Rab11. Nous avons observé une colocalisation de HA-Rab11 avec N, P et L mais pas avec N et P seules. Ces résultats suggèrent que L intervient dans l'interaction entre la RNP et Rab11a. Pour réaliser des expériences de co-IP avec la polymérase, il faut exprimer une protéine taguée car il n'existe pas d'anticorps permettant de visualiser ou d'immunoprécipiter la polymérase. Ces travaux sont en cours. L'objectif est de définir les partenaires de l'interaction Rab11/RNP puis de préciser les domaines impliqués dans cette interaction.

8. Modèle cellulaire pour l'étude de l'infection par le RSV

La majorité des études rapportées ici et nos travaux sont effectués sur des lignées de cellules adhérentes non polarisées. Mais pour plusieurs virus, notamment le RSV, les virus Influenza et le virus des oreillons, les cellules cibles sont des cellules polarisées et différenciées de l'épithélium respiratoire. Dans ses expériences, l'équipe de Katoh montre que les résultats diffèrent dans les cellules polarisés, où la voie Rab11 joue un rôle important, par rapport au cellules non polarisés (Katoh et al. 2015). De même, les protéines cellulaires impliquées dans l'assemblage et la libération du RSV diffèrent entre cellules polarisées et non polarisées (Brock et al. 2003; Utley et al. 2008). Il serait donc pertinent d'étudier le transport des RNPs dans des modèles de cellules différenciées.

Ces études se heurtent à de nombreux obstacles. En premier lieu, les cellules différenciées sont difficiles à entretenir et à transfecter transitoirement. L'utilisation de virus exprimant des

protéines fluorescentes permet toutefois d'observer directement le virus dans les cellules vivantes sans avoir à exprimer une protéine fluorescente. De plus, les cellules infectées par le RSV sont exclues de l'épithélium et desquament ne permettant pas leur analyse. Ce phénomène de « shedding » est dû à la présence de la protéine NS2 du RSV (Liesman et al. 2014). Pour étudier le cycle viral en cellules polarisées, nous avons construit par réverse génétique un virus délété pour NS2. L'infection par RSV-Delta-NS2 sur les cellules polarisées et différenciée BCI-NS1, a permis valider le modèle viral pour des expérimentations futures. En effet, l'infection par ce virus permet à l'épithélium de conserver son intégrité. Cet outil va permettre d'étudier plus en détails la libération virale ainsi que l'utilisation de protéines cellulaires dans le trafic des RNPs et notamment avec Rab11. Il sera possible de réaliser des immunofluorescences des protéines Rab11 sauvage et des RNPs pour vérifier la colocalisation entre les protéines

Conclusions

Les nombreuses données sur les virus à ARN négatif montrent l'importance de la voie de recyclage des endosomes dans le transport des RNPs et dans la libération des virions. Malgré des années de recherche sur le virus respiratoire syncytial, la stratégie d'export restait un grand mystère. Nos données ont permis d'ouvrir une partie de cette boite noire. Tout d'abord, nous avons révélé l'importance des microtubules dans le transport des RNPs virales. De plus, nous avons montré que la voie des endosomes de recyclage était impliquée dans le mouvement des RNPs du RSV. Dans le modèle, encore incomplet que nous proposons, les RNPs s'associent à Rab11 à la surface des vésicules soit directement soit indirectement et l'ensemble est transporté sur les microtubules grâce à un ou plusieurs moteurs moléculaires qui restent à définir (Figure 43). Pour autant de nombreuses questions restent en suspens :

- L'actine a-t-elle une implication dans le transport terminal des RNPs ? La Myosin Vb, moteur associé à l'actine et à Rab11 ainsi que Rab11-FIP2, interviendrait dans la production des particules virales (Brock et al. 2003). Il se pourrait qu'une fois transportées jusqu'à la membrane plasmique via les microtubules, les particules soient transférées sur le réseau d'actine avant l'assemblage et le bourgeonnement.
- Quels sont les moteurs moléculaires impliqués dans le mouvement des RNPs du RSV ? Notre crible siRNA n'a pas permis l'identification d'un moteur moléculaire ce qui peut s'expliquer par des défauts du plan expérimental. Il se peut aussi que les RNPs du RSV soient transportées par différents moteurs moléculaires que ce soit sur les réseaux de microtubules et d'actine.
- Quelles sont les protéines de la RNPs impliquées dans l'interaction avec les vésicules Rab11 ? Les données récentes sur les virus Sendai et Influenza ainsi que nos données immunofluorescence suggèrent l'implication de la polymérase dans l'interaction avec Rab11 (Genoyer et al. 2020; Veler et al. 2022). Il serait intéressant de réaliser des expériences dans ce sens.
- Avec quelle forme Rab11-GDP ou GTP les RNPs interagissent-elles ? Les publications qui ont examiné cette question montrent une interaction entre les RNPs virales et la forme active de Rab11 (Vale-Costa and Amorim 2016). Des expériences complémentaires sont nécessaires pour déterminer s'il en est de même pour le RSV.

- L'interaction Rab11-RNP est-elle médiée par des effecteurs de Rab11 ? Rab11-FIP2 et 3 jouent un rôle dans la multiplication virale (Brock et al. 2003; Utley et al. 2008). En effet, Rab11-FIP2 est l'effecteur intermédiaire entre actine et Rab11 tandis que Rab11-FIP3 interagi avec les chaines légères des dynéines (Horgan et al. 2010b). Il se pourrait que le transport des RNPs par Rab11 ne nécessite aucun effecteur comme c'est le cas pour Influenza dont la RNP interagi directement avec Rab11-GTP (Ramos-Nascimento et al. 2017).
- Quels sont les effets de l'infection sur la voie de recyclage des endosomes (Rab11) ? En effet, l'infection augmente le trafic vésiculaire et le recyclage de la transferrine. Pour le virus Influenza, l'infection perturbais le mécanisme de fonctionnement de la voie Rab11 avec une accumulation d'endosome dans le cytoplasme (de Castro Martin et al. 2017).
- Rab11 est-elle nécessaire pour permettre la sortie des RNPs des IBs ? En effet, nous ne savons pas quels sont les éléments qui régulent la sortie des RNPs de IBs. Rab11 ou d'autres protéines cellulaires ou virales pourraient être impliquées.

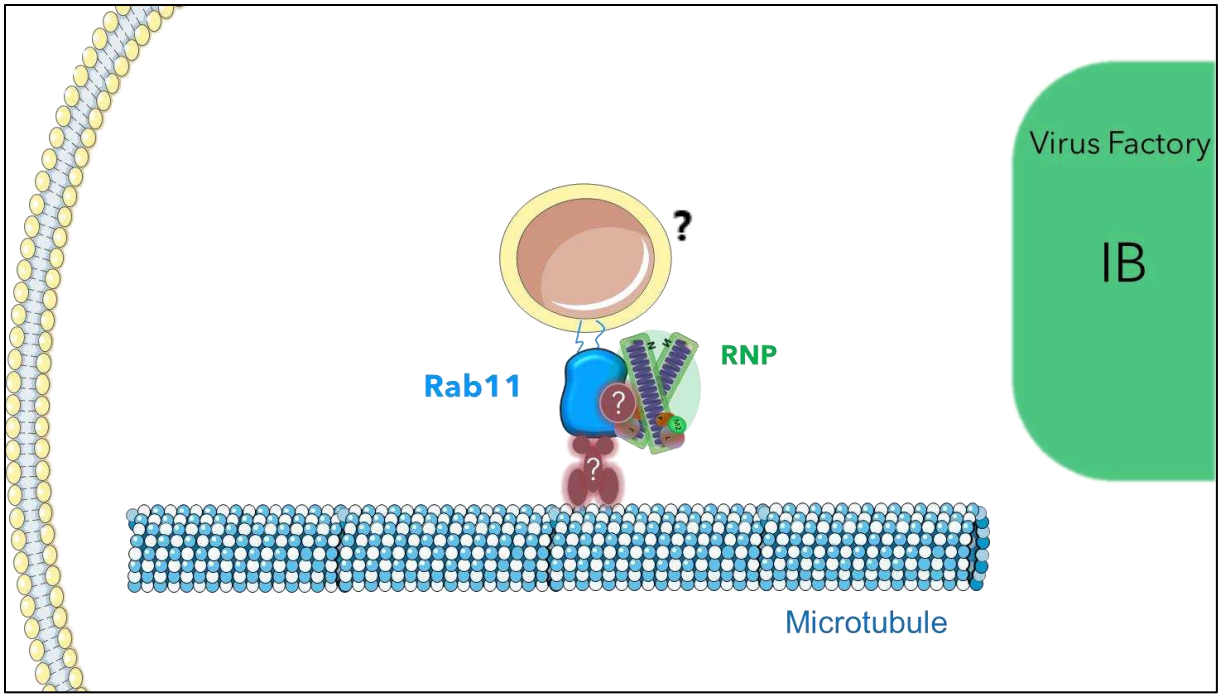


Figure 43. Représentation schématique du mouvement des RNPs dans le cytoplasme cellulaire.

Annexes

Article 1 :

Respiratory syncytial virus ribonucleoproteins hijack microtubule Rab11 dependent transport for intracellular trafficking-in process

Gina Cosentino, Katherine Marougka, Aurore Desquesnes, Nicolas Welti, Delphine Sitterlin, Elyanne Gault, Marie-Anne Rameix-Welti

Soumis à Plos Pathogens le 16/02/2022

Article 2 :

The Interactome analysis of the Respiratory Syncytial Virus protein M2-1 suggests a new role in viral mRNA metabolism post-transcription-2019

Camille Bouillier, Gina Cosentino, Thibaut Léger, Vincent Rincheval, Charles-Adrien Richard, Aurore Desquesnes, Delphine Sitterlin, Sabine Blouquit-Laye, Jean-Francois Eléouët, Elyanne Gault, and Marie-Anne Rameix-Welti

Click here to access/download;Manuscript;Cosentino_et_al-manuscript - plos.docx

Respiratory syncytial virus ribonucleoproteins hijack microtubule Rab11 dependent transport for intracellular trafficking

Gina Cosentino[1], Katherine Marougka[1], Aurore Desquesnes[1], Nicolas Welti[1], Delphine Sitterlin[1], Elyanne Gault[2], Marie-Anne Rameix-Welti[2]

[1] Université Paris-Saclay, Université de Versailles St. Quentin, UMR 1173 (2I), INSERM, Versailles, France.

[2] Université Paris-Saclay, Université de Versailles St. Quentin; UMR 1173 (2I), INSERM ; Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Hôpital Ambroise Paré, Laboratoire de Microbiologie, DMU15 ; Versailles, France.

Short title: RSV ribonucleoproteins export relies on microtubules and recycling endosome pathway

Abstract

The respiratory syncytial virus (RSV) is the primary cause of severe respiratory infection in infants worldwide. Replication of RSV genomic RNA occurs in cytoplasmic inclusions generating viral ribonucleoprotein complexes (vRNPs). vRNPs then reach assembly and budding sites at the plasma membrane. However, mechanisms ensuring vRNPs transportation are unknown. We generated a recombinant RSV harboring fluorescent RNPs allowing us to visualize moving vRNPs in living infected cells and developed an automated imaging pipeline to characterize the movements of vRNPs at a high throughput. Automatic tracking of vRNPs revealed that around 10% of the RNPs exhibit fast and directed motion compatible with transport along the microtubules. Visualization of vRNPs moving along labeled microtubules and restriction of their movements by microtubule depolymerization further support microtubules involvement in vRNPs trafficking. Approximately 30% of vRNPs colocalize with Rab11a protein, a marker of the endosome recycling (ER) pathway and we observed vRNPs and Rab11-labeled vesicles moving together. Transient inhibition of Rab11a expression significantly reduces vRNPs movements demonstrating Rab11 involvement in RNPs trafficking. Finally, Rab11a is specifically immunoprecipitated with vRNPs in infected cells suggesting an interaction between Rab11 and the vRNPs. Altogether, our results strongly suggest that RSV RNPs move on microtubules by hijacking the ER pathway.

Author summary

Respiratory syncytial virus is the leading cause of severe lower respiratory infection in children worldwide and is increasingly recognized as a major respiratory pathogen in the elderly and frail. Yet, no curative treatment or vaccine is currently marketed. The late stages of RSV multiplication remain poorly understood despite their potential targets for the development of antiviral strategies. In the infected cell, the viral genome is encapsidated and associated to the viral polymerase, to form the viral ribonucleoprotein (vRNP). The vRNPs are produced and assembled in cytoplasmic viral factories. The process ensuring their transport to the budding sites, at the plasma membrane, awaits to be precisely defined. Here we explored these mechanisms by tracking moving vRNPs in living infected cells. We developed an automated imaging pipeline allowing us to characterize the movements of vRNPs, at an unprecedented throughput. We then exploited the potential of our method to monitor the behaviour of the vRNPs during the infection. Using this approach, we document substantial trafficking of RSV along the microtubule network and demonstrate that RSV hijacks the recycling endosome pathway to promote the mobility of its vRNPs. Altogether, this work provides a cutting-edge approach allowing for

47 live visualization of RSV RNP trafficking and critical data toward the understanding of RSV RNPs
48 movements.

49

50 ## Introduction

51 Respiratory syncytial virus (RSV) is the leading cause of severe lower respiratory tract infection in
52 children worldwide. RSV infections are responsive for around 120 000 child death per year mostly in
53 developing countries and are the main cause of child's hospitalization in western countries (1,2).
54 Periodic reinfections occur throughout life. Considered as benign in healthy children and adults, RSV
55 infections are increasingly associated with significant morbidity and mortality in elderly and
56 immunocompromised people with much the same disease burden as for influenza (3–5). Despite the
57 high burden of RSV infection, there are still no vaccine nor curative treatment available. Search for
58 antiviral drugs is active, most of the candidates in development targeting entry steps and viral RNA
59 synthesis (6).

60 RSV belongs to the *Mononegavirales* order. Its 15 kb negative single stranded genomic RNA encode 11
61 proteins. RSV is an enveloped virus exhibiting two major surface glycoproteins G and F. The matrix
62 protein M coats the inner side of the viral membrane and surrounds the viral genomic material (7).
63 The genomic RNA is tightly encapsidated by the nucleoprotein N and forms an helicoidal
64 ribonucleocapsid. N is further bound to the polymerase (L) and its viral cofactors, the phosphoprotein
65 P and M2-1, to form the viral ribonucleoprotein (vRNP) (8–10). RNPs are the functional units driving
66 viral RNA synthesis. Using the ribonucleocapsid as a template, L and P proteins ensure both the viral
67 transcription and replication processes, while M2-1 is selectively required for the transcription process.
68 Viral RNA synthesis occurs within cytoplasmic inclusions, referred to as inclusion bodies (IBs), which
69 can be regarded as viral factories (11). The newly synthetized RNPs then reach the plasma membrane,
70 where RSV presumably buds, forming elongated membrane filaments (12–14). The matrix protein M
71 is thought to drive virion assembly by bridging RNPs with the plasma membrane through its
72 interactions with the RNPs and the cytoplasmic tail of the viral F glycoprotein (14–19). The exact
73 location of final virus assembly is debated since recent analysis of live G trafficking showed that RNP
74 assemble with membrane glycoprotein prior insertion to plasma membrane (20). In any case,
75 trafficking of RNPs to the cell surface requires active transport mechanisms, since diffusion of large
76 objects in the cytoplasm is restricted by molecular crowding by organelles, the cytoskeleton and high
77 protein concentrations (21). This active transport might involve hijacking of the actin networks (22,23)
78 or of the recycling endosome (RE) pathway. RE is involved in delivering endocytosed material as well
79 as cargos from the trans Golgi network to the plasma membrane (24). Interestingly RE pathway has
80 been implicated in RNP export of numerous viruses such as the influenza, Sendai, measles and mumps
81 viruses (25–28). The RE pathway is regulated by the small GTPase Rab11 which is present in three
82 isoforms (Rab11a, Rab11b and Rab25) in human cells. The GTP bound active form of Rab11 binds to
83 target vesicle' membrane thanks to its GPI anker and recruits specific factors ensuring transportation,

84 docking or fusion of the vesicle to its cognate membrane (29). Rab11 vesicle can traffic along both
85 microtubules and actin networks by engaging various molecular motors by means of molecular
86 adaptors called Rab11 Family Interacting Proteins (Rab11-FIPs).

87 Here we engineered recombinant RSV expressing a fluorescent N to visualize the moving RNPs in living
88 infected cells. An automatic quantitative analysis of RNPs trajectories reveals rapid and directional
89 motions that were abolished by nocodazole treatment consistent with transportation along the
90 microtubule network. We observed a colocalization of around one third of the RNPs with Rab11a and
91 RNPs moving together with Rab11a in infected cells. Inhibition of Rab11a expression impairs RNPs
92 movements. Interestingly RSV infection affects transferrin recycling, dependent of Rab11 pathway.
93 Moreover, interaction between Rab11a and viral RNPs was evidenced by co-immunoprecipitation
94 experiments. All of these data confirm that RSV is high jacking the Rab11-RE pathway to ensure RNPs
95 export.

96

97 ## Results

98 **Development of recombinant RSV to monitor intracellular transport of RNPs.**

99 To investigate RNPs dynamics in living cells, the RSV N protein was fused to a fluorescent tag to
100 generate fluorescent RNPs. We previously demonstrated that a N-ter fusion of the N doesn't affect the
101 transcription-replication activities if co-expressed with a wild type N (11). We thus engineered and
102 rescued a recombinant RSV expressing both the wild type N and a GFP-N by inserting the GFP-N coding
103 sequence flanked with transcription start and stop signals sequences between M and SH genes in our
104 reverse genetic vector (Fig S1a) (30). To ascertain whether the GFP-N would interfere with viral growth,
105 we compared single cycle growth kinetics of wild type and N-GFP expressing RSV (hereinafter referred
106 to as RSV-GFP-N) (Fig S1b). The RSV-GFP-N growth was similar to the wild type RSV and reached titers
107 around 10^6 PFU/mL in 24h, showing that the GFP-N addition did not significantly impair viral
108 multiplication. We then investigated GFP-N protein localization in respect to the wild type N protein
109 and known viral structures such as IBs and viral filaments. HEp-2 cells were infected by RSV-GFP-N for
110 24h and intracellular localization of RSV N, P and F proteins were determined by confocal imaging after
111 immunostaining of each protein. The GFP signals were recorded in parallel. As previously described,
112 IBs, cytoplasmic dots and viral filaments were observed by immunostaining of N and P, and F staining
113 only revealed viral filaments (Fig 1) (31). The GFP signals perfectly colocalize with N and P staining in
114 IBs, viral filaments and small puncta in the cytoplasm. Of particular interest, we noted a perfect
115 colocalization of GFP signals with both N and P staining in cytoplasmic dots which could be considered
116 as RNPs (Fig 1 and S1c). Moreover, we observed colocalization of the GFP signals with F staining in viral
117 filaments (Fig 1c, panel F). These data strongly suggest that GFP-N is incorporated together with the
118 wild type N in the vRNPs. Altogether, the RSV-GFP-N was considered suitable as a novel tool marker to
119 assess vRNPs trafficking across the cytoplasm during infection.

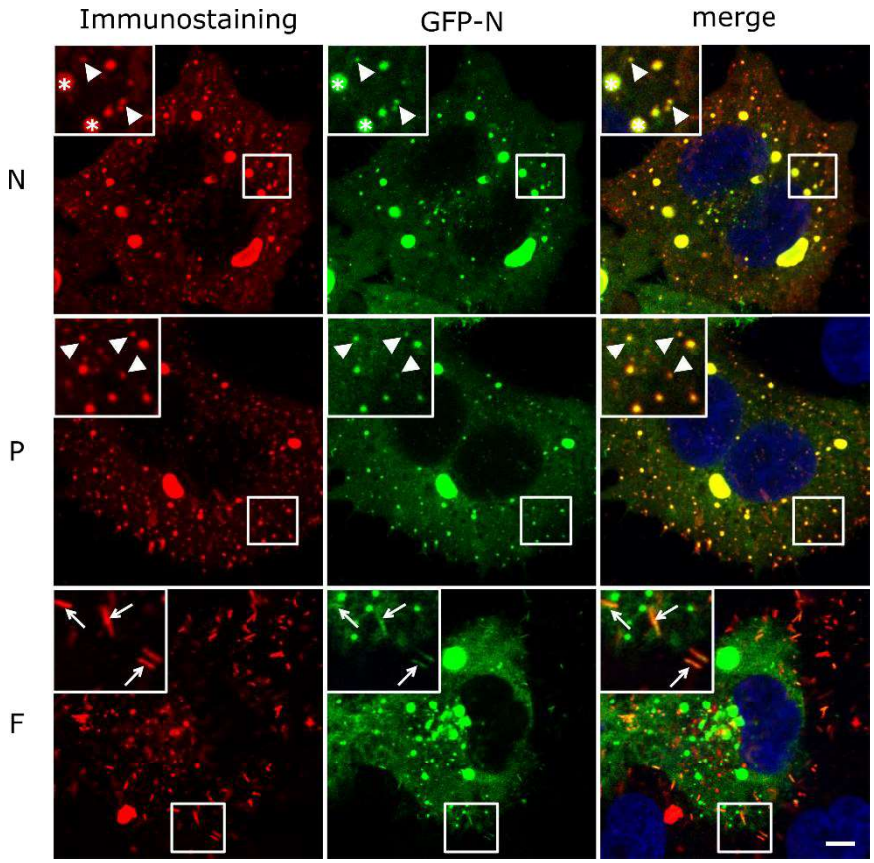


Figure 1: Localization of GFP-N and wild type N, P and F proteins in RSV-GFP-N infected cells. HEp-2 cells were infected with RSV-GFP-N. At 24h p.i. cells were stained with antibodies against N, P or F (red) and Hoechst 33342 (merge). The GFP-N protein was visualized through its spontaneous green fluorescence. IBs are indicated with a star, RNPs are indicated with white arrow heads and viral filaments are indicated with white arrows. Representative images from 2 independent experiments are shown. Images stacks (3 z-steps) were processed as maximum projections and visualized after gaussian filter fixed at 0.5. Scale bar 5 µm.

Dynamics of RNPs in RSV infected cells

To assess RNPs dynamics in living cells, we analyzed HEp-2 or A549 cells infected with RSV-GFP-N for 18-20h by video-microscopy. High-rate time-lapse images were acquired under a confocal spinning disk microscope (Supplementary Movie 1). Numerous small GFP positive dots are visible. Most dots exhibited slow motion movements with rapid and sudden changes of direction when some exhibited fast directed trajectories (white arrow head Fig 2a). Strikingly fast-moving particles appeared stretched (Fig 2a). Automatic single particle tracking of the GFP positive dots was undertaken using Imaris software (Supplementary Movie 2) and resulted in hundreds of tracks per cells (266 to 2342, mean 993 from 23 cells in 4 independent experiments). Tracks located nearby IBs were removed from analysis as slight changes of fluorescence within IBs were prone to induce false-positive signals (Fig S2a). We also filtered tracks, in which particles instant speeds always remained below 50% of their maximal instant speed along the entire track recorded to remove artifactual links between the tracks of two slow moving objects (See Fig S2b and legend).

141 We then quantified several parameters characterizing intracellular movement of vRNPs. Displacement
142 is characterized by 1) the *track length* which corresponds to the sum of lengths of displacement
143 between two time points and 2) the *track displacement*, which corresponds to the minimum distance
144 between the first and the last position of the particle (Fig 2b). *Track velocity* is the ratio between track
145 displacement and track duration. Track displacement and track velocity are thus expected to be high
146 for particles exhibiting long range-oriented motion. *Smoothed instant speed* is the ratio between the
147 minimum distance between the first and the fourth of 4 consecutive positions and the time interval
148 between these positions (see Fig S2f and corresponding legend). Focusing on instant velocities of single
149 fast-moving particles, we observed that rapid motions occur intermittently (Fig 2c). Thus, we also
150 calculated the *track maximum speed* corresponding to the maximum smooth instant speed of the
151 track. Cumulative distribution of track displacement for 6 cells in one experiment is shown in Figure
152 2e. Around 10% of the tracked particles exhibit a displacement over 1.8 µm when most of them exhibit
153 small displacement (median ranging from 0.29 to 0.42µm). Likewise, cumulative analysis of particles
154 maximal speeds shows that around 10% of the RNPs exhibit maximum velocities above 1.7µm/s (Fig
155 2d). The median value of each parameter reflects the overall characteristics of the particle's
156 movements in an individual cell and provides a single value that can be used for further comparing
157 treated groups. Median of track maximal speeds, track velocities and track displacements are not
158 significantly different in 4 independent experiments on two different cell types (HEp-2 or A549). This
159 points to a potential generalizability of vRNP's behavior during RSV infection in this model and
160 indicates that these parameters are suitable for further group comparisons (Fig 2f, 2g, 2h).

161

162

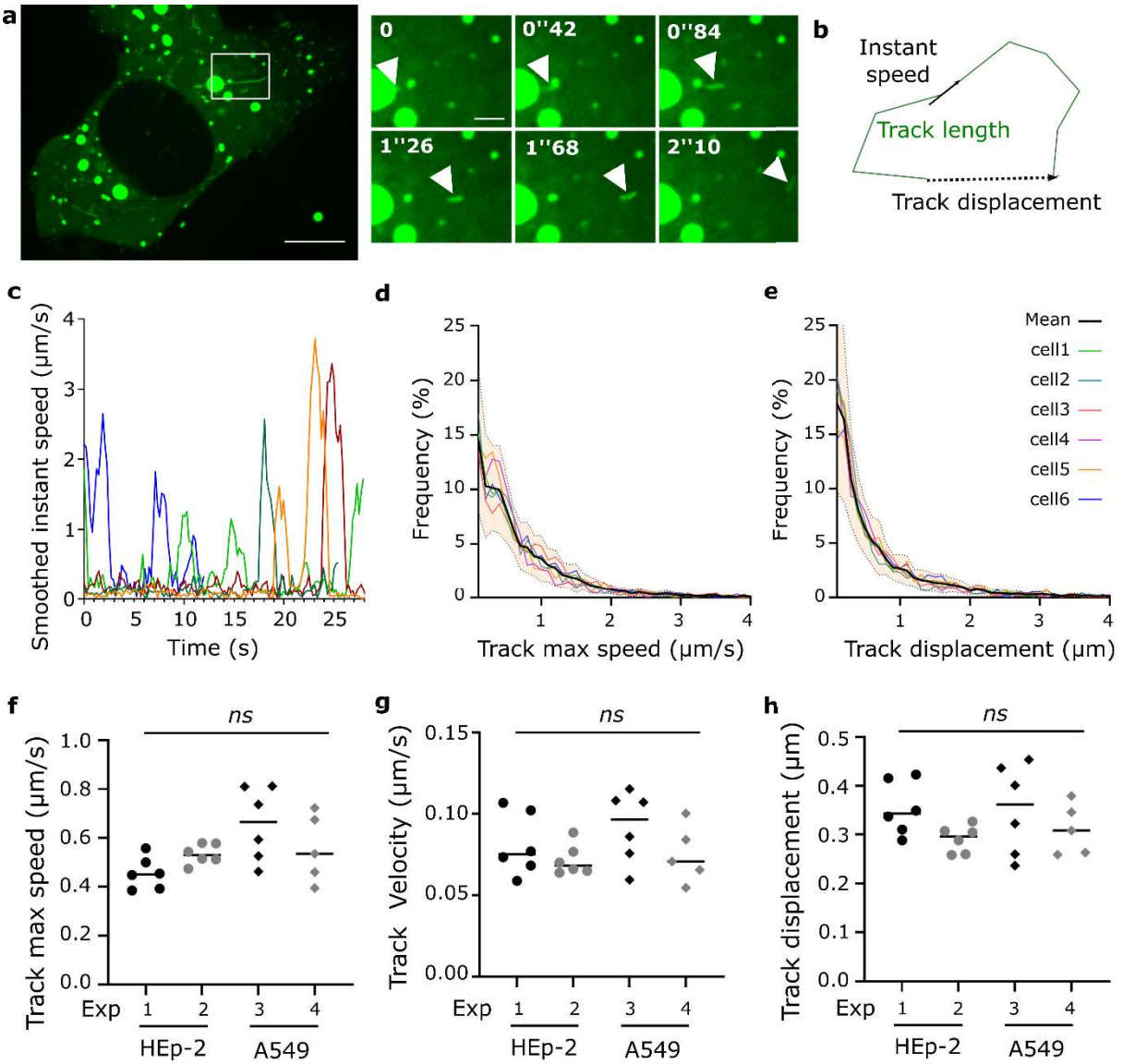


Figure 2. Characterization of RNPs intracellular motions in RSV-GFP-N infected cells. Live images of HEp-2 or A549 cells infected with RSV-GFP-N for 18 to 20h are analyzed using Imaris software as described in methods section. **a)** Dynamic behavior of RSV RNPs in HEp-2 cells. Images stacks (3 z-steps) were processed as maximum projections and visualized after gaussian filter fixed at 0.5, the large view is a time projection of 12 consecutive frames (0.21 s between frames). Scale bar 10 µm. The zoomed time series show a fast-moving RNP pointed by white arrow heads, scale bar 2 µm. Representative images from 12 movies from 2 independent experiments are shown. **b)** Schematic illustration of the motion characterization parameters (instant speed, track length, track displacement). **c)** Smoothed instant speeds of fast-moving particles plotted versus time from the first detection (each color represents one particle, representative examples). **d, e)** Cumulative distribution of track max speed and track displacement from 6 individual HEp-2 cells from one experiment. **f, g and h)** Each point is the median of track maximum speed, track velocity and track displacement from an individual cells. *ns*: No statistical difference between 4 independent experiments on HEp-2 and A549 cells using Brown-Forsythe and Welch's ANOVA test.

179

180 **RSV RNPs rapid movements are dependent on MT network**

181 Directional, rapid and discontinuous movements of the vRNPs are suggestive of microtubule (MT)-
182 dependent transport (32). We investigated vRNPs localization relative to MT in HEp-2 and A549 cells
183 infected with wild type RSV for 20h. N and MT were immunostained and cells were analysed on a super
184 resolution confocal microscope (Airyscan, Leica). High-resolution images of infected cells revealed that
185 MT were decorated with multiple vRNPs (Fig 3). To visualize the movements of vRNPs relative to MT,
186 RSV-GFP-N infected A549 cells were treated with docetaxel –AF 647, a fluorescent-linked drug binding
187 MT polymers. This enabled MT live staining and dual colored time-lapse imaging acquisition.
188 Fluorescent vRNPs moving rapidly along microtubules structures were clearly visible demonstrating
189 RNPs transport along MT network (Supplementary Movie 3 and Fig 4a). Acquisition in two color
190 channels prevented any quantitative analysis of vRNPs trajectories. To further dissect the involvement
191 of MT network in RNPs movements, we analyzed the effects of MT depolymerisation on RNPs
192 movements. Living RSV-GFP-N infected cells were imaged before and after a 10 min treatment with
193 nocodazole (20µM). Importantly, our protocol allowed to image the same cells before and after drug-
194 treatment. Remarkably, the nocodazole treatment abolished almost all the rapid and directed
195 movements (Supplementary Movies 4). In contrast, cells treated with Cytochalasin D, a drug impairing
196 actin polymerization, still displayed fast moving vRNPs (Supplementary Movies 5). Finally, we applied
197 our pipeline of GFP particles tracking on mock or nocodazole treated cells, and observed a significant
198 decrease of track displacement, track velocity and track maximum speed (Fig 4d, 4e, 4f, Supplementary
199 Movies 6 and 7). A centered projection of the tracks of one cell during 60s is shown in figure 4 to
200 illustrate the strong reduction of track displacement in nocodazole treated cells. Altogether, these data
201 revealed that fast-directed movement of RNPs rely on MT network. Consistent with the role of MT in
202 RNPs transportation, nocodazole treatment of RSV infected cells after entry steps significantly
203 decrease progeny virus production as previously reported (Fig S3) (33).

204

205

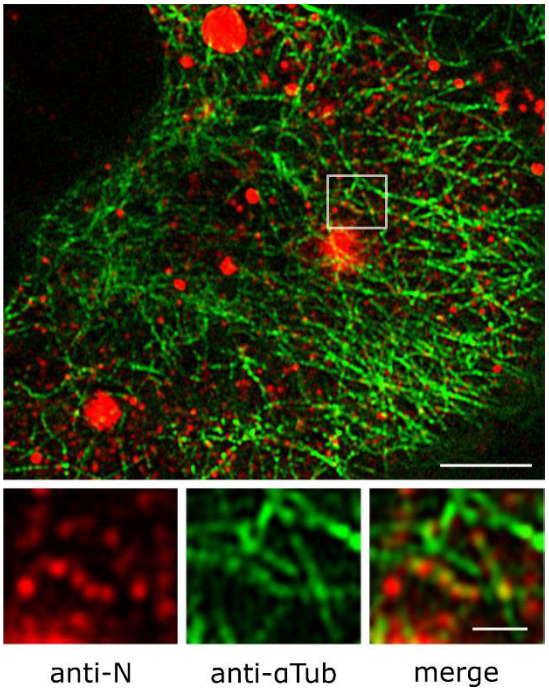


Figure 3: RNPs are decorating the MT network. A549 cells were infected with RSV for 20h. N (in red) and α-Tubulin (in green) are revealed by immunostaining. High-resolution images were generated using a confocal microscope with Airyscan detector. Images were visualized after gaussian filter fixed at 0.5. A representative image of a whole cell out of 5 cells in 3 experiments is shown. RNPs decorating the MT network are shown on the zoom area. Scale bars 5µm and 1 µm.

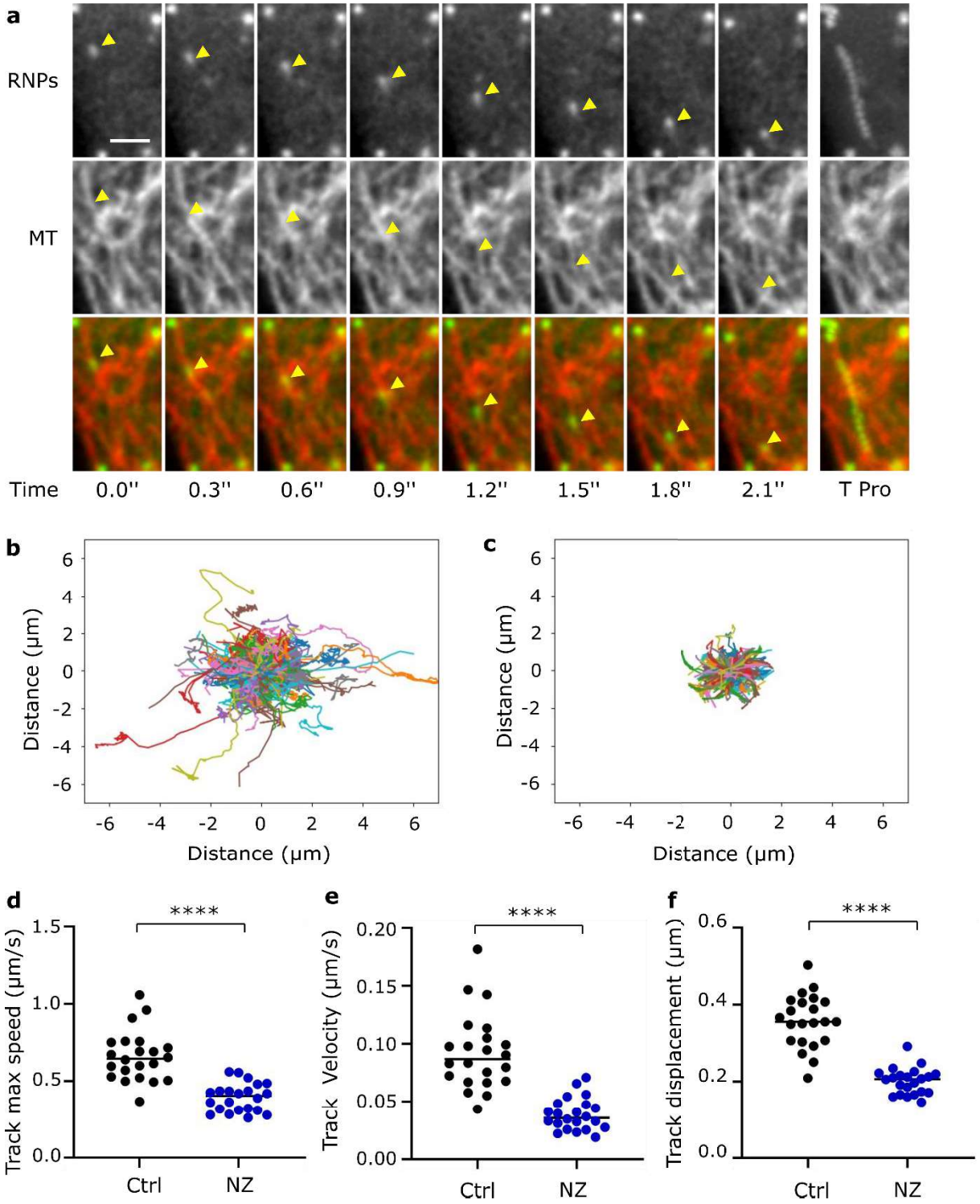
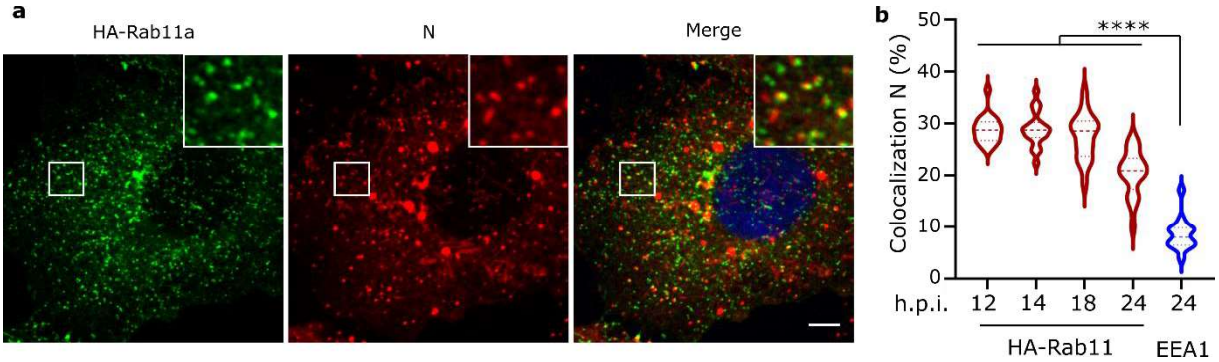


Figure 4. Fast long range RNPs motions are dependent of microtubules network. a) Time series of live images of RNPs (in green) moving along MT stained by fluorescent docetaxel-647 (in red) in RSV-GFP-N infected A549 cells. Images stacks (2 z-steps) were processed as maximum projections and visualized after gaussian filter fixed at 0.5. Yellow arrows point positions of a moving RNP. The last image shows a time projection (T Pro). Scale bar 2µm. **b to f)** RSV-GFP-N infected HEp-2 cells were treated at 17 h.p.i. with nocodazole (10µM, NZ) or DMSO (Ctrl) for 1 h before live-imaging and track analysis. **b, c)** Centered projection of the tracks of RNPs in a mock (c) or a nocodazole (d) treated cell analyzed during 60s. Representative images. **d, e, f)** Each data point represents the median of track maximum speed, track velocity and track displacement from an individual cells. **** $p < 0.0001$ using t test with Welch's correction. Data are from 22 cells (DMSO) and 23 cells (NZ) from 3 independent experiments.

224 **Rab11 and RNPs colocalize in infected cells.**

225 Recycling endosome vesicles, marked by the small GTPase Rab11, are known to be involved in RNPs
226 trafficking of several negative strand RNA viruses(25,26,28,34). To investigate the recycling endosomes
227 involvement in RSV RNPs trafficking, we analyzed Rab11a and RSV RNPs intracellular localizations. We
228 infected A549 cells constitutively expressing HA-Rab11a (A549-HA-Rab11a) with wild type RSV (35). At
229 the indicated time points, cells were fixed and N and HA-Rab11a were detected by immunostaining.
230 Both N and HA staining revealed numerous individual cytoplasmic dots corresponding respectively to
231 vRNPs and Rab11a positive endosomes, which exhibited partial colocalization (Fig 5). To quantify the
232 colocalisation between Rab11a and N positives dots, we extracted spot detections and performed
233 object-based colocalization analysis using Icy software. This method first segments the spots and then
234 analyzes their relative distribution with second order statistics enabling robust quantification of
235 colocalized objects (36). This analysis revealed that approximately 30% of N spots colocalize with
236 Rab11a positive vesicles at 12 to 18h p.i. with a slight decrease at 24h p.i.. In contrast, less than 10%
237 of N spots colocalize with EEA1, a marker of early endosomes used as a negative control. Similar results
238 were obtained in A549 and HEp-2 cells (Fig S4). These data suggest an involvement of Rab11a in vRNPs
239 traffic.

240



241
242

243 **Figure 5 : Colocalization of RNPs and Rab11a in RSV infected cells. a)** A549-HA-Rab11a cells infected with RSV
244 for 18 h. Rab11a (green) and RNPs (Red) were detected by immunostaining of HA and N. Images were visualized
245 after gaussian filter fixed at 0.5. Scale bar 5 µm. The boxed areas enclose Rab11a and N spots shown magnified.
246 **b)** Percentage of N spots colocalizing with HA-Rab11a or EEA1 positive spots calculated using Icy Software. Violin
247 plots show the median (center line) and the first and third quartiles (upper and lower hinges). Results are from
248 70 cells from 3 independent experiments. **** $p<0.0001$ using Brown-Forsythe and Welch's ANOVA test
249 followed by Dunn's test for multiple comparisons.

250

251

252 **Rab11 pathway is involved in RNPs fast and directed movements**

253 To determine if Rab11a could be involved in RNPs trafficking, we set up an experiment to visualize both
254 RNP and Rab11 movements in living infected cells. A549 and HEp-2 cells were infected with RSV-GFP-
255 N and transiently transfected with a mCherry-Rab11a expression vector. At 18-20h.p.i., we performed

256 dual color time-lapse imaging to assess the dynamic of both Rab11a and RNPs. Interestingly, we
257 observed fast-moving RNPs moving together with Rab11a positive vesicles demonstrating that at least
258 some of the fast-moving RNPs are associated with Rab11a positive structures (Fig 6a and
259 Supplementary Movie 8). Strikingly, RNPs appeared as pulled up by the Rab11 positive spots. RNPs
260 associated with Rab11 positive vesicles were no longer mobile when cells were treated with
261 nocodazole suggesting that these movements were microtubule-dependent (Supplementary Movie 9).
262 The dual color acquisition settings unfortunately prevent automatic tracking of RNPs and Rab11a in
263 this experiment.

264 To further demonstrate the essential role of Rab11 in RNPs export, we performed SiRNA depletion
265 experiments. A549 cells were transiently transfected with small interfering RNA (SiRNA) targeting
266 Rab11a or control scrambled SiRNA for 48h and subsequently infected with RSV-GFP-N for 18-20h
267 before live imaging. Western blot analysis of the whole cell lysates using an antibody against Rab11a
268 showed a considerable decrease in Rab11a levels in SiRNA targeting Rab11a treated cells compared to
269 the control (Fig. S4c). RNPs movements were quantified as described above. The track velocity, track
270 maximum velocity and track displacement were significantly reduced in Rab11a silenced cells as
271 compared to the control (Fig 6, Supplementary Movies 10 and 11). The centered projection of the
272 tracks from one cell illustrates the reduction of track displacement. These results suggest that Rab11a
273 is involved in RNPs trafficking.

274 Since our data indicate that RSV hijacks the Rab11a pathway for RNP export, we examined whether
275 RSV infection impacted in turn ER function. To this end, we explored transferrin recycling, which is
276 dependent on ER functioning. Mock or RSV infected A549 cells were incubated in the presence of
277 fluorescent transferrin and were then placed in fresh medium. Cytoplasmic fluorescence
278 (corresponding to non-recycled transferrin) was quantified after 0 and 20 min of incubation in fresh
279 medium (Fig S5). Interestingly, the infected cells exhibit an increase in transferrin recycling as
280 compared to uninfected ones suggesting an acceleration of the traffic of RE. Altogether, these data
281 suggest that RSV not only uses the recycling endosome pathway but also manipulates its functioning.

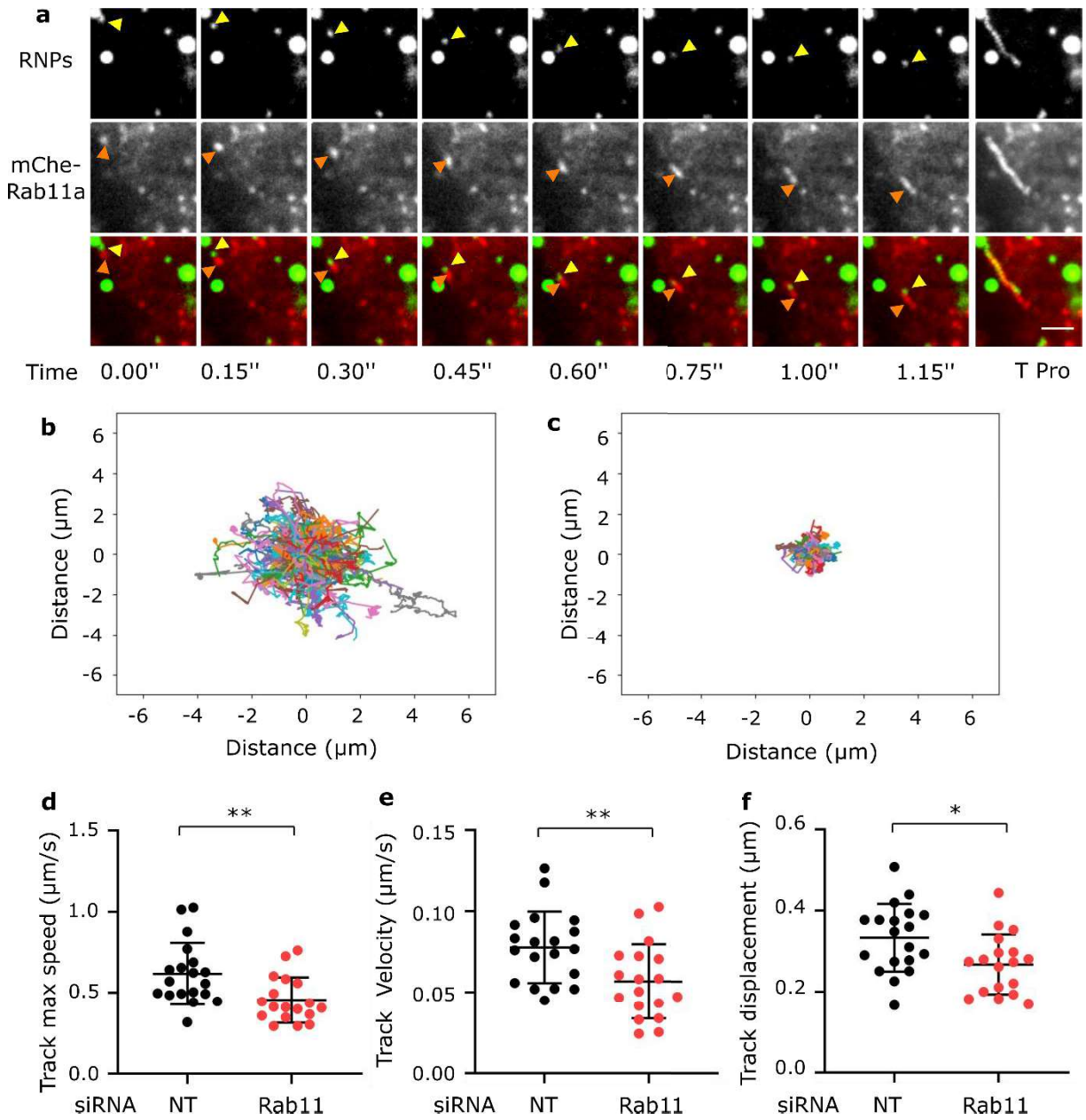
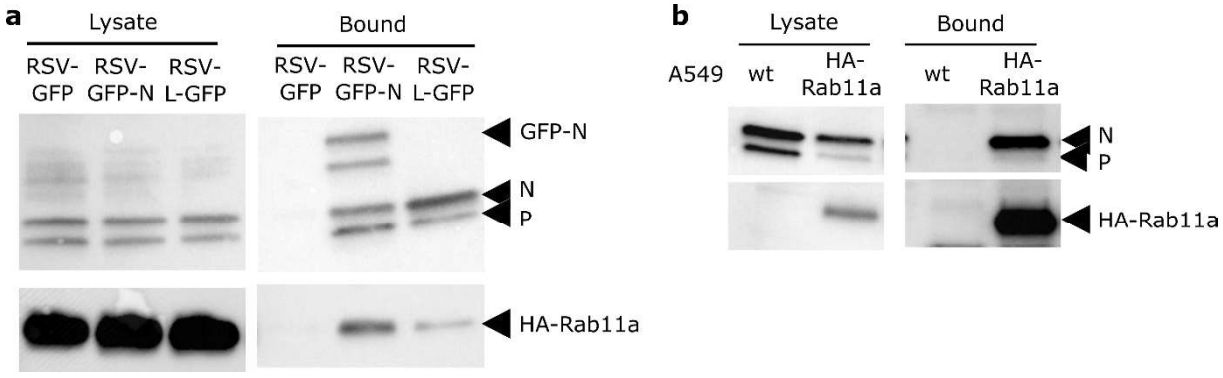


Figure 6: Rab11 is involved in fast and directed RNPs movements. a) Time series of live images of A549 cells transiently expressing mCherry-Rab11a (red) and infected for 18h with RSV-GFP-N (in green). Images were visualized after gaussian filter fixed at 0.5. Positions of a RNP moving together with a mCherry-Rab11a positive object are pointed out by yellow (RNP) and orange (Rab11a) arrow heads. The last image shows a time projection (T Pro). Scale bar 2µm. **b to f)** A549 cells were transiently transfected with siRNA targeting Rab11a or non targeting ones (NT) for 48h then infected with RSV-GFP-N for 18 h before live-imaging and track analysis. **b, c)** Centered projection of the tracks of RNPs in a NT (c) or Rab11a (d) KO cells analyzed during 60s. Representative images. **d, e and f)** Each data point represents the median of track maximum speed, track velocity and track displacement from an individual cells. ** $p < 0.01$, $p < 0.05$ using t test with Welch's correction. Data are from 19 cells (NT) and 18 cells (Rab11a) from 3 independent experiments.

295 **Biochemical validation of RNP-Rab11a association**

296 We further assessed the association between RNPs and Rab11a performing co-immunoprecipitation
297 (IP) analysis. A549 cells stably expressing HA-Rab11a were infected for 16h with RSV-GFP-N or RSV
298 expressing GFP (RSV-GFP) as a control. Cell lysates were incubated with beads coated with anti-GFP
299 antibodies and IP was carried on. Both pre-purification and IP samples were analyzed by western blot
300 to reveal N, P and HA-Rab11 (Fig 7). Wild type N and P proteins were efficiently purified together with
301 the GFP-N protein suggesting that the whole RNP is co-immunoprecipitated with GFP-N. The HA-
302 Rab11a protein was also repeatedly co-immunoprecipitated with the GFP-N when no corresponding
303 band was visible in the control. Consistent with the colocalisation and trafficking experiments, only a
304 small fraction of Rab11a was co-immunoprecipitated with the RNPs. The mirror IP was performed on
305 A549-HA-Rab11 cells infected with wild type RSV for 16h using anti-HA antibodies. N protein was found
306 in the IP fraction of Rab11HA expressing cells but not of wild type A549 cells used as control.
307 Interestingly P was also co-immunoprecipitated with HA-Rab11a suggesting that Rab11 is interacting
308 with the RNP. To further investigate this point, we performed similar IP experiments on cells infected
309 with a recombinant RSV expressing a L protein fused to GFP (RSV-L-GFP). The GFP is inserted in the
310 hinge 2 region of L (11). Western blot analysis of the IP fraction failed to reveal the GFP-L most likely
311 due to a lack of sensitivity and poor transfer of a large protein like L. However, N and P were co-
312 immunoprecipitated thus validating the IP and confirming the capture of the RNP together with the
313 GFP-L. Finally, we detected HA-Rab11a repeatedly and specifically in the IP sample consistent with an
314 interaction between Rab11a and the RNP.



315

316 **Figure 7: Co-immunoprecipitation of Rab11a and RSV RNPs in infected cells. (a)** A549 stably expressing HA-
317 Rab11a were infected with RSV-GFP, RSV-GFP-N or RSV-L-GFP as indicated for 16h, lysed and incubated with
318 beads against GFP. Cell Lysates and bound fractions were analyzed by western-blot using rabbit polyclonal anti-
319 N, anti-P and anti-HA antibodies. One representative experiment out of 3 (RSV-GFP-N) or 2 (RSV-L-GFP) is shown.
320 **(b)** A549 WT or stably expressing HA-Rab11a as indicated were infected with RSV for 16h, lysed and incubated
321 with beads against HA. Western blot analysis of the co-immunoprecipitated proteins is shown. One
322 representative experiment out of 2.

323
324

325 ## Discussion

326 The understanding of many aspects of RSV multiplication has progressed considerably in recent years.
327 However, the late stages of the viral cycle remain poorly understood. In particular, the mechanisms of
328 transport of RSV RNPs from cytoplasmic viral factories to viral assembly sites at or near the plasma
329 membrane remain unexplored. In this study we were able to observe for the first time the movement
330 of RNPs in infected cells using a recombinant RSV. Our strategy was to engineer a recombinant virus
331 expressing an N protein fused to a fluorescent tag to produce fluorescent RNPs. To our knowledge this
332 is the first description of a RSV expressing a tagged N. Expression of this additional GFP-N does not
333 deeply alter the replicative capacities of the virus. Noteworthy, fluorescent N perfectly colocalizes with
334 the wild type N in the viral structures (IBs, RNPs and viral filaments) strongly suggesting that GFP-N is
335 indeed incorporated in RSV RNPs. These data validate the use of the RSV-GFP-N as a new tool to study
336 trafficking of RSV RNPs. In theory, more than 2000 N monomers are required to encapsidate the RSV
337 15kb genomic RNA (10). Due to the transcription gradient, GFP-N is expected to be less abundant than
338 the wild-type N. Nonetheless, the oligomerization of N and GFP-N on the viral RNA leads to an
339 amplification of the fluorescent signal and allows for the detection of vRNPs. The GFP-N virus thus
340 represents a tool of choice for the monitoring of vRNPs in living cells. An alternative strategy based on
341 the labeling of the viral genome with nucleotide probes has been used to analyze the dynamics of RNPs
342 during entry or the movement of viral filaments at the cell surface. However, this method did not
343 enable RNPs trafficking analysis (12,13). vRNPs are small, highly mobile objects. To track them, we had
344 to find a compromise between the number of optical slices (z) analyzed and the time interval between
345 2 images. Our optimized pipeline relies on the acquisition of images on 2 to 3 optical planes with a
346 total thickness of 0.7 to 2.3 µm and time-frame intervals of 0.07 to 0.21s. Our experiments were
347 conducted on HEp-2 or A549 cells which are very thin as compared to some other cell types. Expanding
348 the method to other cells is likely to require further optimization. In these cells, these parameters
349 allowed a proper automatic tracking of mobile RNPs that are visible in the analyzed volume on several
350 successive images. The potential of our method allowed us to generate high-throughput live imaging
351 datasets otherwise inaccessible with more classical approaches. We were able to track hundreds of
352 particles per cell and provide a robust characterization of vRNPs movements in different conditions. A
353 large proportion of the observed vRNPs appeared immobile or animated by low amplitude "Brownian
354 movements". The resolution of our microscopy methods (around 250nm) does not allow fine
355 characterization of very low amplitude non-directional movements. In constrat, during the 60s
356 acquisitions we performed, we observed that about 10% of the vRNPs were animated by fast and
357 directional movements." These are believed to be the ones actively trafficking. The characteristics of

358 these motions, in particular the maximum speed above 1-2 µm/s are in themselves suggestive of MT-
359 related transport (32).

360 The importance of the microtubule network in RSV multiplication has already been established by
361 previous studies. Treatment of infected cells with nocodazole was shown to reduce virion production
362 by about 1 log with no indication of which stage of multiplication was disrupted (22,33). Here, our
363 results clearly establish that vRNPs are transported rapidly and over long distances on the MT network.
364 Indeed, we observed vRNPs moving on MTs and were able to verify the almost complete
365 disappearance of these movements upon disassembly of the MT network. Many negative RNA viruses
366 also hijack the MT network and its associated motors for the transport of their RNPs. For example,
367 RNPs from Influenza A , Sendai or measles viruses move along this network(25,26,37–39). As what has
368 been observed for RSV, depolymerization of the MT network does not completely abolish the
369 replication of these viruses (26,40,41). For influenza viruses, conflicting results were reported on the
370 effect of nocodazole treatment on viral multiplication (42) or on movement of vRNPs (37). These data
371 suggest that alternate pathways exist for the transport and/or spread of these viruses. It is worth
372 noting that our study, like other published studies, was performed on epithelial cell lines, and not on
373 differentiated polarized cells, which are the *in vivo* target cells of these viruses are. In such cells
374 cytoskeleton organization is different and the extent of MT dependent transportation and alternative
375 transport pathways remains to be explored.

376 Our data clearly demonstrate that the fast and long-distance transport of RSV RNPs is dependent on
377 the recycling endosome. Inhibition of Rab11a expression indeed significantly reduces the travel length
378 and the speed of vRNPs. However, vRNP transport is not completely suspended, suggesting either a
379 partial inhibition of Rab11a expression, an involvement of Rab11b and/or the existence of alternative
380 transport pathways. Direct observation of joint movements of Rab11a with vRNPs in living cells clearly
381 demonstrate the involvement of ERC in vRNPs transport. Our videos show vRNPs literally pulled by the
382 Rab11a positive structures. The immunoprecipitation experiments confirm an association between
383 vRNPs and Rab11a although not demonstrative of a direct interaction. At a given time point about 30%
384 of vRNPs are colocalized with Rab11a suggesting that the association of vRNPs with Rab11a is transient.
385 In line with this observation, only a fraction of Rab11a and vRNPs are co-immunoprecipitated and only
386 a small proportion of vRNPs are engaged in fast movement. Rab11 is able to engage motors linked to
387 either microtubule or actin networks. The movements of Rab11a-associated vRNPs we observed, are
388 fast and abolished by MT depolymerization demonstrating that they are MT dependent. Overall, our
389 data support the following model for RSV RNPs export: 1) vRNPs transiently associate with Rab11a-
390 positive vesicles 2) these Rab11a-positive vesicles transport vRNPs rapidly and over long distances
391 along the microtubule network. Moreover, RSV not only diverts the Rab11 pathway for its RNPs

392 transport but also manipulates it. Indeed, we observed that RSV infection increases transferrin
393 recycling, consistent with previous analysis of Rab11a vesicles motion that revealed increase in velocity
394 and in high distance displacement in RSV infected cells (38).

395 In recent years Rab11 has emerged as a key cellular factor involved in various stages of the
396 multiplication of several viruses. Some viruses enter the cell using the ERC as suggested by the
397 association of HHV8 or Dengue viral capsids with Rab11 endosomes soon after infection (43,44).
398 Furthermore, it has previously been shown that effectors of the Rab11 pathway: FIP1, FIP2 and
399 MyosinVb support RSV release at the apical side of the membrane. FIP2 is even thought to regulate
400 the length of viral filaments (45,46) suggesting an involvement of the ERC in the budding steps of RSV.
401 Rab11 and its partner FIP3 have also been implicated in the budding of influenza viruses (47) and recent
402 results show that the integrity of the Rab11 pathway is required for Ebola virus VP40 transfer to the
403 membrane and for VLP release (48). Subversion of Rab11 pathway for the transport of the newly
404 synthetized RNPs of negative RNA viruses to plasma membrane is extensively documented. Previous
405 studies showed that newly synthesized RNPs from Measles, Mumps, Influenza, Parainfluenza 1, Sendai
406 viruses or a new world Hantavirus are associated with Rab11 positive endosomes and that Rab11 is
407 involved in their transfer to the plasma membrane (26–28,39–41,47,49–51). However, the precise
408 mechanisms of vRNPs associations with Rab11 and the pathways involved in transport remain to be
409 defined. The numerous studies of the export of Influenza virus RNPs have shown that vRNPs
410 recruitment depends on a direct protein-protein interaction between a unit of the viral polymerase
411 complex PB2 and the active form of Rab11a, and that the Kinesin Kif13a is one of the motors involved
412 in their transport to the membrane (39,41,52). The L polymerase of Sendai virus has also been shown
413 to be involved in the recruitment of vRNPs to ERC vesicles (53). Rab11a is co-immunoprecipitated with
414 RSV L suggesting that the RSV polymerase could similarly promote Rab11a-vRNP association. However,
415 since the whole vRNP is captured in our experiments, further investigations are needed to determine
416 if L is critical for recruiting Rab11.

417 In conclusion, our results establish that RSV RNPs associated with Rab11a vesicles are transported
418 along MTs. These data are a first step forward in the understanding of vRNP export. They pave the way
419 for further work aimed at identifying the viral proteins, the Rab11 cellular partners and the molecular
420 motors involved in vRNPs transport. In the future, interactions between RSV and the ER pathway could
421 represent a new therapeutic target to block the late stages of the RSV replication cycle.

422

423 ## Methods

424 **Cells**

425 HEp-2 cells (ATCC, CCL-23) and A549 cells (ATCC, CCL-185) were maintained in Eagle's minimum
426 essential medium (MEM) and in Dulbecco modified essential medium (DMEM), respectively,
427 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) supplemented with penicillin–
428 streptomycin solution. A549 cells constitutively expressing the HA-Rab11a (WT) are a kind gift from Dr
429 N Naffakh (35) and were grown in DMEM supplemented with 1µg/mL puromycin. Cells were grown in
430 an incubator at 37 °C in 5% CO2. HEp-2 cells and A549 tested negative for mycoplasma using a
431 MycoAlert PLUS Mycoplasma Detection Kit (Lonza).

432 **Virus and plasmids**

433 All the viral sequences were derived from the human RSV strain Long, ATCC VR-26. The wild-type RSV,
434 the RSV-GFP, the RSV-GFP-N and the RSV-L-GFP were rescued by reverse genetics as previously
435 described (30,54). To construct the reverse genetic vector for RSV-GFP-N, the GFP-N coding sequence
436 was amplified from the pmGFP-N vector (11) by PCR using specific primers (sequence available upon
437 request) containing RSV gene start and gene end sequences and was cloned into a Eco105I restriction
438 site between the RSV M and SH genes in the pACNR-rHRSV (30). The nucleotide sequence of RSV-GFP-
439 N was deposited in the Genbank nucleotide database with accession code OM326756. pmCherry-
440 Rab11a was constructed by inserting the Cherry coding sequence in peGFP-Rab11a (55) (kind gift from
441 Dr Sauvonnet) between NheI and XhoI restriction sites. All constructs were verified by sequencing.
442 Experiments were performed with viral stock amplified on HEp-2 cells at 37 °C after three to five
443 passages. Plaque assay were performed at 37 °C on HEp-2 cells using Avicel overlay as previously
444 described (30).

445 **Antibodies and reagents**

446 The rabbit polyclonal anti-P and anti-N were obtained by repeated injection of purified recombinant
447 protein produced in *Escherichia coli* as previously described (56). The rabbit anti-Rab11a is from
448 Thermofisher, the rabbit anti-EEA1 and rabbit anti-HA from Cell signaling, the rat anti-HA is from
449 Roche, and the mouse anti-F was from Abcam. The mouse monoclonal anti-P 021/2P (57) is a kind gift
450 from Dr JF Eléouët. Secondary antibodies raised against mouse or rabbit IgG (H+L) and conjugated to
451 Alexa Fluor 488, 594 or 647 were from Thermofisher. Secondary antibodies raised against mouse or
452 rabbit IgG (H+L) and conjugated to horseradish peroxidase were from Promega. DMSO, Nocodazole
453 and Cytochalasin D were from Sigma. Live staining of Microtubules was achieved with SiR-tubulin Kit
454 647 as described by the manufacturer (Spirochrome).

455 **Cell infection and transfection**

456 All infections were performed at 37 °C on exponentially growing HEp-2 or A549 cells at a multiplicity
457 of infection of 1 (except indicated otherwise). For Rab11cherry and GFP-N live imaging, A549 or HEp-
458 2 cells were seeded at 90% confluence in Ibidi µ-Slide Angiogenesis (Ibidi) and were transfected with
459 0.5µg of pmCherry-Rab11a (per 0.5 10^6 cells) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the
460 manufacturer recommendations. Then cells were infected with RSV-GFP-N 1h post-transfection. SiRNA
461 transfections were performed on A549 cells newly seeded on Ibidi µ-Slide Angiogenesis. Briefly, a pool
462 of 4 different siRNA targeting the same gene Rab11a (ON-TARGETplus SMARTpool, Dharmacon) or a
463 non targeting pool was transfected simultaneously to the cell seeding, using LipoRNAiMax
464 (Thermofisher) transfection reagent. 0.3 µL of LipoRNAiMax per well (per $0.2.10^5$ cells) were used with
465 a final siRNA concentration of 10 nM. Cells were incubated at 37°C for 48h before being infected.

466 **Immunofluorescence – Colocalization analysis**

467 Cells were grown on glass coverslips in 24 wells plates. After infection at high MOI for the indicated
468 times, cells were fixed with PBS-formaldehyde 4% (v/v) for 10 min, washed with PBS and permeabilized
469 with PBS-BSA 1% (w/v)-Triton X-100 0.25% (v/v) for 10 min. Cells were incubated for 1 h in PBS-BSA 1%
470 (w/v) with the appropriate primary antibodies, rinsed with PBS then incubated for 30 min with the
471 appropriate Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies and with Hoechst 33342 (1 µg/ml).
472 Coverslips were rinsed in PBS, then mounted in ProLong diamond antifade reagent (Thermofisher).
473 Cells were examined by confocal microscopy under a WLL Leica SP8 microscope except indicated
474 otherwise. Representative pictures were taken.

475 Colocalization analysis were performed using the open-source software Icy
476 (http://icy.bioimageanalysis.org/) (58). We used Spot Detector plugin to automatically detect objects
477 corresponding to RNP and vesicles (Rab11a or EEA1) and then Colocalization Studio plugin (method:
478 object based and statistical colocalisation, SODA (36), to quantify the number of RNP at a distance less
479 than 270 nm from the cellular vesicles.

480 **Transferrin uptake quantification**

481 A549 cells starved for 30 min in serum-free medium containing 0.5 % (w/v) BSA were pulsed for 10
482 min with Tf-AF-647 (25 µg/mL, Thermofisher). Cells were then quickly incubated with cold acid buffer
483 (0,5 M Glycine, pH 2.2) to dissociate surface-bound Tf, extensively washed with PBS, and incubated at
484 37 °C in complete media for 0 or 20 min before fixation with 4 % paraformaldehyde. Cells were imaged
485 by confocal microscopy under a WLL Leica SP8 microscope. Cytoplasmic AF647 fluorescence signal was
486 quantified using the "Measure" function of imageJ/Fiji on average z-projections. Signal intensities at
487 20 min were normalized to their respective mean at 0 min.

488 **Co-Immunoprecipitation**

489 WT or HA-Rab11a expressing A549 cells infected with RSV-GFP-N, RSV-L-GFP, RSV-GFP or RSV-WT for
490 16 hours were lysed in a co-IP lysis buffer ((Tris 25mMpH 7.2; NaCl 150 mM; IGEPAL® CA-630 0.2%
491 (Sigma); glycerol 10% (v/v); EDTA 0.5mM; antiprotease and phosphatase (Thermofisher)), then
492 incubated overnight at 4 °C with GFP-Trap beads (Chromotek) or Magnetic-HA beads (Thermofisher)
493 according to the manufacturer's recommendations. Beads were rinsed three times in a co-IP dilution
494 buffer (Tris 25mM pH 7.2; NaCl 150mM), then eluted in Laemmli buffer at 95 °C and analyzed by SDS-
495 PAGE.

496 **Live Imaging**

497 Live imaging was performed on A549 or HEp-2 cells seeded on Ibidi µ-Slide Angiogenesis, infected and
498 treated as described above. One-minute time-lapse acquisitions were performed at 37°C and 5% CO_2
499 using an inverted confocal microscope with a 100x oil-immersion lens (Plan-APOCHROMAT), a CSU-
500 X1 spinning-disk head (Yokogawa, Japan) and a sCMOSPRIME 95B (Photometrics) camera. The whole
501 setup was driven with MetaMorph software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). One to three z
502 sections with a step of 0.8 µm were acquired at 70 to 210 ms intervals for 1 min. Laser intensity was
503 set between 10-20% power, and acquisition time was 50 ms. The raw data were processed using ImageJ
504 software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) to perform maximum projections of z
505 stacks images and background subtraction. Tracks analysis was performed on Imaris software 9.5.0
506 (Bitplane Inc.). Briefly fluorescent spots were identified using Imaris built-in spot generation algorithm
507 (with a seeding spot size of 250 nm). Spot generation was achieved manually for each dataset using
508 intensity at the center of each spot as the threshold. Quality threshold was fixed above 20.0. The spots
509 were tracked over time to generate motion statistics for each cell using autoregressive motion
510 algorithm (max distance 1µm, max gap size 2). Imaris output file "Position.csv" was further used to
511 calculate the characteristic of each tracks (*track duration*, *track length*, *track displacement, track*
512 *maximum speed*, *mean track velocity*) and to filter tracks using dedicated PYTHON Script available at
513 GitHub (https://github.com/mawelti/RSV-RNP-TrackAnalysis). All tracks smaller than 4 steps were
514 filtered. Coordinates of the IBs area were entered manually to remove false tracks generated by
515 frequent false detections due to high background signal in the vicinity of the IBs (see Fig S2a,b). Tracks
516 whose instant speed is always lower than 50% of the maximum instant speed were also filtered to
517 remove false link between 2 slow moving objects (See Fig S2c, d, e). *Smoothed instant speed* were
518 calculated as the ratio between the minimum distance between the first and the fourth of 4
519 consecutive positions and the time interval between these positions. We choose to smooth the instant
520 speed because time interval between 2 frames being very small (0.07 to 0.21s), displacement of 250nm
521 corresponding to position error of diffracted limited microscopy resulted in high instant speed (1.2 to

522 3.6 µm/s) (Fig S2 f). To compare the effect of treatments, statistical comparisons between median were
523 performed in Prism software (Graphpad Inc.) as indicated in legends. All tests used in this report are
524 two-sided. For visualization, the raw data were processed using ImageJ software (National Institutes
525 of Health, Bethesda, MD, USA). Images stacks were processed as maximum projections and visualized
526 after gaussian filter fixed at 0.5.

527 **Acknowledgements:** We thank Marie Galloux, Jean-Francois Eléouët, Nadia Naffakh and Cédric
528 Delevoye for sharing protocols and reagents, and for helpful discussions. We are grateful to Nathalie
529 Sauvonnet for Rab11 plasmids and helpful discussions. We thank Jennifer Risso-Ballester, Cédric Diot
530 and Sabine Blouquit-Laye for insightful discussions and critical reading of the manuscript. We thank
531 Aude Jobart-Malfait and Cymages platform for access to the Leica SP8 microscope and Olympus
532 FV3000 inverted confocal microscope, which was supported by grants from the region Ile-de-France.
533 We also acknowledge the ImagoSeine core facility of the Institut Jacques Monod and thank Xavier
534 Baudin for support for spinning disk imaging. We acknowledge support from INSERM and Versailles
535 Saint-Quentin University. This work was supported by ATIP-AVENIR INSERM program and the
536 Fondation Del Duca - Institut de France.

537

538 ## References

539 1. Group Pneumonia Etiology Research for Child Health (PERCH). Causes of severe pneumonia
540 requiring hospital admission in children without HIV infection from Africa and Asia: the PERCH
541 multi-country case-control study. Lancet (London, England). 2019/06/27. 2019
542 Aug;394(10200):757–79.

543 2. Shi T, McAllister DA, O'Brien KL, Simoes EAF, Madhi SA, Gessner BD, et al. Global, regional, and
544 national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory
545 syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. Lancet
546 (London, England). 2017 Sep;390(10098):946–58.

547 3. Asner S, Stephens D, Pedulla P, Richardson SE, Robinson J, Allen U. Risk factors and outcomes
548 for respiratory syncytial virus-related infections in immunocompromised children. Pediatr
549 Infect Dis J [Internet]. 2013;32(10):1073–6. Available from:
550 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23732222

551 4. Beigel JH, Nam HH, Adams PL, Krafft A, Ince WL, El-Kamary SS, et al. Advances in respiratory
552 virus therapeutics - A meeting report from the 6th isirv Antiviral Group conference. Antiviral
553 Res. 2019 Jul;167:45–67.

554 5. Shi T, Denouel A, Tietjen AK, Campbell I, Moran E, Li X, et al. Global disease burden estimates
555 of respiratory syncytial virus-associated acute respiratory infection in older adults in 2015: A
556 systematic review and meta-analysis. J Infect Dis. 2021;222(Xx Xxxx):S577–83.

557 6. Heylen E, Neyts J, Jochmans D. Drug candidates and model systems in respiratory syncytial virus
558 antiviral drug discovery. Biochem Pharmacol [Internet]. 2017;127:1–12. Available from:
559 http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.014

560 7. Conley MJ, Short JM, Hutchings J, Burns AM, Streetley J, Saskia E, et al. Helical Ordering of
561 Envelope Associated Proteins and Glycoproteins in Respiratory Syncytial Virus Filamentous
562 Virions. 2021;

563 8. Collins PL, Melero JA. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still
564 crazy after all these years. Virus Res [Internet]. 2011 Dec [cited 2014 Feb 18];162(1–2):80–99.
565 Available from:
566 http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3221877&tool=pmcentrez&rend
567 ertype=abstract

568 9. Noton SL, Fearns R. Initiation and regulation of paramyxovirus transcription and replication.
569 Virology [Internet]. 2015;479–480:545–54. Available from:
570 http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.01.014

571 10. Tawar RG, Duquerroy S, Vonrhein C, Varela PF, Damier-Piolle L, Castagné N, et al. Crystal
572 structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus.
573 Science [Internet]. 2009 Nov 27 [cited 2014 Feb 18];326(5957):1279–83. Available from:
574 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19965480

575 11. Rincheval V, Lelek M, Gault E, Bouillier C, Sitterlin D, Blouquit-Laye S, et al. Functional
576 organization of cytoplasmic inclusion bodies in cells infected by respiratory syncytial virus. Nat
577 Commun [Internet]. 2017 Sep;8(1):563. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-
578 00655-9

579 12. Santangelo PJ, Bao G. Dynamics of filamentous viral RNPs prior to egress. Nucleic Acids Res
580 [Internet]. 2007 Jan [cited 2014 Feb 11];35(11):3602–11. Available from:

581 http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1920244&tool=pmcentrez&rend
582 ertype=abstract

583 13. Alonas E, Lifland AW, Gudheti M, Vanover D, Jung J, Zurla C, et al. Combining single RNA
584 sensitive probes with subdiffraction-limited and live-cell imaging enables the characterization
585 of virus dynamics in cells. ACS Nano. 2014;8(1):302–15.

586 14. Kiss G, Holl JM, Williams GM, Alonas E, Vanover D, Lifland AW, et al. Structural Analysis of
587 Respiratory Syncytial Virus Reveals the Position of M2-1 between the Matrix Protein and the
588 Ribonucleoprotein Complex. J Virol [Internet]. 2014;88(13):7602–17. Available from:
589 http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00256-14

590 15. Shaikh FY, Cox RG, Lifland AW, Hotard AL, Williams J V., Moore ML, et al. A critical phenylalanine
591 residue in the respiratory syncytial virus fusion protein cytoplasmic tail mediates assembly of
592 internal viral proteins into viral filaments and particles. MBio. 2012;3(1):1–10.

593 16. Mitra R, Baviskar P, Duncan-Decocq RR, Patel D, Oomens AGP. The human respiratory syncytial
594 virus matrix protein is required for maturation of viral filaments. J Virol [Internet]. 2012 Apr
595 [cited 2014 Feb 18];86(8):4432–43. Available from:
596 http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3318654&tool=pmcentrez&rend
597 ertype=abstract

598 17. Baviskar PS, Hotard AL, Moore ML, Oomens AGP. The Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein
599 Targets to the Perimeter of Inclusion Bodies and Facilitates Filament Formation by a
600 Cytoplasmic Tail -Dependent Mechanism. J Virol [Internet]. 2013 Oct [cited 2014 Feb
601 18];87(July):10730–41. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23903836

602 18. Bajorek M, Galloux M, Richard C-A, Szekely O, Rosenzweig R, Sizun C, et al. Tetramerization of
603 Phosphoprotein is Essential for Respiratory Syncytial Virus Budding while its N Terminal Region
604 Mediates Direct Interactions with the Matrix Protein. J Virol. 2021 Jan;

605 19. Meshram CD, Oomens AGP. Identification of a human respiratory syncytial virus
606 phosphoprotein domain required for virus-like-particle formation. Virology [Internet].
607 2019;532(April):48–54. Available from: https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.04.001

608 20. Vanover D, Smith D V, Blanchard EL, Alonas E, Kirschman JL, Lifland AW, et al. RSV glycoprotein
609 and genomic RNA dynamics reveal filament assembly prior to the plasma membrane. Nat
610 Commun. 2017 Sep;8(1):667.

611 21. Luby-Phelps K. Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity,
612 diffusion, intracellular surface area. Int Rev Cytol. 2000;192:189–221.

613 22. Shaikh FY, Utley TJ, Craven RE, Rogers MC, Lapierre LA, Goldenring JR, et al. Respiratory
614 syncytial virus assembles into structured filamentous virion particles independently of host
615 cytoskeleton and related proteins. PLoS One. 2012;7(7):e40826.

616 23. Jeffree CE, Brown G, Aitken J, Su-Yin DY, Tan BH, Sugrue RJ. Ultrastructural analysis of the
617 interaction between F-actin and respiratory syncytial virus during virus assembly. Virology
618 [Internet]. 2007 Dec 20 [cited 2014 Feb 18];369(2):309–23. Available from:
619 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17825340

620 24. Horgan CP, McCaffrey MW. The dynamic Rab11-FIPs. Biochem Soc Trans. 2009;37(5):1032–6.

621 25. Nakatsu Y, Ma X, Seki F, Suzuki T, Iwasaki M, Yanagi Y, et al. Intracellular transport of the
622 measles virus ribonucleoprotein complex is mediated by Rab11A-positive recycling endosomes
623 and drives virus release from the apical membrane of polarized epithelial cells. J Virol [Internet].

624 2013;87(8):4683–93. Available from:
625 http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3624359&tool=pmcentrez&rend
626 ertype=abstract

627 26. Chambers R, Takimoto T. Trafficking of sendai virus nucleocapsids is mediated by intracellular
628 vesicles. PLoS One [Internet]. 2010 Jan [cited 2014 Feb 15];5(6):e10994. Available from:
629 http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2881874&tool=pmcentrez&rend
630 ertype=abstract

631 27. Katoh H, Nakatsu Y, Kubota T, Sakata M, Takeda M, Kidokoro M. Mumps Virus Is Released from
632 the Apical Surface of Polarized Epithelial Cells, and the Release Is Facilitated by a Rab11-
633 Mediated Transport System. J Virol. 2015;89(23):12026–34.

634 28. Avilov S V., Moisy D, Naffakh N, Cusack S. Influenza A virus progeny vRNP trafficking in live
635 infected cells studied with the virus-encoded fluorescently tagged PB2 protein. Vaccine
636 [Internet]. 2012;30(51):7411–7. Available from:
637 http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.09.077

638 29. Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009
639 Aug;10(8):513–25.

640 30. Rameix-Welti M-A, Le Goffic R, Hervé P-L, Sourimant J, Rémot A, Riffault S, et al. Visualizing the
641 replication of respiratory syncytial virus in cells and in living mice. Nat Commun [Internet]. 2014
642 Jan [cited 2015 Jan 31];5:5104. Available from:
643 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25277263

644 31. Lifland AW, Jung J, Alonas E, Zurla C, Crowe JE, Santangelo PJ. Human Respiratory Syncytial Virus
645 Nucleoprotein and Inclusion Bodies Antagonize the Innate Immune Response Mediated by
646 MDA5 and MAVS. J Virol. 2012;

647 32. Greber UF, Way M. A superhighway to virus infection. Cell. 2006 Feb;124(4):741–54.

648 33. Kallewaard NL, Bowen AL, Crowe JE. Cooperativity of actin and microtubule elements during
649 replication of respiratory syncytial virus. Virology [Internet]. 2005 Jan 5 [cited 2014 Feb
650 18];331(1):73–81. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15582654

651 34. Katoh H, Nakatsu Y, Kubota T, Sakata M, Takeda M, Kidokoro M. Mumps Virus Is Released from
652 the Apical Surface of Polarized Epithelial Cells, and the Release Is Facilitated by a Rab11-
653 Mediated Transport System. J Virol. 2015;89(23):12026–34.

654 35. De Castro Martin IF, Fournier G, Sachse M, Pizarro-Cerda J, Risco C, Naffakh N. Influenza virus
655 genome reaches the plasma membrane via a modified endoplasmic reticulum and Rab11-
656 dependent vesicles. Nat Commun [Internet]. 2017;8(1). Available from:
657 http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-01557-6

658 36. Lagache T, Grassart A, Dallongeville S, Faklaris O, Sauvonnet N, Dufour A, et al. Mapping
659 molecular assemblies with fluorescence microscopy and object-based spatial statistics. Nat
660 Commun [Internet]. 2018;9(1):102–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-
661 03053-x

662 37. Avilov S V, Moisy D, Munier S, Schraidt O, Naffakh N, Cusack S. Replication-competent influenza
663 A virus that encodes a split-green fluorescent protein-tagged PB2 polymerase subunit allows
664 live-cell imaging of the virus life cycle. J Virol [Internet]. 2012 Feb [cited 2014 Feb
665 18];86(3):1433–48. Available from:
666 http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3264389&tool=pmcentrez&rend
667 ertype=abstract

668 38. Bhagwat AR, Le Sage V, Nturibi E, Kulej K, Jones J, Guo M, et al. Quantitative live cell imaging
669 reveals influenza virus manipulation of Rab11A transport through reduced dynein association.
670 Nat Commun [Internet]. 2020;11(1):1–14. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41467-
671 019-13838-3

672 39. Momose F, Sekimoto T, Ohkura T, Jo S, Kawaguchi A, Nagata K, et al. Apical Transport of
673 Influenza A Virus Ribonucleoprotein Requires Rab11-positive Recycling Endosome. PLoS One
674 [Internet]. 2011;6(6):e21123. Available from:
675 http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0021123

676 40. Nakatsu Y, Ma X, Seki F, Suzuki T, Iwasaki M, Yanagi Y, et al. Intracellular Transport of the
677 Measles Virus Ribonucleoprotein Complex Is Mediated by Rab11A-Positive Recycling
678 Endosomes and Drives Virus Release from the Apical Membrane of Polarized Epithelial Cells. J
679 Virol. 2013;87(8):4683–93.

680 41. Amorim MJ, Bruce EA, Read EKC, Foeglein A, Mahen R, Stuart AD, et al. A Rab11- and
681 microtubule-dependent mechanism for cytoplasmic transport of influenza A virus viral RNA. J
682 Virol [Internet]. 2011;85(9):4143–56. Available from:
683 http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3126276&tool=pmcentrez&rend
684 ertype=abstract

685 42. Nturibi E, Bhagwat AR, Coburn S, Myerburg MM, Lakdawala SS. Intracellular Colocalization of
686 Influenza Viral RNA and Rab11A Is Dependent upon Microtubule Filaments. J Virol.
687 2017;91(19):1–20.

688 43. Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. Differential requirements in endocytic trafficking for
689 penetration of dengue virus. PLoS One. 2012;7(9):e44835.

690 44. Greene W, Gao S-J. Actin dynamics regulate multiple endosomal steps during Kaposi's sarcoma-
691 associated herpesvirus entry and trafficking in endothelial cells. PLoS Pathog. 2009
692 Jul;5(7):e1000512.

693 45. Brock SC, Goldenring JR, Crowe JE. Apical recycling systems regulate directional budding of
694 respiratory syncytial virus from polarized epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A.
695 2003;100(25):15143–8.

696 46. Utley TJ, Ducharme N a, Varthakavi V, Shepherd BE, Santangelo PJ, Lindquist ME, et al.
697 Respiratory syncytial virus uses a Vps4-independent budding mechanism controlled by Rab11-
698 FIP2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(29):10209–14.

699 47. Bruce EA, Digard P, Stuart AD. The Rab11 Pathway Is Required for Influenza A Virus Budding
700 and Filament Formation. J Virol. 2010;84(12):5848–59.

701 48. Nanbo A, Ohba Y. Budding of Ebola Virus Particles Requires the Rab11-Dependent Endocytic
702 Recycling Pathway. J Infect Dis. 2018;218(Suppl 5):S388–96.

703 49. Stone R, Hayashi T, Bajimaya S, Hodges E, Takimoto T. Critical role of Rab11a-mediated recycling
704 endosomes in the assembly of type I parainfluenza viruses. Virology [Internet]. 2016;487:11–8.
705 Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.10.008

706 50. Eisfeld AJ, Kawakami E, Watanabe T, Neumann G, Kawaoka Y. RAB11A is essential for transport
707 of the influenza virus genome to the plasma membrane. J Virol [Internet]. 2011;85(13):6117–
708 26. Available from:
709 http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3126513&tool=pmcentrez&rend
710 ertype=abstract

711 51. Rowe RK, Suszko JW, Pekosz A. Roles for the recycling endosome, Rab8, and Rab11 in hantavirus
712 release from epithelial cells. Virology [Internet]. 2008;382(2):239–49. Available from:
713 http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2008.09.021

714 52. Ramos-Nascimento A, Kellen B, Ferreira F, Alenquer M, Vale-Costa S, Raposo G, et al. KIF13A
715 mediates trafficking of influenza Avirus ribonucleoproteins. J Cell Sci. 2017;130(23):4038–50.

716 53. Genoyer E, Kulej K, Hung CT, Thibault PA, Azarm K, Takimoto T, et al. The viral polymerase
717 complex mediates the interaction of viral ribonucleoprotein complexes with recycling
718 endosomes during sendai virus assembly. MBio. 2020;11(4):1–20.

719 54. Bouillier C, Rincheval V, Sitterlin D, Blouquit-Laye S, Desquesnes A, Eléouët J-F, et al.
720 Generation, Amplification, and Titration of Recombinant Respiratory Syncytial Viruses. J Vis Exp.
721 2019 Apr;(146):e59218.

722 55. Mounier J, Boncompain G, Senerovic L, Lagache T, Chrétien F, Perez F, et al. Shigella effector
723 IpaB-induced cholesterol relocation disrupts the Golgi complex and recycling network to inhibit
724 host cell secretion. Cell Host Microbe. 2012 Sep;12(3):381–9.

725 56. Castagne N. Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus P-P and P-N protein
726 complexes and localization of the P protein oligomerization domain. J Gen Virol [Internet]. 2004
727 Jun 1 [cited 2014 Feb 18];85(6):1643–53. Available from:
728 http://vir.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/vir.0.79830-0

729 57. Garcia J, Garcia-Barreno B, Vivo A, Melero JA. Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial
730 virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the
731 nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein. Virology. 1993 Jul;Jul;195(1)(1):243–
732 7.

733 58. de Chaumont F, Dallongeville S, Chenouard N, Hervé N, Pop S, Provoost T, et al. Icy: an open
734 bioimage informatics platform for extended reproducible research. Nat Methods. 2012
735 Jun;9(7):690–6.

736

Article 2

Lors de mon arrivé dans le laboratoire, j'ai pu aider une doctorante en fin de thèse Camille Bouillier sur certaines des expériences à réaliser pour la publication de l'article. (Bouillier, Cosentino, et al. 2019)

Son projet portait sur la protéine de transcription M2-1 du RSV et de ses interacteurs cellulaires. En effet, la protéine M2-1 est essentielle pour la procession de la polymérase et la transcription des protéines virales. Au cours de ses recherches, elle a révélé une interaction avec la protéine cellulaire poly-A binding protein 1 (PABPC1). PABPC1 possède un rôle dans la traduction et stabilisation des ARNm.

Mon rôle a été la mise au point de la microscopie en temps réel des comouvements et colocalisation des protéines M2-1-GFP et PABPC1-mCherry dans les IBags. Les expériences de de Proximity Ligation Assay, que j'ai réalisé ont permis, de révéler que l'interaction entre ses deux protéines persistait après libération des ARNm viraux dans le cytoplasme. De plus, au cours des expériences de révision d'article, j'ai réalisé des coimmunoprécipitation qui ont permis de révéler que l'ARNm n'était pas l'élément qui permettait l'interaction entre M2-1 et PABPC1 et que l'interaction entre ses deux protéines semblaient être directe.

The Interactome analysis of the Respiratory Syncytial Virus protein M2-1 suggests a new role in viral mRNA metabolism post-transcription-2019

Camille Bouillier, Gina Cosentino, Thibaut Léger, Vincent Rincheval, Charles-Adrien Richard, Aurore Desquesnes, Delphine Sitterlin, Sabine Blouquit-Laye, Jean-Francois Eléouët, Elyanne Gault, and Marie-Anne Rameix-Welti

SCIENTIFIC REPORTS
natureresearch

OPEN

The Interactome analysis of the Respiratory Syncytial Virus protein M2-1 suggests a new role in viral mRNA metabolism post-transcription

Camille Bouillier[1], Gina Cosentino[1], Thibaut Léger[2], Vincent Rincheval[1], Charles-Adrien Richard[3], Aurore Desquesnes[1], Delphine Sitterlin[1], Sabine Blouquit-Laye[1], Jean-Francois Eléouët[3], Elyanne Gault[1,4] & Marie-Anne Rameix-Welti[1,4*]

Human respiratory syncytial virus (RSV) is a globally prevalent negative-stranded RNA virus, which can cause life-threatening respiratory infections in young children, elderly people and immunocompromised patients. Its transcription termination factor M2-1 plays an essential role in viral transcription, but the mechanisms underpinning its function are still unclear. We investigated the cellular interactome of M2-1 using green fluorescent protein (GFP)-trap immunoprecipitation on RSV infected cells coupled with mass spectrometry analysis. We identified 137 potential cellular partners of M2-1, among which many proteins associated with mRNA metabolism, and particularly mRNA maturation, translation and stabilization. Among these, the cytoplasmic polyA-binding protein 1 (PABPC1), a candidate with a major role in both translation and mRNA stabilization, was confirmed to interact with M2-1 using protein complementation assay and specific immunoprecipitation. PABPC1 was also shown to colocalize with M2-1 from its accumulation in inclusion bodies associated granules (IBAGs) to its liberation in the cytoplasm. Altogether, these results strongly suggest that M2-1 interacts with viral mRNA and mRNA metabolism factors from transcription to translation, and imply that M2-1 may have an additional role in the fate of viral mRNA downstream of transcription.

Human respiratory syncytial virus (RSV) is the most common cause of respiratory infection in neonates and infants worldwide. Globally, RSV is estimated to cause 33 million cases of acute respiratory illness in children under 5 years of age, resulting in 3.2 million hospital admissions and 118 200 child deaths a year, mostly in developing countries[1]. Moreover, RSV infections in adults are increasingly associated with substantial morbidity and mortality in the elderly or at risk population, such as asthmatic and immunocompromised patients[2].

RSV belongs to the *pneumoviridae* family of the *Mononegavirales* order[3]. Its genome consists of a single-strand negative-sense RNA tightly encapsidated by the nucleoprotein N[4]. Viral transcription and replication occur in the cytoplasm of infected cells, in virally induced cytoplasmic inclusions called inclusion bodies (IBs)[5–7]. Replication is achieved by the viral RNA dependent RNA polymerase L and its cofactor the phosphoprotein P[8]. Viral transcription requires an additional viral protein, M2-1[9]. The complex formed by L, P and M2-1 proceeds to the sequential transcription of RSV genes by a start and stop mechanism, producing capped and polyadenylated viral mRNAs[8].

M2-1 ensures the polymerase processivity both intra- and inter-genically, preventing the synthesis of shortened mRNA and enabling transcription of downstream genes[9–11]. M2-1 is composed of four 194 amino acid chains forming a stable homo-tetrameric protein[12,13]. Each M2-1 monomer encompasses a zinc finger domain (aa 7–25) at the N terminal extremity, an α helical oligomerization domain (aa 32–49) and a large globular core

[1]UMR1173 INSERM, Université Paris-Saclay - UVSQ, Montigny-le-Bretonneux, France. [2]UMR7592 CNRS, Institut Jacques Monod, Université Paris Diderot, Paris, France. [3]UR892 INRA, Unité de virologie et immunologie moléculaires, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France. [4]AP-HP, Hôpital Ambroise Paré, Laboratoire de Microbiologie, Boulogne-Billancourt, France. *email: marie-anne.rameix-welti@uvsq.fr

domain. M2-1 interacts with the P protein and with RNA, preferentially binding to polyA rich sequences[13,14]. Both the P and RNA binding domain have been mapped: they partially overlap on the globular core domain of M2-1. It has been proposed that M2-1 associates with the polymerase complex through P interaction and then binds to the nascent viral mRNA thus dissociating from the P protein[15]. Consistent with this model, M2-1 and newly synthetized viral mRNA are concentrated together into IBs associated granules (IBAGs) shortly after transcription and are later released in the cytosol[7]. Moreover, M2-1 interaction with P enables its recruitment to RSV inclusion bodies[14]. M2-1 – P interaction also brings the phosphatase PP1 in contact with M2-1, ensuring cyclic phosphorylation and dephosphorylation of M2-1, which is needed for efficient transcription[16,17]. M2-1 was also suggested to be involved in RSV assembly by interacting with the matrix protein M[18]. This is however controversial since other reports showed that M2-1 is not required for virus-like particles (VLP) formation[19,20]. Identification of cellular proteins interacting with M2-1 could help to grasp more precisely its function, but to date no cellular partners of M2-1 have been identified.

Here, we identified potential M2-1 binding partners using affinity purified co-complexes mass spectrometry analysis on RSV infected cells. This relies on the use of a recombinant virus expressing a M2-1 protein fused to GFP[7]. Most of the candidates identified are proteins involved in mRNA metabolism, in particular mRNA maturation, stabilization and translation. We then further investigated the interaction of M2-1 and one potential M2-1 binding partner, the polyA-binding protein cytoplasmic 1 (PABPC1), a key regulator of mRNA translation and stability. In RSV infected cells, confocal microscopy analysis highlighted the co-localization of PABPC1 and M2-1 both in IBAGs and in the cytoplasm. Within IBAGs, PABPC1 exhibited the same dynamic behavior as M2-1, suggesting that both proteins remain associated with viral mRNA after its release from the IBAGs.

Results

Identification of potential cellular partners of M2-1. We sought to gain insight into interactions between M2-1 and cellular proteins within infected cells. To do so, co-immunoprecipitations (IPs) of M2-1 via a GFP tag were coupled with quantitative proteomics to identify cellular proteins selectively precipitated with M2-1-GFP. We produced a recombinant RSV expressing both wild type M2-1 and M2-1 fused to GFP (RSV-M2-1-GFP[7]) and a recombinant RSV expressing free GFP (RSV-GFP). In the RSV-GFP genome, the GFP protein is inserted at the same position as the Cherry or Luc proteins of the RSV-Cherry and RSV-Luc recombinant viruses previously described[21]. HEp-2 cells were infected with these viruses in parallel at high multiplicity of infection (MOI). At 14 h post-infection (p.i) cells were lysed in the presence of RNAse A and a highly specific GFP-Trap was used to selectively precipitate the M2-1-GFP protein or the GFP protein and their interacting partners. The effectiveness of the RNAse A treatment was assessed by RT-qPCR on household gene transcripts (see Supplementary Table S1). To provide a statistically robust data set, IPs with M2-1-GFP or GFP were performed in six independent experiments. The proteins in the bound fractions were identified by Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The LC-MS/MS data were analyzed using the Mascot software search engine (Matrix Science), using only peptides with a False Discovery Rate inferior to 1% (i.e with less than 1% risk of an incorrect match between MS/MS data and peptide). Each protein was given a Mascot score based on the quality of its identification. Additionally, label free quantification was performed on proteins with at least two unique peptides. The specificity of each protein's interaction with M2-1 was estimated by its fold change, i.e. the ratio of its abundance in the RSV-M2-1-GFP sample compared to its abundance in the RSV-GFP control. Proteins binding non-specifically to beads or to GFP would thus have a fold change of 1, and a greater fold change would indicate greater specificity. Each protein's fold change was calculated across the 6 independent experiments thanks to a Limma t-test (with eBayes procedure) (Fig. 1). We found 137 proteins with a fold change superior to 2 with a p-value inferior to 0.05, which were selected as potential M2-1 binding partners. They are listed in the Supplementary Table S2. Among known partners of M2-1, the viral protein P was found, but not the viral protein M. Surprisingly ribosomal mitochondrial proteins were over represented (45 out of 137). This may be consistent with the detection of M2-1 in the mitochondrial fraction of infected cells[22]. A gene set enrichment analysis using the BiNGO software[23] was realized to determine Gene Ontology (GO) terms related to biological processes over-represented in our selection (see detailed results in Supplementary Table S3). P-values of enrichment were determined by an hypergeometric test (alpha = 0.01) with a Benjamini & Hochberg correction. These functional groups are represented in Fig. 2 (and in Supplementary Fig. S1 with a higher resolution) as circles, organized from the most general functions at the bottom to the more specific at the top and linked by arrows according to the inclusion relations between them. Colored circles show the GO terms with statistically significant enrichment in our analysis, with the darkest colors indicating the smallest associated p-values. These colored circles are mainly gathered in two areas in the upper portion of the graph: one with GO terms related to translation, and the other with GO terms related to RNA metabolism and especially mRNA metabolism. All other GO terms showing significant enrichment are either very generic, and thus not very informative, or very small functional groups with a p-value barely under 0.05. Among the 137 potential M2-1 binding partners identified, 47(33.6%) were involved in translation (Fig. 3). However, 31 of them were mitochondrial ribosomal proteins, whose role in general translation should not be considered. To address this concern, we performed the enrichment analysis again, this time excluding all mitochondrial ribosomal proteins. Results are shown in the Supplementary Table S4 and Supplementary Fig. S2. The GO term "translation elongation" still appears as a significantly over-represented biological process ($p = 1{,}36.10^{-3}$), but translation doesn't appear anymore as one of the main over-represented functional groups. 39 proteins out of 137 (27.9%) potential M2-1 binding partners were proteins involved in RNA metabolism. Among these, most proteins were associated more specifically with mRNA, with the mRNA metabolic process GO term found for 23 candidates (16.4%). More precisely, the RNA splicing and mRNA stabilization subsets were over-represented, with 21 proteins (15.0%) and 6 proteins (4.3%) respectively. Interestingly, four of the five proteins of the CRD-mediated complex, which stabilizes mRNA containing the coding region instability determinant (CRD), were identified in our selection.

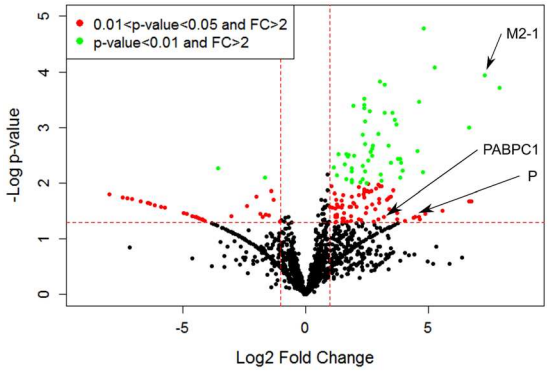


Figure 1. Analysis via quantitative label-free proteomics of cellular proteins associated with the viral protein M2-1-GFP during RSV infection. Co-immunoprecipitations with GFP nanobodies were realized in HEp-2 cells infected with RSV-M2-1-GFP or RSV-GFP (control). Control and experimental samples from 6 independent experiments were then analyzed by label-free quantitative proteomics processed by LC-MS/MS. P-values were computed on protein ratios with R Studio software with the R/Bioconductor software package Limma (with eBayes procedure). All proteins identified are displayed according to their fold change (FC) (x axis: log2 (FC)) as well as its statistical significance (y axis; −log10 (p-value)). Dashed red lines show chosen cutoffs: fold change = 2 [log 2 (FC) = 1] and p-value = 0.05 [log10(p-value) = 1.3]. Points highlighted in red had a fold change of more than 2 and a p-value between 0.05 and 0.01. Points highlighted in green had a fold change of more than 2 and a p-value of less than 0.01. Viral proteins M2-1 and P and cellular protein PABPC1 are highlighted with arrows.

The involvement of PABPC1 in RSV infection. One of the identified potential M2-1 binding partners, the cytoplasmic polyA-binding protein 1 (PABPC1) is a protein with key roles in both translation and mRNA stabilization. PABPC1 had previously been described as co-localizing with M2-1 within IBAGs[7]. We thus chose to focus on this protein in later studies. First, siRNA depletion experiments were performed to assess the role of PABPC1 in RSV multiplication. A549 cells were transfected with small interfering RNA (siRNA) targeting PABPC1 or control scrambled siRNA for 48 h and subsequently infected with a recombinant RSV carrying RSV-Cherry[21] at a low multiplicity of inflection (M.O.I). The Cherry fluorescence was measured at 0, 24 and 48 h post-infection (p.i) to assess viral multiplication[21] and whole cell lysates were collected. Cell viability was assessed as described in Material and Methods section. PABPC1 siRNA exhibited no cytotoxicity compared to control siRNA in these conditions and led to a decrease in PABPC1 mRNA over 80% but not to total knock-out of the protein (see Supplementary Figs S3 and S4). Consistent with this result, western blot analysis of whole cell lysates using an antibody directed against PABPC1 showed a considerable reduction in PABPC1 protein levels in cells treated with anti-PABPC1 siRNA compared with control (Fig. 4a, Supplementary Fig. S4). In contrast, cellular protein levels, observed by Stain-Free UV imaging as described in the Methods section, remained unchanged, consistent with the cell viability results. The cherry fluorescence signal in PABPC1 silenced cells was significantly reduced compared to control, with a p-value of 7.3×10^{-3} at 24 h p.i and 2.5×10^{-6} at 48 h p.i (Fig. 4b). Likewise, probing cell lysates with anti-N and M antibodies revealed a decrease of the levels of these two viral proteins in cells treated with PABPC1 siRNA compared with control at 24 and 48 h p.i (Fig. 4a, Supplementary Fig. S4). To test whether this lower infection efficiency was linked to a reduced production of virions, viruses from both control and PABPC1 siRNA treated cells were harvested at 48 h p.i and subjected to a plaque titration assay. As can be seen in Fig. 4c, the number of plaque-forming units produced dropped by 50% in cells treated by PABPC1 siRNA indicating a small but significant slowdown of viral production consistent with previous results. Together these results show that presence of PABPC1 in infected cells is required for optimal viral multiplication.

PABPC1 interacts with M2-1 regardless of the presence of other viral proteins. We endeavored to validate and further characterize the PABPC1 – M2-1 interaction. As in the proteomics experiments, both RSV M2-1-GFP and RSV-GFP (control) infected HEp-2 cells were lysed and subjected to co-IP with GFP antibody. Both pre-purification cell lysates and IP samples were analyzed by western blot to reveal M2-1, PABPC1 and GFP (Fig. 5a, Supplementary Fig. S5). PABPC1 was found in the bound fraction of the M2-1-GFP sample but not of the free GFP sample (or in trace amounts) validating the interactome results (Fig. 5a). Both the phosphorylated (upper band) and the unphosphorylated (lower band) wild type M2-1 were also specifically co-immunoprecipitated with M2-1-GFP, consistent with the oligomerization of M2-1 with M2-1-GFP.

M2-1 and PABPC1 are both RNA-binding proteins[12,24]. To analyze the role of RNA in the mediation of the interaction between M2-1 and PABPC1, the co-IP experiments were performed in the presence or absence of RNAse (either RNAse A or broad spectrum nuclease). In the bound fraction, a stronger signal for PABPC1 was observed in the absence of RNAse than with RNAse treatment (Fig. 5a). Despite the non-linear nature of luminescent signals, we attempted relative quantification of these bands to obtain a very rough estimate of the amount of PABPC1 captured, in percentage of total PABPC1 in the input. 5.71% (SD: 2.94) of total PABPC1 was co-immunoprecipitated with M2-1 in absence of RNAse, against 2.08% (SD: 0.89) in presence of RNAse (see Supplementary Fig. S6). Taken together these results indicate that binding between M2-1 and PABPC1 does not

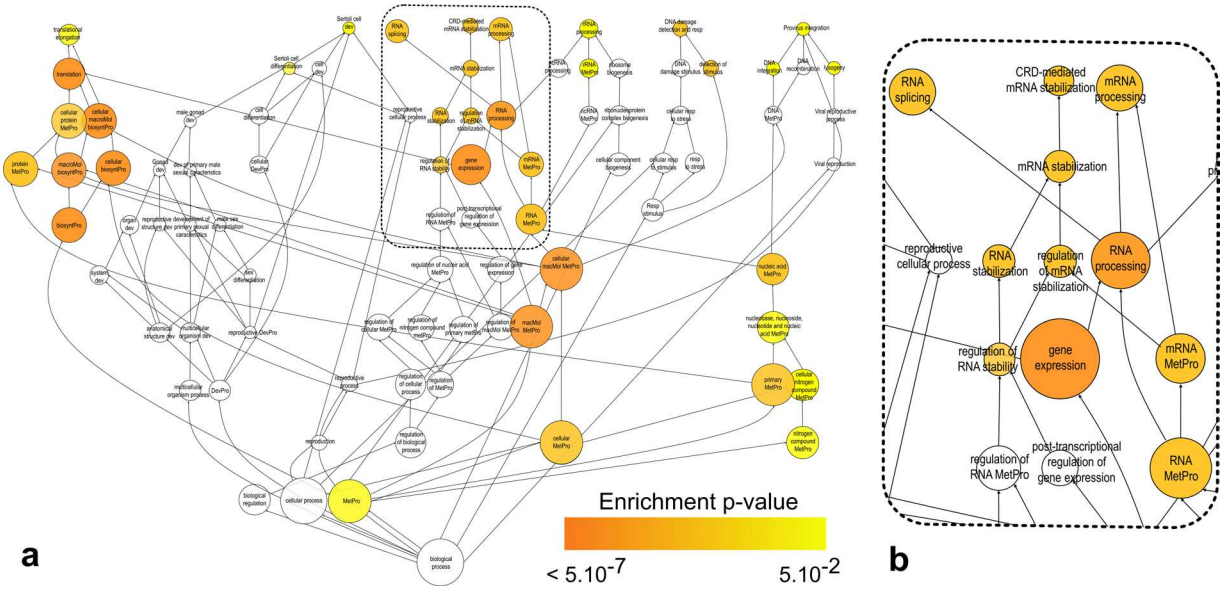


Figure 2. Functional groups over-represented among potential M2-1 binding partners. A gene set enrichment analysis was performed using BiNGO software on all potential M2-1 binding partners. P-values were determined by a hypergeometric test (alpha = 0.01) with a Benjamini & Hochberg correction. All GO terms related to biological processes found among this selection are displayed as circles, organized from the most general at the bottom to the most specific at the top. GO terms in an inclusion relation are linked by an arrow, with the arrow's head pointing to the daughter GO term. Each circle' diameter varies according to the GO term's total size, and its color varies according to its enrichment p-value. GO terms which aren't significantly enriched in the analysis are shown as blank circles. Abbreviations used: macromolecule = macMol, metabolic process = MetPro, development = dev, biosynthetic process = BiosyntPro. Response = resp (**a**). Complete graph. (**b**) Area with GO terms related to RNA metabolism.

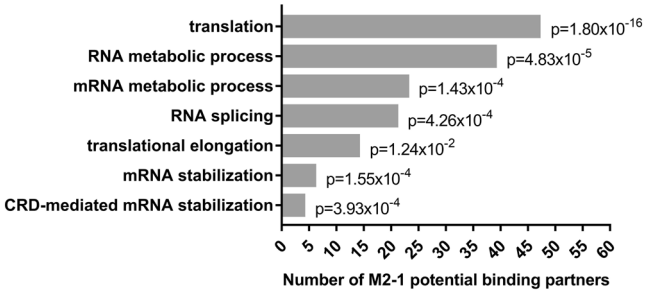


Figure 3. Representation of selected biological processes among potential M2-1 binding partners. A gene set enrichment analysis was performed using BiNGO software on all potential M2-1 binding partners. P-values were determined by a hypergeometric test (alpha = 0.01) with a Benjamini & Hochberg correction. For seven chosen GO terms related to biological processes, the enrichment p-values and the number of potential M2-1 binding partners featuring these GO terms are displayed in this graph.

require RNA as an intermediary, but that both proteins' ability to bind to RNA either consolidates the interaction and/or leads to the capture of PABPC1 both through protein-protein and RNA-protein interactions.

Similar IP experiments were performed with BSRT7/5 cells transiently expressing M2-1-GFP and the bound proteins were revealed by immunoblotting (Fig. 5b, Supplementary Fig. S7). PABPC1 was captured in IPs with M2-1-GFP but not free GFP. Signal was stronger in the absence of RNAse A treatment as observed on infected cells. This confirms the previous results and highlights that PABPC1-M2-1 interaction does not require any other viral protein than M2-1 and can form outside of an infectious context. The mirror IP was also carried out: HEp-2 cells were infected with wild-type RSV for 14 h, then subjected to co-IP with an antibody targeting PABPC1 or a non-relevant cellular protein (control). RNAse A was added during lysis. As seen in Fig. 5c and Supplementary Fig. S7, M2-1 was found in greater quantity in the IP using PABPC1 antibody than in control. This further validates the interaction, in a setting where none of the partners were modified by tags.

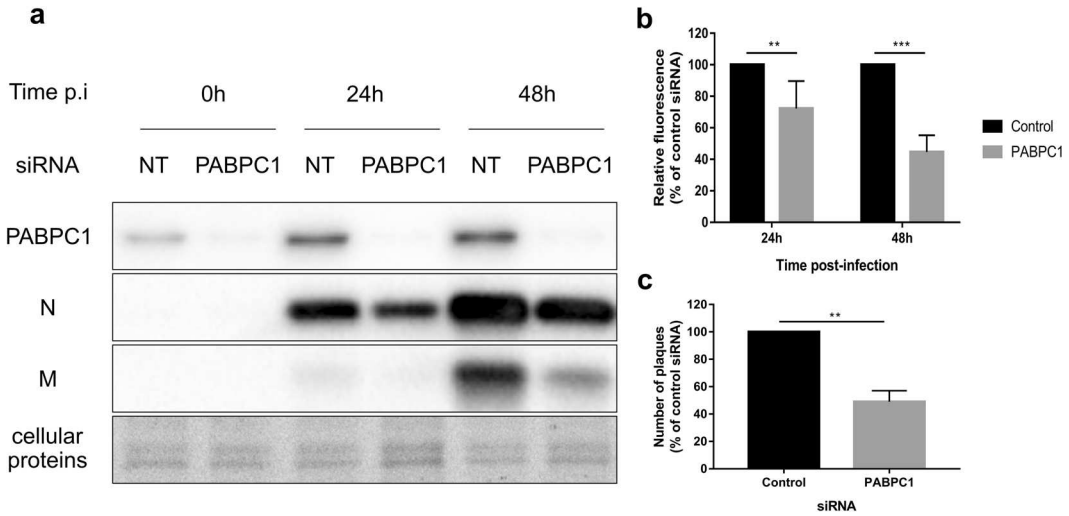


Figure 4. Impact of PABPC1 silencing on RSV multiplication. A549 cells were treated by siRNA PABPC1 or non-targeting siRNA (control) for 48 h and then infected with RSV-Cherry at MOI 0.05. (**a**) Cell lysates were collected at 0, 24 and 48 h p.i, subjected to SDS-PAGE and probed by antibodies directed against PABPC1, N or M. The visualization of all proteins was realized by Stain Free revelation. Full blots are available in Supplementary Fig. S4. (**b**) Cherry fluorescence was measured at 24 and 48 h post-infection and is expressed as a percentage of the values found for the control siRNA. The data was collected on 5 experiments with each point performed in triplicate. The significance was tested with a two-tailed paired t-test (alpha = 0.05) using GraphPad Prism software (**$p < 0.01$ (0.0073); ***$p < 0.001$ (0.0000025)). The normality of the data was tested with a Shapiro-Wilk normality test (alpha = 0.05) using GraphPad Prism software ($p = 0.4510$ & $p = 0.5696$). (**c**) Cell lysates were collected at 48 h p.i and subjected to a plaque titration assay. Results are expressed as the number of plaques in the 10^{-5} dilution wells, in percentage of the total found for the control siRNA. The data was collected on 3 experiments and each point was performed in duplicate. The significance was tested with a paired t-test using GraphPad Prism software (**$p < 0.01$ (0.0081)). The normality of the data was tested with a Shapiro-Wilk normality test (alpha = 0.05) using GraphPad Prism software ($p = 0.3417$).

The MLLE domain of PABPC1 is responsible for its interaction with M2-1. PABPC1 is comprised of several structural domains: four RNA recognition motif (RRM) domains involved in the binding of mRNA polyA tails, a proline-rich linker and a MLLE domain involved in the binding of most cellular partners of PABPC1[24–26]. To identify which PABPC1 domain or region binds to M2-1, we performed a protein complementation assay: two complementary fragments of the NanoLuc enzyme[27] were fused to the proteins of interest and protein-protein interactions were monitored by measuring the enzymatic activity of the reconstituted NanoLuc. The N1 and N2 complementation fragments of the NanoLuc were first fused to the entire PABPC1 and to M2-1 respectively. Fusion proteins were transiently expressed in HEK293T cells and luminescence from the reconstituted NanoLuc was measured and expressed as a normalized luminescence ratio (NLR) over control protein pairs[27]. Cell extracts were treated with RNAse A during 1 h prior to luminescence measure, to avoid the detection of mRNA mediated interactions. Strong luminescent signal was observed when the N1 and N2 fusions of the entire PABPC1 and M2-1 proteins were co-expressed, validating the interaction between PABPC1 and M2-1 (Fig. 6a).

The interaction between M2-1 and four different fragments of PABPC1 was also tested with this assay (Fig. 6b). The N-terminal fragment 1–498, spanning the 498 first amino acids of the protein, encompasses the four RRM and part of the linker. It was associated with a NLR less than 10% of the signal obtained with the whole PABPC1. In contrast, fragment 492–636, containing the rest of the linker and the MLLE domain, retained roughly 50% of the signal of the whole PABPC1. We thus focused on the C-terminal part of PABPC1 and used fragments encompassing amino acid residues 492–540 and 541–636, spanning the C-terminal part of the linker and the MLLE domain, respectively. A loss of more than 90% of the signal was observed for the fragment 492–540, while fragment 541–636 showed a NLR signal similar to the one observed with fragment 492–636. This shows that the M2-1 binding site is situated within the MLLE domain of PABPC1.

The PABPC1/M2-1 interaction takes place both in IBAGs and in the cytoplasm of infected cells. We then investigated the subcellular localization of the M2-1 – PABPC1 interaction. M2-1 can be seen throughout the cytoplasm in infected HEp-2 cells, but accumulates in viral IBs, and more precisely in IBAGs, which are sub-compartments of IBs[7]. Staining of PABPC1 by immunofluorescence confirmed that PABPC1 can also be found throughout the cytoplasm and co-localize with M2-1 in IBAGs (Fig. 7a). PABPC1 belongs to the translation initiation complex (Wells 1998). We previously observed that eIF4G, another member of this complex, was found in IBAGs together with M2-1 and PABPC1[7]. This raises the question of whether M2-1 interacts just with PABPC1 or with the translation initiation complex as a whole. To clarify this point, M2-1-GFP was immunoprecipitated in the presence of RNAse A in RSV-M2-1-GFP infected cells, and the precipitated samples were separated by SDS-PAGE and probed by antibodies against four other members of this complex: eIF4A, eIF4E, eIF3

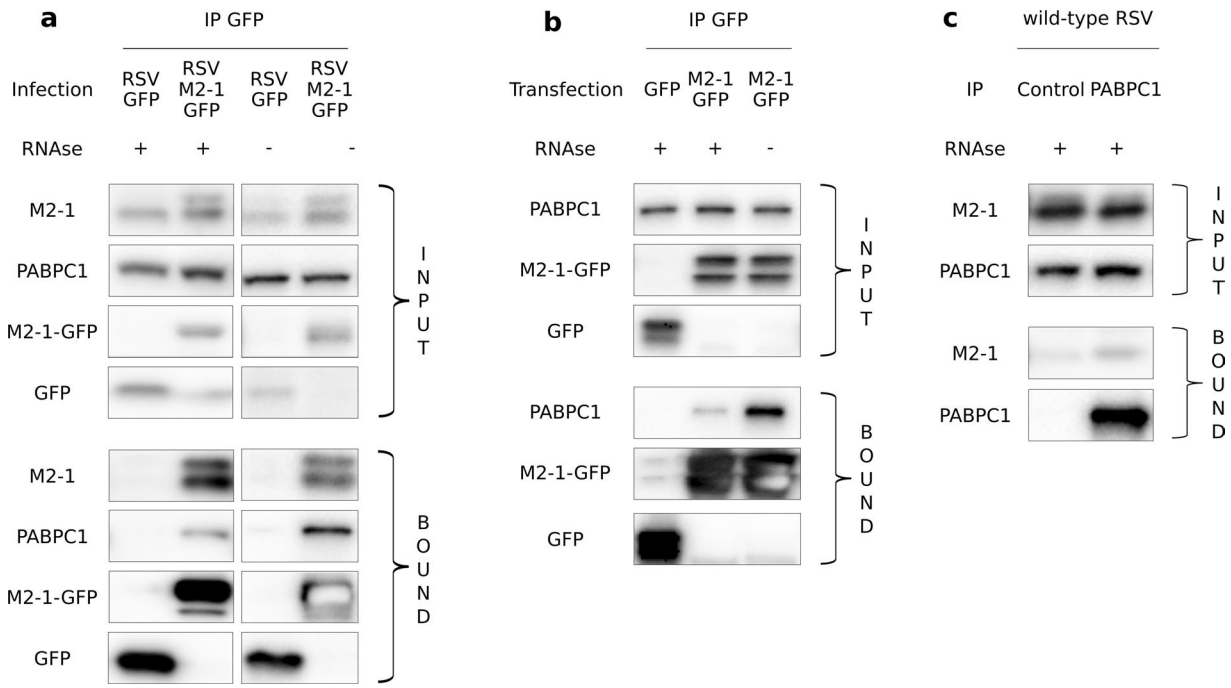


Figure 5. Interaction of PABPC1 with M2-1 expressed either in an infectious context or alone. (**a**) HEp-2 cells were infected with either RSV-M2-1-GFP or RSV-GFP (control) for 14 h and then subjected to co-IP with GFP antibody. RNAse (RNAse A or broad-spectrum nuclease) was added or not during the lysis step as indicated. After SDS-PAGE, immunoblot probing was then performed to detect the M2-1-GFP, GFP, PABPC1 and wild-type M2-1 proteins in the whole cell lysate (input) and in the bound fraction (bound). Full blots are available in Supplementary Fig. S5. Representative images from six to seven independent experiments are shown. (**b**) HEp-2 cells were transfected with either M2-1-GFP or GFP (control) for 24 h, and then subjected to co-IP with an anti-GFP antibody. RNAse A was added or not during the lysis step as indicated. Immunoblot probing was then performed to detect the M2-1-GFP, GFP and PABPC1 proteins. Full blots are available in Supplementary Fig. S7(a–c). Representative images from three independent experiments are shown. (**c**) HEp-2 cells were infected with wild type RSV for 14 h, and then subjected to co-IP with an antibody directed against either PABPC1 or a non-relevant protein (IMPDH2). RNAse A was added during the lysis step. M2-1 and PABPC1 were then detected by Western blotting. Full blots are available in Supplementary Fig. S7(d–e). Representative images from two independent experiments are shown.

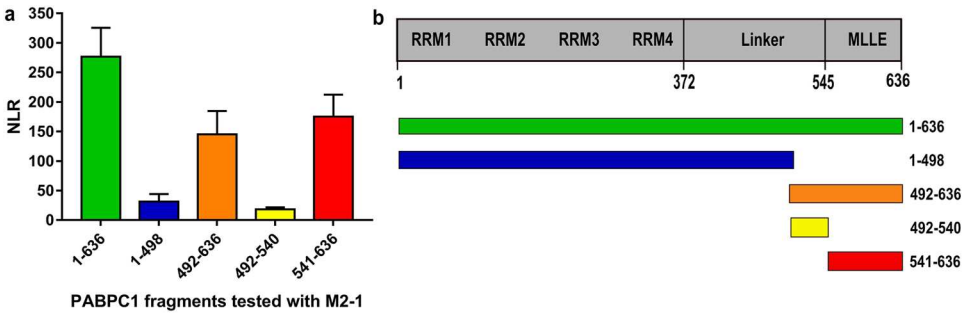


Figure 6. Interaction between M2-1 and various fragments of PABPC1. (**a**) The NanoLuc Two-Hybrid assay was used to detect the interaction between M2-1 and 5 fragments of PABPC1. Cells were treated with RNAse A 1 h prior to luminescence measurement. Results are displayed as a normalized luminescence ratio (NLR) of the signal of the two fusion proteins over two control protein pairs. The data was collected on 4 experiments performed in duplicates. (**b**) A schematic representation of PABPC1's domains, with numbers representing amino acid positions of domains boundaries[45]. Below are represented the fragments of PABPC1 tested for interaction with M2-1. The numbers correspond to the positions of the first and last amino acid of each fragment.

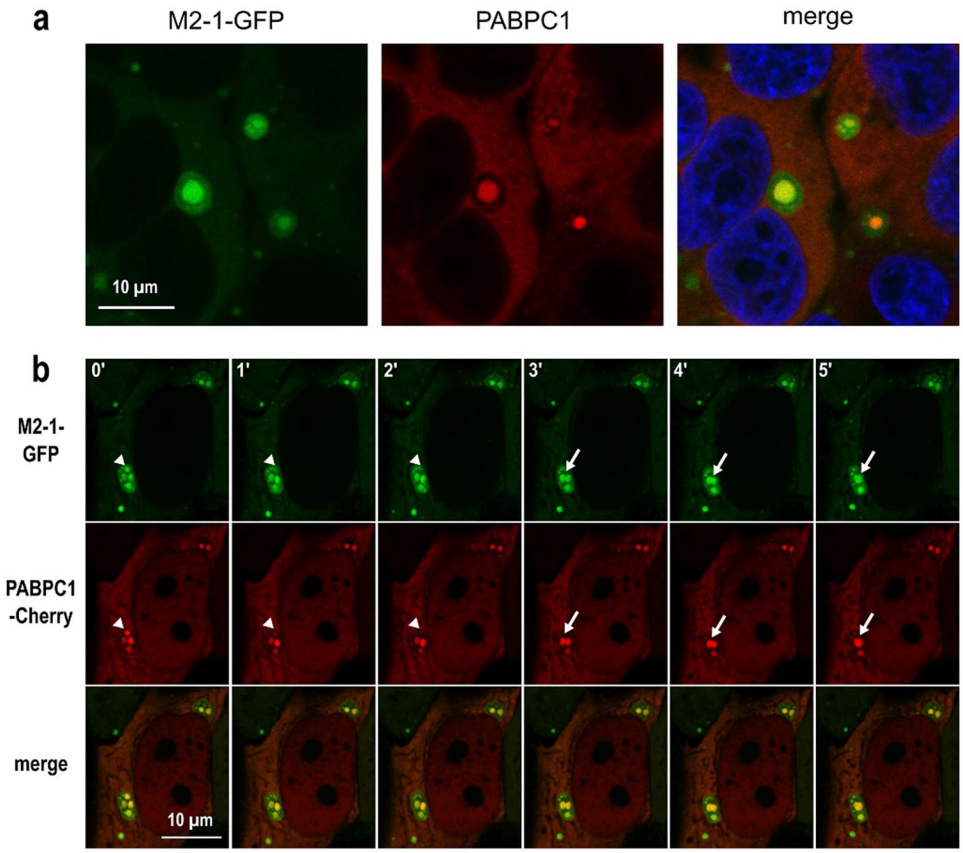


Figure 7. Localization of the interaction between M2-1 and PABPC1. (**a**) Cells were infected by a recombinant RSV expressing M2-1-GFP (green) and PABPC1 was localized by immunofluorescence (red). DNA was stained by Hoechst 33258 (blue). Images were taken under a Leica SP8 confocal microscope. Representative images from 3 independent experiments are shown. (**b**) Cells were simultaneously infected by RSV-M2-1-GFP and transfected with PABPC1-Cherry. At 24 h p.i., cells were imaged in a chamber heated at 37 °C, with a Olympus FV3000 confocal microscope. The M2-1-GFP protein was visualized by green fluorescence and the PABPC1-Cherry by red fluorescence. Representative images from four independent experiments are shown. White triangles and white arrows indicate M2-1 and PABPC1 signal of IBAGs undergoing disassembly and fusion, respectively.

and eIF4G (see Supplementary Fig. S8). Consistent with the interactome results, none of those proteins are visible in the bound fraction, showing that the translation initiation complex is not co-precipitated with M2-1. To better visualize the M2-1 – PABPC1 interaction, we performed a Proximity Ligation Assay (PLA) in HEp-2 cells with antibodies directed against M2-1 and PABPC1. This test relies on close proximity of the two PLA probes triggering the hybridization of their two oligonucleotides, followed by the amplification of the reconstituted sequence and its detection by fluorescent probes. The resulting dot-shaped signal enables the visualization of the M2-1 – PABPC1 interaction within the cells. As a negative control, PLA was performed with antibodies against M2-1 and the cellular protein IMPDH2. Cells were infected by RSV-L-GFP, a recombinant virus expressing the L-GFP protein[28] (see Methods section), to visualize IBs (in green). Red spots marking complexes of PABPC1 and M2-1 were observed in the cytoplasm, showing that the two proteins also associate outside IBs (Fig. 8). Surprisingly, no PLA signal was detected inside IBs. This could be due to an inability of the antibodies to enter the viral structures, a phenomenon often observed when immunostaining IBs induced by RSV[29]. Taken together, these observations suggest that M2-1 and PABPC1 interact both in IBAGs and in the cytosol. This could mean that their interaction is conserved as they change cellular compartments. To better understand the sequence of the association between M2-1 and PABPC1, we performed live cell imaging of transiently expressed PABPC1-Cherry and of M2-1-GFP in RSV-M2-1-GFP infected HEp-2 cells (see Supplementary Movie 1). It showed that the two proteins exhibit the same dynamic behavior when IBAGs grow and undergo fusion (Fig. 7b, white arrows). This implies that their colocalization is constant throughout their stay in IBAGs. Strikingly, the fluorescence of both M2-1 and PABPC1 in IBAGs fades concomitantly as shown on Fig. 7b (white triangles), suggesting that PABPC1 is released from IBAGs in the cytoplasm together with M2-1.

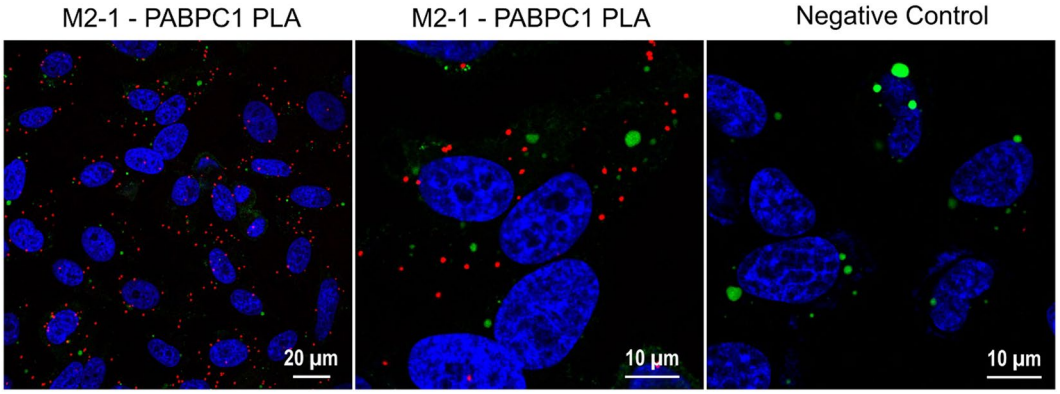


Figure 8. Detection of the M2-1 – PABPC1 interaction using Proximity Ligation Assay. Cells were infected with a recombinant RSV expressing L-GFP (green), fixed at 24 h p.i and subjected to a Proximity Ligation Assay (red). DNA was stained with Hoechst 33258 (blue). Primary antibodies used were directed against M2-1 and PABPC1, or M2-1 and IMPDH2 for the negative control. Images were taken under a Leica SP8 confocal microscope. Representative images from 3 independent experiments are shown.

Discussion

In this study, we investigated the interactome of the RSV protein M2-1 within infected cells, using co-immunoprecipitations coupled with a LC-MS/MS analysis. To our knowledge, this is the first study of RSV-host interactomics carried out directly in infected cells. We used a recombinant virus carrying an additional M2-1-GFP thus expressing both wild type M2-1 and M2-1-GFP fusion protein. The fusion protein M2-1-GFP showed similar efficiency to wild-type M2-1 in promoting viral transcription in minireplicon experiments and the recombinant RSV-M2-1-GFP's growth was not significantly different from the wild type RSV's[7]. The RSV-M2-1-GFP virus is thus a useful tool to explore M2-1 interactions with host factors during the course of viral infection. However, one drawback of this method is that the presence of a tag may prevent some proteins from binding to M2-1. In our case, though, the formation of heterotetramers M2-1:M2-1-GFP (observed in Fig. 5a) allows those proteins to be co-purified through their interaction with untagged M2-1.

A total of 137 proteins were identified as potential M2-1 binding partners. This list should not be considered exhaustive, as proteins with low abundance or weak interactions with M2-1 may not be represented. To validate these results, we chose to focus on one candidate, the polyA-binding protein cytoplasmic 1 (PABPC1). This protein plays a major role in translation as a member of the translation initiation complex, and participates in the formation of the closed loop structure taken by mRNA undergoing translation[30–33]. PABPC1 also regulates mRNA stability by protecting the polyA tail from degradation and interacting with deadenylation complexes, and is involved in miRNA and nonsense-mediated decay[34–36]. As such, it is often targeted by viruses, either to shut off cellular translation or to enhance their own proteins' expression[37]. In particular, it is involved in several interactions with viral proteins. For example, both the rotavirus protein NSP3 and the rubella virus capsid protein bind to PABPC1 to remove it from the translation initiation complex and relocate it to the nucleus during infection, leading to an inhibition of cellular mRNA translation. On the contrary, influenza A protein NS1 binds PABPC1 without disturbing its interaction with eIF4G, and thus with the translation initiation complex. NS1 also interacts with viral mRNA, which could lead to the formation of a mRNA-NS1-PABPC1 complex which was proposed to enhance the recruitment of the translation machinery on viral mRNA[38,39]. As the RSV mRNA are both capped and polyadenylated, it is very likely that PABPC1 intervenes in their translation. Considering this, and the fact that M2-1, like influenza A NS1, binds both PABPC1 and viral mRNA, the M2-1 – PABPC1 interaction could facilitate recruitment of the translation machinery on viral mRNA. PABPC1 also plays an important role in controlling the stability of mRNAs, which could suggest that M2-1 stabilizes viral mRNAs by recruiting PABPC1. Consistent with this hypothesis, many proteins involved in regulating mRNA stability were identified as potential M2-1 interactors (Figs 2 and 3). Both hypotheses are consistent with our PABPC1 inhibition experiments, which show a significant impact of PABPC1 on RSV infection level, proteins level and virion production.

Our results clearly showed that PABPC1 was co-precipitated with M2-1 from infected cells. Quantification of Western blot signals suggest that only a small proportion of total cellular PABPC1 is involved in this interaction, which is consistent with the fact that no shut-down of cellular translation is observed in RSV infected cells. It is unclear whether the M2-1 – PABPC1 interaction is direct or not. The protein complementation assay detects close M2-1 – PABPC1 interactions that rely on the MLLE domain rather than the RNA-binding domains. This strongly suggests that the observed M2-1 – PABPC1 interaction is not due to mutual binding to the same RNA, though it probably reinforces or contributes to the interaction. This assumption is supported by the observation of an interaction between M2-1 and PABC1 in cell lysates treated by RNAse. However, since PABPC1 partially protects polyA tails against RNAse digestion, this is not an undisputable argument[34]. The M2-1 – PABPC1 interaction is also detectable in cells expressing M2-1 alone, indicating that no other RSV protein is needed as an intermediary. However, other cellular proteins could be involved. Among known PABPC1 binding partners, only hnRNP D was found as potentially interacting with M2-1 in our interactomics screen. However, its inhibition by specific siRNA

had no visible impact on RSV multiplication (see Supplementary Fig. S9), suggesting that this protein does not play a role in this interaction.

The observation of the cellular colocalization of M2-1 and PABPC1 shows that these two proteins associate both within IBAGs and in the cytoplasm, and hints that they leave IBAGs together. Moreover, M2-1 is believed to bind nascent viral mRNA that concentrate in IBAGs before being released in the cytosol[7,15]. Altogether these data suggest that PABPC1 binds the M2-1-viral mRNA complex in the IBAGs and that both PABPC1 and M2-1 remain associated with viral mRNA in the cytosol after their release from IBAGs. Interestingly, the analysis of the potential M2-1 binding partners defined in this study revealed that the candidates were significantly over-represented in biological processes linked to mRNA metabolism, such as mRNA splicing, translation and stabilization. As the experiments were realized in the presence of RNAse, it is unlikely that the capture of so many RNA-binding proteins simply results from the pull-down of the entire ribonucleoprotein. This is comforted by the fact that other proteins present on mRNA, such as eIF4E, eIF4G, eIF4A and eIF3, were not precipitated with M2-1. Therefore, this result most likely indicates that M2-1, previously only known for its role in viral transcription, stays closely associated with mRNA and mRNA-binding factors (like PABPC1), throughout mRNA departure from IBAGs and release in the cytoplasm. M2-1 could thus have a hitherto unknown role in the fate of viral mRNA post-transcription, in conjunction with cellular factors involved in mRNA metabolism such as PABPC1. Like influenza A protein NS1, it could enhance the translation of RSV mRNA over cellular mRNA. It could also promote the stability of viral mRNA by consolidating the binding of cellular stabilizing factors or by disrupting the recruitment of degradation complexes. Another option is that it could lead to the recruitment of mRNA binding factors directly in IBAGs, so that when the viral mRNA is released in the cytoplasm, it is not unprotected and has all the hallmarks of a fully mature cellular mRNA. In conclusion, our results demonstrate M2-1's involvement in the fate of viral mRNA downstream of transcription. It opens the way for the exploration of M2-1's roles in regulation of viral mRNA maturation and stability.

Materials and Methods

Cells and viruses. HEp-2 cells (ATCC number CCL-23) were grown in Eagle's minimum essential medium (MEM). BHK-21 cells (clone BSRT7/5), constitutively expressing the T7 RNA polymerase[40], HEK293T cells (ATCC number CRL-3216), constitutively expressing the SV40 T-antigen, and A549 cells (ATCC number CCL-185) were grown in Dulbecco modified essential medium (DMEM). Media were supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS) and antibiotics. The wild-type RSV, the RSV-GFP, the RSV-M2-1-GFP, the RSV-L-GFP and the RSV-Cherry are derived from the RSV subtype A Long strain (ATCC VR-26) and were rescued by reverse genetics as previously described[41]. Experiments were performed with viral stock amplified on HEp-2 cells at 37 °C after three to five passages[21]. Plaque assay were performed at 37 °C on HEp-2 cells using Avicel overlay as previously described[21,41].

Antibodies. The rabbit polyclonal anti-M2-1, anti-N and anti-M were obtained by repeated injection of purified recombinant protein produced in Escherichia coli as previously described[42]. The mouse anti-cellular proteins antibodies used in western blotting were from Santa Cruz: PABP (10E10; 0.4 µg/ml), eIF4G (A-10; 0.4 µg/ml), eIF4E (P-2; 0.4 µg/ml), eIF3η (C-5; 0.4 µg/ml) and eIF4AI/II (H-5; 0.4 µg/ml). The Santa Cruz mouse anti-PABP antibody and an abcam rabbit anti-IMPDH2 antibody (ab75790) were used in co-immunoprecipitation at a concentration of 10 µg/ml. The rabbit anti-PABP (ab21060; 2 µg/ml) and mouse anti-M2-1 (ab94805; 2 µg/ml) used in immunofluorescence staining and Duolink were from Abcam. Secondary antibodies (2 µg/ml) raised against mouse or rabbit IgG (H + L) and conjugated to Alexa Fluor 488, 594 or 647 were from Invitrogen. Secondary antibodies (0.1 µg/ml) raised against mouse or rabbit IgG (H + L) and conjugated to horseradish peroxidase were from Promega.

Plasmids. All the viral sequences were derived from the human RSV strain Long, ATCC VR-26 (GenBank accession AY911262.1). To construct the RSV-GFP reverse genetic vector, the Cherry gene has been replaced by the GFP coding sequence in pACNR–rHRSV-cherry vector between the two MluI restriction sites[21]. The RSV-L-GFP reverse genetic vector has been derived from the pACNR–rHRSV by inserting the L-GFP coding sequence[28] between BamHI and BstBI restriction sites. Sequences of RSV-GFP and RSV-L-GFP genomes are available on GenBank at accession numbers MK816924 and MK810782. Expression plasmids of RSV M2-1 and M2-1-GFP proteins (pM2-1 and pM2-1-GFP) have been previously described[12]. pPABPC1 was constructed by inserting the PABPC1 coding sequence in a pCI mammalian vector (Promega) between the KpnI and SalI restriction sites. pPABPC1-Cherry was constructed by inserting the Cherry coding sequence in pPABPC1 between the SalI and NotI restriction sites. The plasmids pPABPC1-C1 and pM2-1-C2 were constructed by inserting the M2-1 or PABPC1 coding sequence by Gateway recombination (Invitrogen) in pDEST-N2H-C1 and pDEST-N2H-C2 respectively[27]. In pM2-1-C2, the M2-1 coding sequence used was optimized for human expression (sequence available upon request). The pPABPC1$_{1\text{-}498}$-N1, pPABPC1$_{492\text{-}636}$-N1, pPABPC1$_{492\text{-}540}$-N1 and pPABPC1$_{541\text{-}636}$-N1 were constructed by inserting each truncated PABPC1 coding sequence in pDEST-N2H-N1, also by Gateway recombination[27]. All constructs were verified by sequencing.

Plasmid transfection. For co-immunoprecipitations, BSR/T7-5 were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations with 4 µg of plasmid. For protein complementation assays, HEK293T cells in 96-wells plates were transfected with 0.56 µL of Polyethylenimine 1 mg/mL (molecular weight 40000, Polysciences) and with 0.2 µg of plasmid.

Protein complementation assay (N2H). At 24 h post-transfection, cells were lysed in NanoGlo Luciferase Assay Buffer (Promega) and incubated for 1 h with 100 µg/ml of RNAse A (Thermo Scientific). After

addition of an equal volume of NanoGlo Luciferase Assay Substrate (Promega) diluted 200 times in NanoGlo Luciferase Assay Buffer, luciferase activity expressed in RLU was measured using a Tecan infinite M200PRO plate reader. NLR were then calculated as previously described[27].

Cell infection and siRNA transfection. siRNA transfection was performed on A549 cells newly seeded in 96-wells plates[41]. Briefly, a pool of 4 different siRNA targeting the same gene (ON-TARGETplus SMARTpool, Dharmacon) was transfected simultaneously to the cell seeding, using DharmaFECT transfection reagent (Dharmacon). 0.5 µL of DharmaFECT per well were used with a final siRNA concentration of 50 nM.

Cell viability test. Cell viability was tested using the Cell Titer Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) according to the manufacturer's recommendations. Luciferase activity expressed in RLU was measured using a Tecan infinite M200PRO plate reader.

Co-immunoprecipitation. To perform co-immunoprecipitation using a GFP tag, HEp-2 cells infected with RSV-M2-1-GFP or transiently expressing M2-1-GFP were lysed in a co-IP lysis buffer (Tris 10 mM pH 7.5; NaCl 150 mM; IGEPAL® CA-630 0.5% (Sigma-Aldrich); antiprotease (Roche)) with or without 100 µg/ml of RNAse A (Thermo Scientific), then incubated overnight at 4 °C with GFP-Trap beads (Chromotek) according to the manufacturer's recommendations. Beads were rinsed three times in a co-IP dilution buffer (Tris 10 mM pH 7.5; NaCl 150 mM), then either subjected to LC-MS/MS analysis or eluted in Laemmli buffer at 95 °C and analyzed by SDS-PAGE. To perform co-IP using PABP antibodies, HEp-2 cells infected with wild-type RSV were lysed in a co-IP lysis buffer (Tris 50 mM pH 7.5; NaCl 150 mM; EDTA 2 mM; DTT 1 mM; IGEPAL® CA-630 0.5% (Sigma-Aldrich); Glycerol 10%; antiprotease (Roche)) with or without RNAse. As RNAse, we used either RNAse A (Thermo Scientific) at 100 µg/ml or Pierce Universal Nuclease (Thermo Scientific) at 250U/ml. They were then incubated overnight at 4 °C with Protein A sepharose beads CL-4B (GE healthcare). The beads had previously been incubated 1 h with either mouse anti-PABP or anti-IMPDH2 antibodies and rinsed three times in PBS and one time in lysis buffer. After incubation with the lysate, beads were rinsed two times in the co-IP lysis buffer and two times in PBS, then eluted in Laemmli buffer at 95 °C and analyzed by SDS-PAGE. Western blot signals' relative quantification was performed using the Image Lab software (Bio-Rad); for each protein, the corresponding Input signal was used as reference.

LC-MS/MS analysis. Proteins on co-immunoprecipitation beads were incubated with NH_4HCO_3 25 mM containing sequencing-grade trypsin (25 µg/mL; Promega). Peptides were desalted using ZipTip µ-C18 Pipette Tips (Millipore). Peptides mixtures were analysed by (1) a Q-Exactive Plus coupled to a Nano-LC Proxeon 1000 or by (2) an Orbitrap Fusion coupled to an UltiMate™ 3000 RSLCnano System (2) (all from Thermo Scientific). For (1), peptides were separated by chromatography with the following parameters: Acclaim PepMap100 C18 pre-column (2 cm, 75 µm i.d., 3 µm, 100 Å), Pepmap-RSLC Proxeon C18 column (50 cm, 75 µm i.d., 2 µm, 100 Å), 300 nl/min flow rate, a 98 min gradient from 95% solvent A (water, 0.1% formic acid) to 35% solvent B (100% acetonitrile, 0.1% formic acid). Peptides were analysed in the Orbitrap cell, at a resolution of 70,000, with a mass range of *m/z* 375–1500. Fragments were obtained by higher-energy collisional dissociation (HCD) activation with a collisional energy of 28%. MS/MS data were acquired in the Orbitrap cell in a Top20 mode, at a resolution of 17,500. For (2), chromatographic separation of the peptides was achieved by an Acclaim PepMap 100 C18 pre-column and a PepMap-RSLC Proxeon C18 column at a flow rate of 300 nl/min. The solvent gradient consisted of 99% solvent A (water, 0.1% (v/v) formic acid) to 45% solvent B (100% acetonitrile, 0.1% formic acid) over 55 minutes for a total gradient time of 1 hour. The Orbitrap cell analysed the peptides in full ion scan mode, with the resolution set at 120,000 with a *m/z* range of 400-1500. Collision-induced dissociation (CID) activation with a collisional energy of 35% was used for peptide fragmentation with a quadruple isolation width of 1.6 Da and a resolution of 30,000 for MS/MS. The Orbitrap cell was employed in top-speed mode in order to acquire the MS/MS data. Maximum ion accumulation times were set to 50 ms for MS acquisition and 300 ms for MS/MS acquisition in parallelization mode.

Quantification of protein abundance variations. Peptide and protein abundance were measured using Progenesis-Qi software 4.1 (Nonlinear Dynamics Ltd, Newcastle, UK). For the identification step, all MS and MS/MS data were processed with the Proteome Discoverer software (Thermo Scientific, version 2.2) coupled to the Mascot search engine (Matrix Science, version 2.5.1). The mass tolerance was set to 7 ppm for precursor ions and 0.5 Da for fragments. The maximum number of missed cleavages was limited to two for the trypsin protease. The following variable modifications were allowed: oxidation (Met), phosphorylation (Ser, Thr, Tyr), acetylation (Protein N-term). The SwissProt database (02/2017) with the *Homo sapiens* taxonomy was used for the MS/MS identification step. Peptide Identifications were validated using a 1% FDR (False Discovery Rate) threshold calculated with the Percolator algorithm. Protein identifications were validated if at least two unique peptides were identified by protein. Protein abundance measurements were calculated according to the Hi-3 label-free quantification method. P-values were computed on protein ratios from the 6 independent experiments with R Studio software with the R/Bioconductor software package Limma (with eBayes procedure).

Enrichment analysis of potential M2-1 binding partners. Associated Gene Ontology (GO) terms enrichment analyses and their visualization were obtained by the Bingo[23] Cytoscape plugin (version 3.0.3) with the following parameters: hypergeometric test as statistical test with a Benjamini & Hochberg False Discovery Rate (FDR) correction and a significance level of 0.01.

Quantitative real-time PCR. Cellular and viral mRNA were extracted from cells using QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations. Genomic DNA was lysed and cDNA was

synthesized from the extracts' mRNA with random hexamer primers, using the Superscript IV VILO Mastermix with ezDNAse enzyme (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. 4 µL of cDNA product were amplified with 0.6 µM of paired primers (presented in Supplementary Table S5) and Dynamo ColorFlash SYBR green mastermix (Thermo Scientific) according to the manufacturer's recommendations, on a CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), following the recommended protocol. mRNA quantification was then realized using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method with Pfaffl correction[43].

Immunofluorescence staining and duolink. HEp-2 cells were grown on glass coverslips, infected for 24 h then fixed with PBS-formaldehyde 4% (v/v) for 10 min at room temperature and permeabilized with PBS-BSA 1% (w/v)-Triton X-100 0.1% (v/v) for 10 min. For immunofluorescence staining, cells were incubated for 1 h with the indicated primary antibodies, and 30 min with the appropriate Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies and Hoechst 33342 (1 µg/ml). After washing in PBS, coverslips were mounted in ProLong Diamond antifade reagent (Thermofisher). For PLA experiments, Duolink *In Situ* kit (Sigma-Aldrich) was used according to the manufacturer's instructions. After permeabilization and blocking, cells were incubated with a mouse anti-M2-1 antibody and a rabbit anti-PABP antibody (Abcam) 60 min at room temperature in a humidity chamber. The coverslips were then incubated with corresponding secondary antibodies conjugated with PLA probes for 60 min at 37 °C. Ligation and amplification steps were performed as indicated by the manufacturer and coverslips were mounted onto slides. Z-stack image acquisitions of multi-labelled cells were performed under the WLL Leica SP8 microscope.

Live Imaging. For time lapse microscopy, HEp-2 cells were seeded on Ibidi µ-Dish polymer coverslip bottom. Cells were transfected with pPABPC1-Cherry and infected with RSV-M2-1mGFP as described above. At 24 h p.i., cells were placed under a Olympus FV3000 confocal microscope. Z-stacks were acquired every minute during 30 min. Maximum projection was performed on Icy Software and the resulting movies were visualized on Icy Software.

Data availability

The complete data sets are available in the PRIDE partner repository[44] under the identification number: ProteomeXchange accession: PXD013761 Project Webpage: http://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD013761 FTP Download: ftp://ftp.pride.ebi.ac.uk/pride/data/archive/2019/10/PXD013761 as.raw files, Proteome Discoverer 2.2.pdResult files, associated pep.xml and xlsx files, and abundance measurements report generated by Progenesis QI.

Received: 23 May 2019; Accepted: 7 October 2019;
Published online: 24 October 2019

References

1. Shi, T. *et al.* Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet (London, England)* **390**, 946–958 (2017).
2. Falsey, A. R., Hennessey, P. A., Formica, M. A., Cox, C. & Walsh, E. E. Respiratory Syncytial Virus Infection in Elderly and High-Risk Adults. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1749–1759 (2005).
3. Afonso, C. L. *et al.* Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Arch. Virol.* **161**, 2351–2360 (2016).
4. Tawar, R. G. *et al.* Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. *Science (80-.).* **326**, 1279–1283 (2009).
5. Garcia, J., Garcia-Barreno, B., Vivo, A. & Melero, J. A. Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein. *Virology* **195**, 243–247 (1993).
6. Garcia-Barreno, B., Delgado, T. & Melero, J. A. Identification of protein regions involved in the interaction of human respiratory syncytial virus phosphoprotein and nucleoprotein: significance for nucleocapsid assembly and formation of cytoplasmic inclusions. *J Virol* **70**, 801–808 (1996).
7. Rincheval, V. *et al.* Functional organization of cytoplasmic inclusion bodies in cells infected by respiratory syncytial virus. *Nat. Commun.* **8**, 563 (2017).
8. Noton, S. L. & Fearns, R. Initiation and regulation of paramyxovirus transcription and replication. *Virology* **479–480**, 545–554 (2015).
9. 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. USA* **93**, 81–85 (1996).
10. Collins, P. L. *et al.* Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 11563–11567 (1995).
11. Fearns, R. & Collins, P. L. Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J. Virol.* **73**, 5852–5864 (1999).
12. Tran, T.-L. *et al.* The respiratory syncytial virus M2-1 protein forms tetramers and interacts with RNA and P in a competitive manner. *J. Virol.* **83**, 6363–6374 (2009).
13. Tanner, S. J. *et al.* Crystal structure of the essential transcription antiterminator M2-1 protein of human respiratory syncytial virus and implications of its phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 1580–1585 (2014).
14. 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).
15. Selvaraj, M. *et al.* The Structure of the Human Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein Bound to the Interaction Domain of the Phosphoprotein P Defines the Orientation of the Complex. *MBio* **9**, (2018).
16. Cartee, T. L. & Wertz, G. W. Respiratory syncytial virus M2-1 protein requires phosphorylation for efficient function and binds viral RNA during infection. *J. Virol.* **75**, 12188–12197 (2001).
17. Richard, C.-A. *et al.* RSV hijacks cellular protein phosphatase 1 to regulate M2-1 phosphorylation and viral transcription. *PLoS Pathog.* **14**, e1006920 (2018).
18. Li, D. *et al.* Association of respiratory syncytial virus M protein with viral nucleocapsids is mediated by the M2-1 protein. *J. Virol.* **82**, 8863–8870 (2008).

19. Meshram, C. D., Baviskar, P. S., Ognibene, C. M. & Oomens, A. G. P. The Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein, Matrix Protein, and Fusion Protein Carboxy-Terminal Domain Drive Efficient Filamentous Virus-Like Particle Formation. *J. Virol.* **90**, 10612–10628 (2016).
20. Teng, M. N. & Collins, P. L. Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for formation and passage of helper-dependent infectious particles. *J. Virol.* **72**, 5707–5716 (1998).
21. Rameix-Welti, M.-A. *et al*. Visualizing the replication of respiratory syncytial virus in cells and in living mice. *Nat. Commun.* **5**, 5104 (2014).
22. Munday, D. C., Howell, G., Barr, J. N. & Hiscox, J. A. Proteomic analysis of mitochondria in respiratory epithelial cells infected with human respiratory syncytial virus and functional implications for virus and cell biology. *J. Pharm. Pharmacol.* **67**, 300–318 (2015).
23. 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).
24. Deo, R. C., Bonanno, J. B., Sonenberg, N. & Burley, S. K. Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein. *Cell* **98**, 835–845 (1999).
25. Albrecht, M. & Lengauer, T. Survey on the PABC recognition motif PAM2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**, 129–138 (2004).
26. Kozlov, G. & Gehring, K. Molecular basis of eRF3 recognition by the MLLE domain of poly(A)-binding protein. *PLoS One* **5**, e10169 (2010).
27. Choi, S. G. *et al*. Towards an "assayome" for binary interactome mapping. *bioRxiv* 530790, https://doi.org/10.1101/530790 (2019).
28. Fix, J., Galloux, M., Blondot, M.-L. & Eléouët, J.-F. The insertion of fluorescent proteins in a variable region of respiratory syncytial virus L polymerase results in fluorescent and functional enzymes but with reduced activities. *Open Virol. J.* **5**, 103–108 (2011).
29. 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**, 8245–8258 (2012).
30. Gallie, D. R. The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev.* **5**, 2108–2116 (1991).
31. Preiss, T. & Hentze, M. W. Dual function of the messenger RNA cap structure in poly(A)-tail-promoted translation in yeast. *Nature* **392**, 516–520 (1998).
32. Wei, C. C., Balasta, M. L., Ren, J. & Goss, D. J. Wheat germ poly(A) binding protein enhances the binding affinity of eukaryotic initiation factor 4F and (iso)4F for cap analogues. *Biochemistry* **37**, 1910–1916 (1998).
33. Wells, S. E., Hillner, P. E., Vale, R. D. & Sachs, A. B. Circularization of mRNA by Eukaryotic Translation Initiation Factors. *Mol. Cell* **2**, 135–140 (1998).
34. Bernstein, P., Peltz, S. W. & Ross, J. The poly(A)-poly(A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 659–670 (1989).
35. Siddiqui, N. *et al*. Poly(A) nuclease interacts with the C-terminal domain of polyadenylate-binding protein domain from poly(A)-binding protein. *J. Biol. Chem.* **282**, 25067–25075 (2007).
36. Ezzeddine, N. *et al*. Human TOB, an antiproliferative transcription factor, is a poly(A)-binding protein-dependent positive regulator of cytoplasmic mRNA deadenylation. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 7791–7801 (2007).
37. Smith, R. W. P. & Gray, N. K. Poly(A)-binding protein (PABP): a common viral target. *Biochem. J.* **426**, 1–12 (2010).
38. Aragón, T. *et al*. Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6259–6268 (2000).
39. Burgui, I., Aragón, T., Ortín, J. & Nieto, A. PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J. Gen. Virol.* **84**, 3263–3274 (2003).
40. Buchholz, U. J., Finke, S. & Conzelmann, K. K. Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J. Virol.* **73**, 251–259 (1999).
41. Bouillier, C. *et al*. Generation, Amplification, and Titration of Recombinant Respiratory Syncytial Viruses. *J. Vis. Exp*. e59218 (2019).
42. Castagné, N. *et al*. Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus P-P and P-N protein complexes and localization of the P protein oligomerization domain. *J. Gen. Virol.* **85**, 1643–1653 (2004).
43. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).
44. Vizcaíno, J. A. *et al*. 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res.* **44**, D447–D456 (2016).
45. Joncourt, R., Eberle, A. B., Rufener, S. C. & Mühlemann, O. Eukaryotic initiation factor 4G suppresses nonsense-mediated mRNA decay by two genetically separable mechanisms. *PLoS One* **9**, e104391 (2014).

Acknowledgements

We thank Didier Chevret from the INRA platform PAPPSO and Camille Garcia from the Institut Monod platform Proteomics for their participation in mass spectrometry experiments. Benoit Maury is gratefully acknowledged for technical assistance in microscopy experiments. We are grateful to the Cymages platform for access to SP8 Leica and Olympus FV3000, which was supported by grants from the region Ile-de-France. We acknowledge Yves Jacob for the gift of the pDEST-N2H-N1, pDEST-N2H-N2, pDEST-N2H-C1 and pDEST-N2H-C2 plasmids. We are grateful to Pierre-Olivier Vidalain, Jean-Louis Gaillard, Yves Jacob, Patricia Cassonnet and Monica Bajorek for helpful discussions. We are grateful to Icy Software training team for their helpful advices. Icy is founded by Institut Pasteur and France-BioImaging. We acknowledge support from the INSERM and the Versailles Saint-Quentin University. This study was supported by grants from the ANR (French national research agency), RESPISYNCYCELL project, from the Region Ile-de-France and by the "Assistance Publique des Hôpitaux de Paris" (AP-HP).

Author contributions

C.B. and M.R.W. conceived and designed the experiments. C.B., G.C., T.L., V.R., C.A.R. and A.D. performed the experiments. C.B., T.L., D.S., S.B.L., J.-F.E., E.G. and M.R.W. analyzed the data. C.B. and M.R.W. wrote the manuscript, with input from all authors.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-019-51746-0.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.-A.R.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

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

Article 2

Bibliographies

AG, Oomens, Bevis KP, and Wertz GW. 2006. "The Cytoplasmic Tail of the Human Respiratory Syncytial Virus F Protein Plays Critical Roles in Cellular Localization of the F Protein and Infectious Progeny Production." *Journal of Virology* 80 (21): 10465–77. https://doi.org/10.1128/JVI.01439-06.

Alenquer, Marta, Sílvia Vale-Costa, Temitope Akhigbe Etibor, Filipe Ferreira, Ana Laura Sousa, and Maria João Amorim. 2019. "Influenza A Virus Ribonucleoproteins Form Liquid Organelles at Endoplasmic Reticulum Exit Sites." *Nature Communications 2019 10:1* 10 (1): 1–19. https://doi.org/10.1038/s41467-019-09549-4.

Ali, Iftikhar, and Wei Cai Yang. 2020. "The Functions of Kinesin and Kinesin-Related Proteins in Eukaryotes." *Cell Adhesion & Migration* 14 (1): 139. https://doi.org/10.1080/19336918.2020.1810939.

Amorim, M J., Emily A. Bruce, Eliot K. C. Read, Ágnes Foeglein, Robert Mahen, Amanda D. Stuart, and Paul Digard. 2011. "A Rab11- and Microtubule-Dependent Mechanism for Cytoplasmic Transport of Influenza A Virus Viral RNA." *Journal of Virology* 85 (9): 4143–56. https://doi.org/10.1128/JVI.02606-10.

Amorim, Maria João. 2019. "A Comprehensive Review on the Interaction between the Host GTPase Rab11 and Influenza A Virus." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6: 176. https://doi.org/10.3389/FCELL.2018.00176/BIBTEX.

Araujo, Gabriela C., Ricardo H.T. Silva, Luis P.B. Scott, Alexandre S. Araujo, Fatima P. Souza, and Ronaldo Junio de Oliveira. 2016. "Structure and Functional Dynamics Characterization of the Ion Channel of the Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) Small Hydrophobic Protein (SH) Transmembrane Domain by Combining Molecular Dynamics with Excited Normal Modes." *Journal of Molecular Modeling* 22 (12). https://doi.org/10.1007/S00894-016-3150-6.

Avilov, S. V., D. Moisy, S. Munier, O. Schraidt, N. Naffakh, and S. Cusack. 2012. "Replication-Competent Influenza A Virus That Encodes a Split-Green Fluorescent Protein-Tagged PB2 Polymerase Subunit Allows Live-Cell Imaging of the Virus Life Cycle." *Journal of Virology* 86 (3): 1433–48. https://doi.org/10.1128/JVI.05820-11.

Avilov, S. V., Dorothée Moisy, Nadia Naffakh, and Stephen Cusack. 2012. "Influenza A Virus Progeny VRNP Trafficking in Live Infected Cells Studied with the Virus-Encoded Fluorescently Tagged PB2 Protein." *Vaccine* 30 (51): 7411–17. https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2012.09.077.

Bachi, T. 1988. "Direct Observation of the Budding and Fusion of an Enveloped Virus by Video Microscopy of Viable Cells." *The Journal of Cell Biology* 107 (5): 1689–95. https://doi.org/10.1083/JCB.107.5.1689.

Bächi, T, and C Howe. 1973. "Morphogenesis and Ultrastructure of Respiratory Syncytial Virus." *Journal of Virology* 12 (5): 1173–80. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4128827.

Bajorek, M., L. Caly, K. C. Tran, G. N. Maertens, R. A. Tripp, E. Bacharach, M. N. Teng, R. Ghildyal, and D. A. Jans. 2014. "The Thr205 Phosphorylation Site within Respiratory Syncytial Virus Matrix (M) Protein Modulates M Oligomerization and Virus Production." *Journal of Virology* 88 (11): 6380–93. https://doi.org/10.1128/JVI.03856-13.

Bajorek, M, Galloux M, Richard CA, Szekely O, Rosenzweig R, Sizun C, and Eleouet JF. 2021. "Tetramerization of Phosphoprotein Is Essential for Respiratory Syncytial Virus Budding While Its N Terminal Region Mediates Direct Interactions with the Matrix Protein." *Journal of Virology* 95 (7). https://doi.org/10.1128/JVI.02217-20.

Bajorek, Monika, Marie Galloux, Charles-Adrien Richard, Or Szekely, Rina Rosenzweig, Christina Sizun, and Jean-Francois Eleouet. 2021. "Tetramerization of Phosphoprotein Is Essential for Respiratory Syncytial Virus Budding While Its N Terminal Region Mediates Direct Interactions with the Matrix Protein." *Journal of Virology*, January. https://doi.org/10.1128/JVI.02217-20.

Bakker, Saskia E., Stéphane Duquerroy, Marie Galloux, Colin Loney, Edward Conner, Jean François Eléouet, Félix A. Rey, and David Bhella. 2013. "The Respiratory Syncytial Virus Nucleoprotein-RNA Complex Forms a Left-Handed Helical Nucleocapsid." *Journal of General Virology* 94 (PART8): 1734–38. https://doi.org/10.1099/vir.0.053025-0.

Battles, Michael B., and Jason S. McLellan. 2019. "Respiratory Syncytial Virus Entry and How to Block It." *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/s41579-019-0149-x.

Baviskar, Pradyumna S, Anne L Hotard, Martin L Moore, and Antonius G P Oomens. 2013. "The Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Targets to the Perimeter of Inclusion Bodies and Facilitates Filament Formation by a Cytoplasmic Tail-Dependent Mechanism." *Journal of Virology* 87 (19): 10730–41. https://doi.org/10.1128/JVI.03086-12.

Bermingham, Alison, and Peter L. Collins. 1999. "The M2-2 Protein of Human Respiratory Syncytial Virus Is a Regulatory Factor Involved in the Balance between RNA Replication and Transcription." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (20): 11259–64. https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11259.

Bhagwat, Amar R., Valerie Le Sage, Eric Nturibi, Katarzyna Kulej, Jennifer Jones, Min Guo, Eui Tae Kim, et al. 2020a. "Quantitative Live Cell Imaging Reveals Influenza Virus Manipulation of Rab11A Transport through Reduced Dynein Association." *Nature Communications 2020 11:1* 11 (1): 1–14. https://doi.org/10.1038/s41467-019-13838-3.

———. 2020b. "Quantitative Live Cell Imaging Reveals Influenza Virus Manipulation of Rab11A Transport through Reduced Dynein Association." *Nature Communications* 11 (1). https://doi.org/10.1038/S41467-019-13838-3.

Bitko, Vira, Anja Oldenburg, Nicolle E. Garmon, and Sailen Barik. 2003. "Profilin Is Required for Viral Morphogenesis, Syncytium Formation, and Cell-Specific Stress Fiber Induction by Respiratory Syncytial Virus." *BMC Microbiology* 3 (May): 9. https://doi.org/10.1186/1471-2180-3-9.

Bitko, Vira, Olena Shulyayeva, Barsanjit Mazumder, Alla Musiyenko, Murali Ramaswamy, Dwight C. Look, and Sailen Barik. 2007. "Nonstructural Proteins of Respiratory Syncytial Virus Suppress Premature Apoptosis by an NF-KB-Dependent, Interferon-Independent Mechanism and Facilitate Virus Growth." *Journal of Virology* 81 (4): 1786. https://doi.org/10.1128/JVI.01420-06.

Blanchard, Emmeline L., Molly R. Braun, Aaron W. Lifland, Barbara Ludeke, Sarah L. Noton, Daryll Vanover, Chiara Zurla, Rachel Fearns, and Philip J. Santangelo. 2020. "Polymerase-Tagged Respiratory Syncytial Virus Reveals a Dynamic Rearrangement of the Ribonucleocapsid Complex during Infection." *PLoS Pathogens* 16 (10). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008987.

Blondot, Marie-Lise, Virginie Dubosclard, Jenna Fix, Safa Lassoued, Magali Aumont-Nicaise, François Bontems, Jean-François Eléouët, and Christina Sizun. 2012. "Structure and Functional Analysis of the RNA- and Viral Phosphoprotein-Binding Domain of Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein." *PLoS Pathogens* 8 (5): e1002734. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002734.

Bouchet, Jérôme, Mary W. McCaffrey, Andrea Graziani, and Andrés Alcover. 2016. "The Functional Interplay of Rab11, FIP3 and Rho Proteins on the Endosomal Recycling Pathway Controls Cell Shape and Symmetry." *Https://Doi.Org/10.1080/21541248.2016.1224288* 9 (4): 310–15. https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1224288.

Bouillier, Camille, Gina Cosentino, Thibaut Léger, Vincent Rincheval, Charles-Adrien Richard, Aurore Desquesnes, Delphine Sitterlin, et al. 2019. "The Interactome Analysis of the Respiratory Syncytial Virus Protein M2-1 Suggests a New Role in Viral MRNA Metabolism Post-Transcription." *Scientific Reports 2019 9:1* 9 (1): 1–13. https://doi.org/10.1038/s41598-019-51746-0.

Bouillier, Camille, Vincent Rincheval, Delphine Sitterlin, Sabine Blouquit-Laye, Aurore Desquesnes, Jean-François Eléouët, Elyanne Gault, and Marie-Anne Rameix-Welti. 2019. "Generation, Amplification, and Titration of Recombinant Respiratory Syncytial Viruses." *Journal of Visualized Experiments*, no. 146 (April): e59218.

Braun, Molly R., Sarah L. Noton, Emmeline L. Blanchard, Afzaal Shareef, Philip J. Santangelo, W. Evan Johnson, and Rachel Fearns. 2021. "Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein Associates Non-Specifically with Viral Messenger RNA and with Specific Cellular Messenger RNA Transcripts." *PLOS Pathogens* 17 (5): e1009589. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1009589.

Brock, Sean C, James R Goldenring, James E Crowe, and Jr. 2003. "Apical Recycling Systems Regulate Directional Budding of Respiratory Syncytial Virus from Polarized Epithelial Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (25): 15143–48. https://doi.org/10.1073/pnas.2434327100.

Bruce, Emily A., Amanda Stuart, Mary W. McCaffrey, and Paul Digard. 2012. "Role of the Rab11 Pathway in Negative-Strand Virus Assembly." *Biochemical Society Transactions* 40 (6): 1409–15. https://doi.org/10.1042/BST20120166.

Buglak, Nicholas E., Jennifer Lucitti, Pablo Ariel, Sophie Maiocchi, Francis J. Miller, and Edward S.M. Bahnson. 2021. "Light Sheet Fluorescence Microscopy as a New Method for Unbiased Three-Dimensional Analysis of Vascular Injury." *Cardiovascular Research* 117 (2): 520–32. https://doi.org/10.1093/CVR/CVAA037.

Bukreyev, a, S S Whitehead, B R Murphy, and P L Collins. 1997. "Recombinant Respiratory Syncytial Virus from Which the Entire SH Gene Has Been Deleted Grows Efficiently in Cell Culture and Exhibits Site-Specific Attenuation in the Respiratory Tract of the Mouse." *Journal of Virology* 71 (12): 8973–82.

Burke, Emily, Lesley Dupuy, Cynthia Wall, and Sailen Barik. 1998. "Role of Cellular Actin in the Gene Expression and Morphogenesis of Human Respiratory Syncytial Virus." *Virology* 252 (1): 137–48. https://doi.org/10.1006/VIRO.1998.9471.

Burke, Emily, Nicole M. Mahoney, Steven C. Almo, and Sailen Barik. 2000. "Profilin Is Required for Optimal Actin-Dependent Transcription of Respiratory Syncytial Virus Genome RNA." *Journal of Virology* 74 (2): 669–75. https://doi.org/10.1128/JVI.74.2.669-675.2000.

Cao, D, Y Gao, and B Liang. 2021. "Structural Insights into the Respiratory Syncytial Virus RNA Synthesis Complexes." *Viruses* 13 (5). https://doi.org/10.3390/V13050834.

Cao, Dongdong, Yunrong Gao, Claire Roesler, Samantha Rice, Paul D'Cunha, Lisa Zhuang, Julia Slack, et al. 2020. "Cryo-EM Structure of the Respiratory Syncytial Virus RNA Polymerase." *Nature Communications* 11 (1). https://doi.org/10.1038/s41467-019-14246-3.

Cardone, Christophe, Claire Marie Caseau, Benjamin Bardiaux, Aurélien Thureaux, Marie Galloux, Monika Bajorek, Jean François Eléouët, Marc Litaudon, François Bontems, and Christina Sizun. 2021. "A Structural and Dynamic Analysis of the Partially Disordered Polymerase-Binding Domain in Rsv Phosphoprotein." *Biomolecules* 11 (8): 11. https://doi.org/10.3390/BIOM11081225/S1.

Cartee, Tara L., and Gail W. Wertz. 2001. "Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein Requires Phosphorylation for Efficient Function and Binds Viral RNA during Infection." *Journal of Virology* 75 (24): 12188. https://doi.org/10.1128/JVI.75.24.12188-12197.2001.

Castro Martin, Isabel Fernández de, Guillaume Fournier, Martin Sachse, Javier Pizarro-Cerda, Cristina Risco, and Nadia Naffakh. 2017. "Influenza Virus Genome Reaches the Plasma Membrane via a Modified Endoplasmic Reticulum and Rab11-Dependent Vesicles." *Nature Communications* 8 (1): 1396. https://doi.org/10.1038/s41467-017-01557-6.

Chambers, Raychel, and Toru Takimoto. 2010. "Trafficking of Sendai Virus Nucleocapsids Is Mediated by Intracellular Vesicles." *PLOS ONE* 5 (6): e10994. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0010994.

Chang, Te Hung, Jesus Segovia, Ahmed Sabbah, Victoria Mgbemena, and Santanu Bose. 2012. "Cholesterol-Rich Lipid Rafts Are Required for Release of Infectious Human Respiratory Syncytial Virus Particles." *Virology* 422 (2): 205. https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2011.10.029.

Chatterjee, Srirupa, Priya Luthra, Ekaterina Esaulova, Eugene Agapov, Benjamin C. Yen, Dominika M. Borek, Megan R. Edwards, et al. 2017. "Structural Basis for Human Respiratory Syncytial Virus NS1-Mediated Modulation of Host Responses." *Nature Microbiology* 2 (June): 17101. https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.101.

Chen, MD, M Vazquez, Buonocore L, and Kahn JS. 2000. "Conservation of the Respiratory Syncytial Virus SH Gene." *The Journal of Infectious Diseases* 182 (4): 1228–33. https://doi.org/10.1086/315829.

Chen, Wei, Yan Feng, Dayue Chen, and Angela Wandinger-Ness. 1998. "Rab11 Is Required for Trans-Golgi Network-to-Plasma Membrane Transport and a Preferential Target for GDP Dissociation Inhibitor." *Molecular Biology of the Cell* 9 (11): 3241–57. https://doi.org/10.1091/MBC.9.11.3241/ASSET/IMAGES/LARGE/MK1180734009.JPEG.

Chirkova, T, Boyoglu-Barnum S, Gaston KA, Malik FM, Trau SP, Oomens AG, and Anderson LJ. 2013. "Respiratory Syncytial Virus G Protein CX3C Motif Impairs Human Airway Epithelial and Immune Cell Responses." *Journal of Virology* 87 (24): 13466–79. https://doi.org/10.1128/JVI.01741-13.

Collins, P L, Y T Huang, and G W Wertz. 1984. "Nucleotide Sequence of the Gene Encoding the Fusion (F) Glycoprotein of Human Respiratory Syncytial Virus." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81 (24): 7683–87. https://doi.org/10.1073/PNAS.81.24.7683.

Conley, Michaela J, Judith M Short, Joshua Hutchings, Andrew M Burns, James Streetley, E Saskia, Hussain Jaffery, et al. 2021. "Helical Ordering of Envelope Associated Proteins and Glycoproteins in Respiratory Syncytial Virus Filamentous Virions." https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2021.08.04.455049.

Cuesta, Isabel, Xuehui Geng, Ana Asenjo, and Nieves Villanueva. 2000. "Structural Phosphoprotein M2-1 of the Human Respiratory Syncytial Virus Is an RNA Binding Protein." *Journal of Virology* 74 (21): 9858–67. https://doi.org/10.1128/jvi.74.21.9858-9867.2000.

Das, Subash C., Debasis Nayak, You Zhou, and Asit K. Pattnaik. 2006. "Visualization of Intracellular Transport of Vesicular Stomatitis Virus Nucleocapsids in Living Cells." *Journal of Virology* 80 (13): 6368. https://doi.org/10.1128/JVI.00211-06.

Delevoye, Cédric, Stéphanie Miserey-Lenkei, Guillaume Montagnac, Floriane Gilles-Marsens, Perrine Paul-Gilloteaux, Francesca Giordano, François Waharte, Michael S. Marks, Bruno Goud, and Graça Raposo. 2014. "Recycling Endosome Tubule Morphogenesis from Sorting Endosomes Requires the Kinesin Motor KIF13A." *Cell Reports* 6 (3): 445–54. https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2014.01.002.

Dogterom, Marileen, and Gijsje H. Koenderink. 2018. "Actin–Microtubule Crosstalk in Cell Biology." *Nature Reviews Molecular Cell Biology 2018 20:1* 20 (1): 38–54. https://doi.org/10.1038/s41580-018-0067-1.

Dolnik, Olga, Larissa Kolesnikova, Sonja Welsch, Thomas Strecker, Gordian Schudt, and Stephan Becker. 2014. "Interaction with Tsg101 Is Necessary for the Efficient Transport and Release of Nucleocapsids in Marburg Virus-Infected Cells." *PLoS Pathogens* 10 (10). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1004463.

Dominguez, Roberto, and Kenneth C. Holmes. 2011. "Actin Structure and Function." *Annual Review of Biophysics* 40 (1): 169. https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOPHYS-042910-155359.

Eisfeld, Amie J, Eiryo Kawakami, Tokiko Watanabe, Gabriele Neumann, and Yoshihiro Kawaoka. 2011. "RAB11A Is Essential for Transport of the Influenza Virus Genome to the Plasma Membrane." *Journal of Virology* 85 (13): 6117–26. https://doi.org/10.1128/JVI.00378-11.

Esneau, Camille, Bertrand Raynal, Pierre Roblin, Sébastien Brûlé, Charles Adrien Richard, Jenna Fix, Jean François Eléouët, and Marie Galloux. 2019. "Biochemical Characterization of the Respiratory Syncytial Virus N0-P Complex in Solution." *Journal of Biological Chemistry* 294 (10): 3647–60. https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006453.

Etibor, Temitope Akhigbe, Yohei Yamauchi, and Maria João Amorim. 2021. "Liquid Biomolecular Condensates and Viral Lifecycles: Review and Perspectives." *Viruses 2021, Vol. 13, Page 366* 13 (3): 366. https://doi.org/10.3390/V13030366.

Fan, Guo Huang, Lynne A. Lapierre, James R. Goldenring, Jiqing Sai, and Ann Richmond. 2004. "Rab11-Family Interacting Protein 2 and Myosin Vb Are Required for CXCR2 Recycling and Receptor-Mediated Chemotaxis." *Molecular Biology of the Cell* 15 (5): 2456–69. https://doi.org/10.1091/MBC.E03-09-0706.

Fearns, Rachel, and Peter L. Collins. 1999. "Role of the M2-1 Transcription Antitermination Protein of Respiratory Syncytial Virus in Sequential Transcription." *Journal of Virology* 73 (7): 5852–64. https://doi.org/10.1128/jvi.73.7.5852-5864.1999.

Fehling, Sarah Katharina, Takeshi Noda, Andrea Maisner, Boris Lamp, Karl Klaus Conzelmann, Yoshihiro Kawaoka, Hans Dieter Klenk, Wolfgang Garten, and Thomas Strecker. 2013. "The Microtubule Motor Protein KIF13A Is Involved in Intracellular Trafficking of the Lassa Virus Matrix Protein Z." *Cellular Microbiology* 15 (2): 315–34. https://doi.org/10.1111/CMI.12095.

Feldman, SA, Hendry RM, and Beeler JA. 1999. "Identification of a Linear Heparin Binding Domain for Human Respiratory Syncytial Virus Attachment Glycoprotein G." *Journal of Virology* 73 (8): 6610–17. https://doi.org/10.1128/JVI.73.8.6610-6617.1999.

Fielding, Andrew B., Eric Schonteich, Johanne Matheson, Gayle Wilson, Xinzi Yu, Gilles R.X. Hickson, Sweta Srivastava, Stephen A. Baldwin, Rytis Prekeris, and Gwyn W. Gould. 2005. "Rab11-FIP3 and FIP4 Interact with Arf6 and the Exocyst to Control Membrane Traffic in Cytokinesis." *The EMBO Journal* 24 (19): 3389–99. https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7600803.

Firat-Karalar, Elif Nur, and Matthew D. Welch. 2011. "New Mechanisms and Functions of Actin Nucleation." *Current Opinion in Cell Biology* 23 (1): 4. https://doi.org/10.1016/J.CEB.2010.10.007.

Fleming, Elisa H., Andrey A. Kolokoltsov, Robert A. Davey, Joan E. Nichols, and Norbert J. Roberts. 2006. "Respiratory Syncytial Virus F Envelope Protein Associates with Lipid Rafts without a Requirement for Other Virus Proteins." *Journal of Virology* 80 (24): 12160–70. https://doi.org/10.1128/JVI.00643-06/ASSET/EB30C954-6BC7-4A87-8FE9-C3475285FE6E/ASSETS/GRAPHIC/ZJV0240685120006.JPEG.

Forster, Andreas, Goedele N Maertens, Paul J Farrell, and Monika Bajorek. 2015. "Dimerization of Matrix Protein Is Required for Budding of Respiratory Syncytial Virus." *Journal of Virology* 89 (8): 4624–35. https://doi.org/10.1128/JVI.03500-14.

Fuentes, Sandra, Kim C. Tran, Priya Luthra, Michael N. Teng, and Biao He. 2007. "Function of the Respiratory Syncytial Virus Small Hydrophobic Protein." *Journal of Virology* 81 (15): 8361. https://doi.org/10.1128/JVI.02717-06.

Galloux, Marie, Gaëlle Gabiane, Julien Sourimant, Charles-Adrien Richard, Patrick England, Mohammed Moudjou, Magali Aumont-Nicaise, Jenna Fix, Marie-Anne Rameix-Welti, and Jean-François Eléouët. 2015. "Identification and Characterization of the Binding Site of the Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein to RNA-Free Nucleoprotein." *Journal of Virology* 89 (7): 3484–96. https://doi.org/10.1128/jvi.03666-14.

Galloux, Marie, Jennifer Risso-Ballester, Charles-Adrien Richard, Jenna Fix, Marie-Anne Rameix-Welti, and Jean-François Eléouët. 2020. "Minimal Elements Required for the Formation of Respiratory Syncytial Virus Cytoplasmic Inclusion Bodies In Vivo and In Vitro." *MBio* 11 (5): 1–16. https://doi.org/10.1128/MBIO.01202-20.

Gan, Siok-Wan, Edward Tan, Xin Lin, Dejie Yu, Juejin Wang, Gregory Ming-Yeong Tan, Ardcharaporn Vararattanavech, et al. 2012. "The Small Hydrophobic Protein of the Human Respiratory Syncytial Virus Forms Pentameric Ion Channels." *The Journal of Biological Chemistry* 287 (29): 24671. https://doi.org/10.1074/JBC.M111.332791.

Gao, Yunrong, Dongdong Cao, Shristi Pawnikar, Karen P. John, Hyunjun Max Ahn, Shaylan Hill, Ju Mi Ha, et al. 2020. "Structure of the Human Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein in Complex with a Short Positive-Sense Gene-End RNA." *Structure* 28 (9): 979-990.e4. https://doi.org/10.1016/J.STR.2020.07.001.

Genoyer, Emmanuelle, Katarzyna Kulej, Chuan Tien Hung, Patricia A. Thibault, Kristopher Azarm, Toru Takimoto, Benjamin A. Garcia, et al. 2020. "The Viral Polymerase Complex Mediates the Interaction of Viral Ribonucleoprotein Complexes with Recycling Endosomes during Sendai Virus Assembly." *MBio* 11 (4): 1–20. https://doi.org/10.1128/MBIO.02028-20.

Ghildyal, R, Ho A, Wagstaff KM, Dias MM, Barton CL, Jans P, Bardin P, and Jans DA. 2005. "Nuclear Import of the Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Is Mediated by Importin Beta1 Independent of Importin Alpha." *Biochemistry* 44 (38): 12887–95. https://doi.org/10.1021/BI050701E.

Ghildyal, R, Baulch-Brown C, Mills J, and Meanger J. 2003. "The Matrix Protein of Human Respiratory Syncytial Virus Localises to the Nucleus of Infected Cells and Inhibits Transcription." *Archives of Virology* 148 (7): 1419–29. https://doi.org/10.1007/S00705-003-0112-Y.

Gilman, Morgan S.A., Cheng Liu, Amy Fung, Ishani Behera, Paul Jordan, Peter Rigaux, Nina Ysebaert, et al. 2019. "Structure of the Respiratory Syncytial Virus Polymerase Complex." *Cell* 179 (1): 193-204.e14. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.014.

Goodson, Holly V., and Erin M. Jonasson. 2018. "Microtubules and Microtubule-Associated Proteins." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10 (6). https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A022608.

Goswami, Sayantani, Iyshwarya Balasubramanian, Luca D'Agostino, Sheila Bandyopadhyay, Radha Patel, Shail Avasthi, Shiyan Yu, James R. Goldenring, Edward M. Bonder, and Nan Gao. 2021. "RAB11A-Mediated YAP Localization to Adherens and Tight Junctions Is Essential for Colonic Epithelial Integrity." *The Journal of Biological Chemistry* 297 (1). https://doi.org/10.1016/J.JBC.2021.100848.

Gould, Phillip S., and Andrew J. Easton. 2005. "Coupled Translation of the Respiratory Syncytial Virus M2 Open Reading Frames Requires Upstream Sequences *." *Journal of Biological Chemistry* 280 (23): 21972–80. https://doi.org/10.1074/JBC.M502276200.

Gower, Tara L., Manoj K. Pastey, Mark E. Peeples, Peter L. Collins, Lewis H. McCurdy, Timothy K. Hart,

Alex Guth, Teresa R. Johnson, and Barney S. Graham. 2005. "RhoA Signaling Is Required for Respiratory Syncytial Virus-Induced Syncytium Formation and Filamentous Virion Morphology." *Journal of Virology* 79 (9): 5326–36. https://doi.org/10.1128/JVI.79.9.5326-5336.2005.

Gower, Tara L., Mark E. Peeples, Peter L. Collins, and Barney S. Graham. 2001. "RhoA Is Activated During Respiratory Syncytial Virus Infection." *Virology* 283 (2): 188–96. https://doi.org/10.1006/VIRO.2001.0891.

Griffiths, Cameron D., Leanne M. Bilawchuk, John E. McDonough, Kyla C. Jamieson, Farah Elawar, Yuchen Cen, Wenming Duan, et al. 2020. "IGF1R Is an Entry Receptor for Respiratory Syncytial Virus." *Nature 2020 583:7817* 583 (7817): 615–19. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2369-7.

Grikscheit, Katharina, Olga Dolnik, Yuki Takamatsu, Ana Raquel Pereira, and Stephan Becker. 2020. "Ebola Virus Nucleocapsid-Like Structures Utilize Arp2/3 Signaling for Intracellular Long-Distance Transport." *Cells* 9 (7). https://doi.org/10.3390/CELLS9071728.

Guern, Florent Le, Vanessa Mussard, Anne Gaucher, Martin Rottman, and Damien Prim. 2020. "Fluorescein Derivatives as Fluorescent Probes for PH Monitoring along Recent Biological Applications." *International Journal of Molecular Sciences* 21 (23): 1–23. https://doi.org/10.3390/IJMS21239217.

Guhathakurta, Piyali, Ewa Prochniewicz, and David D. Thomas. 2018. "Actin-Myosin Interaction: Structure, Function and Drug Discovery." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (9). https://doi.org/10.3390/IJMS19092628.

Gupta, Chhitar M., Bindu Ambaru, and Rani Bajaj. 2020. "Emerging Functions of Actins and Actin Binding Proteins in Trypanosomatids." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8 (October): 1109. https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.587685/BIBTEX.

Hales, Chadwick M., Jean Pierre Vaerman, and James R. Goldenring. 2002. "Rab11 Family Interacting Protein 2 Associates with Myosin Vb and Regulates Plasma Membrane Recycling." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (52): 50415–21. https://doi.org/10.1074/JBC.M209270200.

Hallak, LK, SA Kwilas, and ME Peeples. 2007. "Interaction between Respiratory Syncytial Virus and Glycosaminoglycans, Including Heparan Sulfate." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 379: 15–34. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-393-6_2.

Han, Julianna, Ketaki Ganti, Veeresh Kumar Sali, Carly Twigg, Yifeng Zhang, Senthamizharasi Manivasagam, Chieh Yu Liang, et al. 2021. "Host Factor Rab11a Is Critical for Efficient Assembly of Influenza A Virus Genomic Segments." *PLOS Pathogens* 17 (5): e1009517. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1009517.

Herrmann, Harald, and Ueli Aebi. 2016. "Intermediate Filaments: Structure and Assembly." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (11). https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A018242.

Hervé, Jean Claude, and Nicolas Bourmeyster. 2018. "Rab GTPases, Master Controllers of Eukaryotic Trafficking." *Small GTPases* 9 (1–2): 1–4. https://doi.org/10.1080/21541248.2018.1428853.

Hirschberg, Koret, Chad M. Miller, Jan Ellenberg, John F. Presley, Eric D. Siggia, Robert D. Phair, and Jennifer Lippincott-Schwartz. 1998. "Kinetic Analysis of Secretory Protein Traffic and Characterization of Golgi to Plasma Membrane Transport Intermediates in Living Cells." *The Journal of Cell Biology* 143 (6): 1485–1503. https://doi.org/10.1083/JCB.143.6.1485.

Holzwarth, George, Arnav Bhandari, Lucas Tommervik, Jed C. Macosko, David A. Ornelles, and Douglas S. Lyles. 2020. "Vesicular Stomatitis Virus Nucleocapsids Diffuse through Cytoplasm by Hopping from Trap to Trap in Random Directions." *Scientific Reports* 10 (1). https://doi.org/10.1038/S41598-020-66942-6.

Horgan, Conor P., Sara R. Hanscom, Rushee S. Jolly, Clare E. Futter, and Mary W. McCaffrey. 2010a. "Rab11-FIP3 Links the Rab11 GTPase and Cytoplasmic Dynein to Mediate Transport to the Endosomal-Recycling Compartment." *Journal of Cell Science* 123 (Pt 2): 181–91. https://doi.org/10.1242/JCS.052670.

———. 2010b. "Rab11-FIP3 Binds Dynein Light Intermediate Chain 2 and Its Overexpression Fragments the Golgi Complex." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 394 (2): 387–92. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2010.03.028.

Horgan, Conor P., and Mary W. McCaffrey. 2009. "The Dynamic Rab11-FIPs." In *Biochemical Society Transactions*, 37:1032–36. Portland Press. https://doi.org/10.1042/BST0371032.

Horgan, Conor P., Melanie Walsh, Tomas H. Zurawski, and Mary W. McCaffrey. 2004. "Rab11-FIP3 Localises to a Rab11-Positive Pericentrosomal Compartment during Interphase and to the Cleavage Furrow during Cytokinesis." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 319 (1): 83–94. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2004.04.157.

Huang, Li Li, and Hai Yan Xie. 2014. "Progress on the Labeling and Single-Particle Tracking Technologies of Viruses." *The Analyst* 139 (13): 3336–46. https://doi.org/10.1039/C4AN00038B.

Hutagalung, Alex H., and Peter J. Novick. 2011. "Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology." *Physiological Reviews* 91 (1): 119–49. https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00059.2009.

Janke, Carsten, and Guillaume Montagnac. 2017. "Causes and Consequences of Microtubule Acetylation." *Current Biology* 27 (23): R1287–92. https://doi.org/10.1016/J.CUB.2017.10.044.

Jeffree, Chris E., Gaie Brown, Jim Aitken, Dawn Yeo Su-Yin, Boon Huan Tan, and Richard J. Sugrue. 2007. "Ultrastructural Analysis of the Interaction between F-Actin and Respiratory Syncytial Virus during Virus Assembly." *Virology* 369 (2): 309–23. https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2007.08.007.

Jenni, Simon, Louis Marie Bloyet, Ruben Diaz-Avalos, Bo Liang, Sean P.J. Whelan, Nikolaus Grigorieff, and Stephen C. Harrison. 2020. "Structure of the Vesicular Stomatitis Virus L Protein in Complex with Its Phosphoprotein Cofactor." *Cell Reports* 30 (1): 53-60.e5. https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2019.12.024.

Jin, Min, and James R. Goldenring. 2006. "The Rab11-FIP1/RCP Gene Codes for Multiple Protein Transcripts Related to the Plasma Membrane Recycling System." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1759 (6): 281–95. https://doi.org/10.1016/J.BBAEXP.2006.06.001.

Jing, Jian, and Rytis Prekeris. 2009. "Polarized Endocytic Transport: The Roles of Rab11 and Rab11-FIPs in Regulating Cell Polarity." *Histology and Histopathology* 24 (9): 1171–80. https://doi.org/10.14670/HH-24.1171.

Jing, Jian, Elizabeth Tarbutton, Gayle Wilson, and Rytis Prekeris. 2009. "Rab11-FIP3 Is a Rab11-Binding Protein That Regulates Breast Cancer Cell Motility by Modulating the Actin Cytoskeleton." *European Journal of Cell Biology* 88 (6): 325–41. https://doi.org/10.1016/J.EJCB.2009.02.186.

Jo, Shuichi, Atsushi Kawaguchi, Naoki Takizawa, Yuko Morikawa, Fumitaka Momose, and Kyosuke Nagata. 2010. "Involvement of Vesicular Trafficking System in Membrane Targeting of the Progeny Influenza Virus Genome." *Microbes and Infection* 12 (12–13): 1079–84. https://doi.org/10.1016/J.MICINF.2010.06.011.

Jones, Harrison G., Michael B. Battles, Chun Chi Lin, Siro Bianchi, Davide Corti, and Jason S. McLellan. 2019. "Alternative Conformations of a Major Antigenic Site on RSV F." *PLoS Pathogens* 15 (7). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007944.

Kahn, JS, Schnell MJ, Buonocore L, and Rose JK. 1999. "Recombinant Vesicular Stomatitis Virus

Expressing Respiratory Syncytial Virus (RSV) Glycoproteins: RSV Fusion Protein Can Mediate Infection and Cell Fusion." *Virology* 254 (1): 81–91. https://doi.org/10.1006/VIRO.1998.9535.

Kallewaard, Nicole L., Amber L. Bowen, and James E. Crowe. 2005. "Cooperativity of Actin and Microtubule Elements during Replication of Respiratory Syncytial Virus." *Virology* 331 (1): 73–81. https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2004.10.010.

Karron, RA, DA Buonagurio, Georgiu AF, Whitehead SS, Adamus JE, Clements-Mann ML, Harris DO, et al. 1997. "Respiratory Syncytial Virus (RSV) SH and G Proteins Are Not Essential for Viral Replication in Vitro: Clinical Evaluation and Molecular Characterization of a Cold-Passaged, Attenuated RSV Subgroup B Mutant." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (25): 13961–66. https://doi.org/10.1073/PNAS.94.25.13961.

Katoh, Hiroshi, Yuichiro Nakatsu, Toru Kubota, Masafumi Sakata, Makoto Takeda, and Minoru Kidokoro. 2015. "Mumps Virus Is Released from the Apical Surface of Polarized Epithelial Cells, and the Release Is Facilitated by a Rab11-Mediated Transport System." *Journal of Virology* 89 (23): 12026–34. https://doi.org/10.1128/JVI.02048-15.

Kawaguchi, Atsushi, Mikako Hirohama, Yoshimi Harada, Suguru Osari, and Kyosuke Nagata. 2015. "Influenza Virus Induces Cholesterol-Enriched Endocytic Recycling Compartments for Budozone Formation via Cell Cycle-Independent Centrosome Maturation." *PLOS Pathogens* 11 (11): e1005284. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1005284.

Ke, Zunlong, Rebecca S. Dillard, Tatiana Chirkova, Fredrick Leon, Christopher C. Stobart, Cheri M. Hampton, Joshua D. Strauss, et al. 2018. "The Morphology and Assembly of Respiratory Syncytial Virus Revealed by Cryo-Electron Tomography." *Viruses* 10 (8): 446. https://doi.org/10.3390/v10080446.

Kearney, Aoife Mairead, and Amir Rafiq Khan. 2020. "Crystal Structure of the Rab-Binding Domain of Rab11 Family-Interacting Protein 2." *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications* 76 (Pt 8): 357–63. https://doi.org/10.1107/S2053230X20009164.

Kikuchi, A., T. Yamashita, M. Kawata, K. Yamamoto, K. Ikeda, T. Tanimoto, and Y. Takai. 1988. "Purification and Characterization of a Novel GTP-Binding Protein with a Molecular Weight of 24,000 from Bovine Brain Membranes." *Journal of Biological Chemistry* 263 (6): 2897–2904. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)69153-7.

King, Tiffany, Asuncion Mejias, Octavio Ramilo, and Mark E. Peeples. 2021. "The Larger Attachment Glycoprotein of Respiratory Syncytial Virus Produced in Primary Human Bronchial Epithelial Cultures Reduces Infectivity for Cell Lines." *PLOS Pathogens* 17 (4): e1009469. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1009469.

Kipper, Sarit, Samar Hamad, Leon Caly, Dorit Avrahami, Eran Bacharach, David A. Jans, Doron Gerber, and Monika Bajorek. 2015. "New Host Factors Important for Respiratory Syncytial Virus (RSV) Replication Revealed by a Novel Microfluidics Screen for Interactors of Matrix (M) Protein." *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 14 (3): 532. https://doi.org/10.1074/MCP.M114.044107.

Kiss, G., J. M. Holl, G. M. Williams, E. Alonas, D. Vanover, A. W. Lifland, M. Gudheti, et al. 2014. "Structural Analysis of Respiratory Syncytial Virus Reveals the Position of M2-1 between the Matrix Protein and the Ribonucleoprotein Complex." *Journal of Virology* 88 (13): 7602–17. https://doi.org/10.1128/jvi.00256-14.

Kitano, Masato, Yasuhiko Kizuka, Tomoaki Sobajima, Miyako Nakano, Kazuki Nakajima, Ryo Misaki, Saki Itoyama, et al. 2021. "Rab11-Mediated Post-Golgi Transport of the Sialyltransferase ST3GAL4 Suggests a New Mechanism for Regulating Glycosylation." *Journal of Biological Chemistry* 296 (January): 100354. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100354.

Kolokoltsov, Andrey A., Drew Deniger, Elisa H. Fleming, Norbert J. Roberts, Jon M. Karpilow, and Robert A. Davey. 2007. "Small Interfering RNA Profiling Reveals Key Role of Clathrin-Mediated Endocytosis and Early Endosome Formation for Infection by Respiratory Syncytial Virus." *Journal of Virology* 81 (14): 7786–7800. https://doi.org/10.1128/JVI.02780-06.

Köster, Sarah, David A. Weitz, Robert D. Goldman, Ueli Aebi, and Harald Herrmann. 2015. "Intermediate Filament Mechanics in Vitro and in the Cell: From Coiled Coils to Filaments, Fibers and Networks." *Current Opinion in Cell Biology* 32 (February): 82–91. https://doi.org/10.1016/J.CEB.2015.01.001.

Krendel, Mira, and Mark S. Mooseker. 2005. "Myosins: Tails (and Heads) of Functional Diversity." *Physiology (Bethesda, Md.)* 20 (4): 239–51. https://doi.org/10.1152/PHYSIOL.00014.2005.

Krishnan, Kannan, and Pierre D.J. Moens. 2009. "Structure and Functions of Profilins." *Biophysical Reviews* 1 (2): 71. https://doi.org/10.1007/S12551-009-0010-Y.

Krzyzaniak, Magdalena Anna, Michael Thomas Zumstein, Juan Atilio Gerez, Paola Picotti, and Ari Helenius. 2013. "Host Cell Entry of Respiratory Syncytial Virus Involves Macropinocytosis Followed by Proteolytic Activation of the F Protein." *PLoS Pathogens* 9 (4). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003309.

Kuo, L, Grosfeld H, Cristina J, Hill MG, and Collins PL. 1996. "Effects of Mutations in the Gene-Start and Gene-End Sequence Motifs on Transcription of Monocistronic and Dicistronic Minigenomes of Respiratory Syncytial Virus." *Journal of Virology* 70 (10): 6892–6901. https://doi.org/10.1128/JVI.70.10.6892-6901.1996.

Lakdawala, Seema S., Yicong Wu, Peter Wawrzusin, Juraj Kabat, Andrew J. Broadbent, Elaine W. Lamirande, Ervin Fodor, Nihal Altan-Bonnet, Hari Shroff, and Kanta Subbarao. 2014. "Influenza A Virus Assembly Intermediates Fuse in the Cytoplasm." *PLOS Pathogens* 10 (3): e1003971. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1003971.

Lapierre, Lynne A., Kenya M. Avant, Cathy M. Caldwell, Asli Oztan, Gerard Apodaca, Byron C. Knowles, Joseph T. Roland, Nicole A. Ducharme, and James R. Goldenring. 2012. "Phosphorylation of Rab11-FIP2 Regulates Polarity in MDCK Cells." *Molecular Biology of the Cell* 23 (12): 2302–18. https://doi.org/10.1091/MBC.E11-08-0681.

Lawrence, Carolyn J., R. Kelly Dawe, Karen R. Christie, Don W. Cleveland, Scott C. Dawson, Sharyn A. Endow, Lawrence S.B. Goldstein, et al. 2004. "A Standardized Kinesin Nomenclature." *The Journal of Cell Biology* 167 (1): 19. https://doi.org/10.1083/JCB.200408113.

Levine, S, R Klaiber-Franco, and PR Paradiso. 1987. "Demonstration That Glycoprotein G Is the Attachment Protein of Respiratory Syncytial Virus." *The Journal of General Virology* 68 (Pt 9) (9): 2521–24. https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-9-2521.

Li, Yan, To Janet, Verdià-Baguena C, Dossena S, Surya W, Huang M, Paulmichl M, Liu DX, Aguilella VM, and Torres J. 2014. "Inhibition of the Human Respiratory Syncytial Virus Small Hydrophobic Protein and Structural Variations in a Bicelle Environment." *Journal of Virology* 88 (20): 11899–914. https://doi.org/10.1128/JVI.00839-14.

Liang, Bo. 2020. "Structures of the Mononegavirales Polymerases." *Journal of Virology* 94 (22). https://doi.org/10.1128/JVI.00175-20.

Liang, Bo, Zongli Li, Simon Jenni, Amal A. Rahmeh, Benjamin M. Morin, Tim Grant, Nikolaus Grigorieff, Stephen C. Harrison, and Sean P.J. Whelan. 2015. "Structure of the L-Protein of Vesicular Stomatitis Virus from Electron Cryomicroscopy." *Cell* 162 (2): 314. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.06.018.

Liesman, Rachael M, Ursula J Buchholz, Cindy L Luongo, Lijuan Yang, Alan D Proia, John P DeVincenzo,

Peter L Collins, and Raymond J Pickles. 2014. "RSV-Encoded NS2 Promotes Epithelial Cell Shedding and Distal Airway Obstruction." *The Journal of Clinical Investigation* 124 (5): 2219–33. https://doi.org/10.1172/JCI72948.

Lifland, Aaron W, Jeenah Jung, Eric Alonas, Chiara Zurla, James E Crowe, and Philip J Santangelo. 2012. "Human Respiratory Syncytial Virus Nucleoprotein and Inclusion Bodies Antagonize the Innate Immune Response Mediated by MDA5 and MAVS." *Journal of Virology* 86 (15): 8245–58. https://doi.org/10.1128/JVI.00215-12.

Liljeroos, Lassi, Magdalena Anna Krzyzaniak, Ari Helenius, and Sarah Jane Butcher. 2013. "Architecture of Respiratory Syncytial Virus Revealed by Electron Cryotomography." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (27): 11133–38. https://doi.org/10.1073/pnas.1309070110.

Lillemeier, Björn F., Janet R. Pfeiffer, Zurab Surviladze, Bridget S. Wilson, and Mark M. Davis. 2006. "Plasma Membrane-Associated Proteins Are Clustered into Islands Attached to the Cytoskeleton." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (50): 18992–97. https://doi.org/10.1073/PNAS.0609009103.

Lin, Meng Liang, Yao Cheng Lu, Hung Yi Chen, Chuan Chun Lee, Jing Gung Chung, and Shih Shun Chen. 2014. "Suppressing the Formation of Lipid Raft-Associated Rac1/PI3K/Akt Signaling Complexes by Curcumin Inhibits SDF-1α-Induced Invasion of Human Esophageal Carcinoma Cells." *Molecular Carcinogenesis* 53 (5): 360–79. https://doi.org/10.1002/MC.21984.

Lindsay, Andrew J., and Mary W. McCaffrey. 2002. "Rab11-FIP2 Functions in Transferrin Recycling and Associates with Endosomal Membranes via Its COOH-Terminal Domain." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (30): 27193–99. https://doi.org/10.1074/JBC.M200757200.

Liu, Shu Lin, Zhi Gang Wang, Hai Yan Xie, An An Liu, Don C. Lamb, and Dai Wen Pang. 2020. "Single-Virus Tracking: From Imaging Methodologies to Virological Applications." *Chemical Reviews* 120 (3): 1936–79. https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.9B00692.

Lo, Mindy S., Robert M. Brazas, and Michael J. Holtzman. 2005. "Respiratory Syncytial Virus Nonstructural Proteins NS1 and NS2 Mediate Inhibition of Stat2 Expression and Alpha/Beta Interferon Responsiveness." *Journal of Virology* 79 (14): 9315. https://doi.org/10.1128/JVI.79.14.9315-9319.2005.

Lock, John G., and Jennifer L. Stow. 2005. "Rab11 in Recycling Endosomes Regulates the Sorting and Basolateral Transport of E-Cadherin." *Molecular Biology of the Cell* 16 (4): 1744–55. https://doi.org/10.1091/MBC.E04-10-0867/ASSET/IMAGES/LARGE/ZMK0040531130007.JPEG.

Ludwig, Alexander, Tra Huong Nguyen, Daniel Leong, Laxmi Iyer Ravi, Boon Huan Tan, Sara Sandin, and Richard J. Sugrue. 2017. "Caveolae Provide a Specialized Membrane Environment for Respiratory Syncytial Virus Assembly." *Journal of Cell Science* 130 (6): 1037. https://doi.org/10.1242/JCS.198853.

Machesky, Laura M. 2019. "Rab11FIP Proteins Link Endocytic Recycling Vesicles for Cytoskeletal Transport and Tethering." *Bioscience Reports* 39 (1). https://doi.org/10.1042/BSR20182219.

Martínez, Isidoro, Luis Lombardía, Blanco García-Barreno, Orlando Domínguez, and José A. Melero. 2007. "Distinct Gene Subsets Are Induced at Different Time Points after Human Respiratory Syncytial Virus Infection of A549 Cells." *The Journal of General Virology* 88 (Pt 2): 570–81. https://doi.org/10.1099/VIR.0.82187-0.

Marty, A., J. Meanger, J. Mills, B. Shields, and R. Ghildyal. 2003. "Association of Matrix Protein of Respiratory Syncytial Virus with the Host Cell Membrane of Infected Cells." *Archives of Virology 2003 149:1* 149 (1): 199–210. https://doi.org/10.1007/S00705-003-0183-9.

Mastrangelo, Peter, Allysia A. Chin, Stephanie Tan, Amy H. Jeon, Cameron A. Ackerley, Karen K. Siu, Jeffrey E. Lee, and Richard G. Hegele. 2021. "Identification of RSV Fusion Protein Interaction Domains on the Virus Receptor, Nucleolin." *Viruses* 13 (2). https://doi.org/10.3390/V13020261.

Matsuzaki, Fumiko, Michiko Shirane, Masaki Matsumoto, and Keiichi I. Nakayama. 2011. "Protrudin Serves as an Adaptor Molecule That Connects KIF5 and Its Cargoes in Vesicular Transport during Process Formation." *Molecular Biology of the Cell* 22 (23): 4602–20. https://doi.org/10.1091/MBC.E11-01-0068/ASSET/IMAGES/LARGE/4602FIG11.JPEG.

McCurdy, Lewis H., and Barney S. Graham. 2003. "Role of Plasma Membrane Lipid Microdomains in Respiratory Syncytial Virus Filament Formation." *Journal of Virology* 77 (3): 1747. https://doi.org/10.1128/JVI.77.3.1747-1756.2003.

McLellan, Jason S., William C. Ray, and Mark E. Peeples. 2013. "Structure and Function of Respiratory Syncytial Virus Surface Glycoproteins." In *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 372:83–104. NIH Public Access. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38919-1_4.

McRae, Rebecca, Lynne A. Lapierre, Elizabeth H. Manning, and James R. Goldenring. 2017. "Rab11-FIP1 Phosphorylation by MARK2 Regulates Polarity in MDCK Cells." *Cellular Logistics* 7 (1): e1271498. https://doi.org/10.1080/21592799.2016.1271498.

Mehedi, Masfique, Thomas McCarty, Scott E. Martin, Cyril Le Nouën, Eugen Buehler, Yu-Chi Chen, Margery Smelkinson, et al. 2016. "Actin-Related Protein 2 (ARP2) and Virus-Induced Filopodia Facilitate Human Respiratory Syncytial Virus Spread." *PLOS Pathogens* 12 (12): e1006062. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1006062.

Mermall, Valerie, Penny L. Post, and Mark S. Mooseker. 1998. "Unconventional Myosins in Cell Movement, Membrane Traffic, and Signal Transduction." *Science (New York, N.Y.)* 279 (5350): 527–33. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.279.5350.527.

Meshram, Chetan D, Pradyumna S Baviskar, Cherie M Ognibene, and Antonius G P Oomens. 2016. "The Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein, Matrix Protein, and Fusion Protein Carboxy-Terminal Domain Drive Efficient Filamentous Virus-Like Particle Formation." *Journal of Virology* 90 (23): 10612–28. https://doi.org/10.1128/JVI.01193-16.

Mitra, Ruchira, Pradyumna Baviskar, Rebecca R Duncan-Decocq, Darshna Patel, and Antonius G P Oomens. 2012. "The Human Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Is Required for Maturation of Viral Filaments." *Journal of Virology* 86 (8): 4432–43. https://doi.org/10.1128/JVI.06744-11.

Momose, Fumitaka, Yuji Kikuchi, Katsuhiro Komase, and Yuko Morikawa. 2007. "Visualization of Microtubule-Mediated Transport of Influenza Viral Progeny Ribonucleoprotein." *Microbes and Infection* 9 (12–13): 1422–33. https://doi.org/10.1016/J.MICINF.2007.07.007.

Momose, Fumitaka, Tetsuya Sekimoto, Takashi Ohkura, Shuichi Jo, Atsushi Kawaguchi, Kyosuke Nagata, and Yuko Morikawa. 2011. "Apical Transport of Influenza A Virus Ribonucleoprotein Requires Rab11-Positive Recycling Endosome." *PLoS ONE* 6 (6): e21123. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021123.

Money, Victoria A., Helen K. McPhee, Jackie A. Mosely, John M. Sanderson, and Robert P. Yeo. 2009. "Surface Features of a Mononegavirales Matrix Protein Indicate Sites of Membrane Interaction." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (11): 4441. https://doi.org/10.1073/PNAS.0805740106.

Mufson, M A, C Orvell, B Rafnar, and E Norrby. 1985. "Two Distinct Subtypes of Human Respiratory Syncytial Virus." *The Journal of General Virology* 66 (Pt 10 (October): 2111–24. https://doi.org/10.1099/0022-1317-66-10-2111.

Munday, Diane C., Weining Wu, Nikki Smith, Jenna Fix, Sarah Louise Noton, Marie Galloux, Olivier Touzelet, et al. 2015. "Interactome Analysis of the Human Respiratory Syncytial Virus RNA Polymerase Complex Identifies Protein Chaperones as Important Cofactors That Promote L-Protein Stability and RNA Synthesis." *Journal of Virology* 89 (2): 917. https://doi.org/10.1128/JVI.01783-14.

Muto, Akihiko, Yutaka Aoki, and Sumiko Watanabe. 2007. "Mouse Rab11-FIP4 Regulates Proliferation and Differentiation of Retinal Progenitors in a Rab11-Independent Manner." *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists* 236 (1): 214–25. https://doi.org/10.1002/DVDY.21009.

Nakatsu, Yuichiro, Xuemin Ma, Fumio Seki, Tadaki Suzuki, Masaharu Iwasaki, Yusuke Yanagi, Katsuhiro Komase, and Makoto Takeda. 2013. "Intracellular Transport of the Measles Virus Ribonucleoprotein Complex Is Mediated by Rab11A-Positive Recycling Endosomes and Drives Virus Release from the Apical Membrane of Polarized Epithelial Cells." *Journal of Virology* 87 (8): 4683. https://doi.org/10.1128/JVI.02189-12.

Nanbo, Asuka, and Yusuke Ohba. 2018. "Budding of Ebola Virus Particles Requires the Rab11-Dependent Endocytic Recycling Pathway." *Journal of Infectious Diseases* 218 (Suppl 5): S388–96. https://doi.org/10.1093/infdis/jiy460.

Nevers, Quentin, Aurélie A. Albertini, Cécile Lagaudrière-Gesbert, and Yves Gaudin. 2020. "Negri Bodies and Other Virus Membrane-Less Replication Compartments." *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* 1867 (12): 118831. https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2020.118831.

Noiron, Juliette de, Marion Hoareau, Jessie Colin, and Isabelle Guénal. 2021. "Apoptosis Quantification in Tissue: Development of a Semi-Automatic Protocol and Assessment of Critical Steps of Image Processing." *Biomolecules* 11 (10): 1523. https://doi.org/10.3390/BIOM11101523/S1.

Norrby, Erling, Halyna Marusyk, and Claes Örvell. 1970. "Morphogenesis of Respiratory Syncytial Virus in a Green Monkey Kidney Cell Line (Vero)." *Journal of Virology* 6 (2): 237. https://doi.org/10.1128/jvi.6.2.237-242.1970.

Novak, Igor L., Pavel Kraikivski, and Boris M. Slepchenko. 2009. "Diffusion in Cytoplasm: Effects of Excluded Volume Due to Internal Membranes and Cytoskeletal Structures." *Biophysical Journal* 97 (3): 758. https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2009.05.036.

Ogino, Tomoaki, and Todd J. Green. 2019. "RNA Synthesis and Capping by Non-Segmented Negative Strand RNA Viral Polymerases: Lessons From a Prototypic Virus." *Frontiers in Microbiology* 10 (JULY). https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01490.

Pasqualato, Sebastiano, Francesca Senic-Matuglia, Louis Renault, Bruno Goud, Jean Salamero, and Jacqueline Cherfils. 2004. "The Structural GDP/GTP Cycle of Rab11 Reveals a Novel Interface Involved in the Dynamics of Recycling Endosomes." *Journal of Biological Chemistry* 279 (12): 11480–88. https://doi.org/10.1074/jbc.M310558200.

Pastey, Manoj K., James E. Crowe, Jr., and Barney S. Graham. 1999. "RhoA Interacts with the Fusion Glycoprotein of Respiratory Syncytial Virus and Facilitates Virus-Induced Syncytium Formation." *Journal of Virology* 73 (9): 7262. https://doi.org/10.1128/jvi.73.9.7262-7270.1999.

Peden, Andrew A., Eric Schonteich, John Chun, Jagath R. Junutula, Richard H. Scheller, and Rytis Prekeris. 2004. "The RCP-Rab11 Complex Regulates Endocytic Protein Sorting." *Molecular Biology of the Cell* 15 (8): 3530–41. https://doi.org/10.1091/MBC.E03-12-0918.

Pereira, Nelson, Christophe Cardone, Safa Lassoued, Marie Galloux, Jenna Fix, Nadine Assrir, Ewen Lescop, François Bontems, Jean François Eléouët, and Christina Sizun. 2017. "New Insights into Structural Disorder in Human Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein and Implications for

Binding of Protein Partners." *Journal of Biological Chemistry* 292 (6): 2120–31. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.765958.

Pfeffer, Suzanne R. 2005. "Structural Clues to Rab GTPase Functional Diversity." *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier. https://doi.org/10.1074/jbc.R500003200.

Piedra, Felipe-Andrés, Xueting Qiu, Michael N. Teng, Vasanthi Avadhanula, Annette A. Machado, Do-Kyun Kim, James Hixson, Justin Bahl, and Pedro A. Piedra. 2020. "Non-Gradient and Genotype-Dependent Patterns of RSV Gene Expression." *PLOS ONE* 15 (1): e0227558. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0227558.

Pollard, Thomas D. 2016. "Actin and Actin-Binding Proteins." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (8). https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A018226.

Pylypenko, Olena, Hussein Hammich, I. Mei Yu, and Anne Houdusse. 2018. "Rab GTPases and Their Interacting Protein Partners: Structural Insights into Rab Functional Diversity." *Small GTPases* 9 (1–2): 22–48. https://doi.org/10.1080/21541248.2017.1336191.

R, Ghildyal, Mills J, Murray M, Vardaxis N, and Meanger J. 2002. "Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Associates with Nucleocapsids in Infected Cells." *The Journal of General Virology* 83 (Pt 4): 753–57. https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-4-753.

Radhakrishnan, Anuradha, Dawn Yeo, Gaie Brown, Myint Zu Myaing, Laxmi Ravi Iyer, Roland Fleck, Boon Huan Tan, et al. 2010. "Protein Analysis of Purified Respiratory Syncytial Virus Particles Reveals an Important Role for Heat Shock Protein 90 in Virus Particle Assembly." *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 9 (9): 1829. https://doi.org/10.1074/MCP.M110.001651.

Rameix-Welti, MA, and E Gault. 2017. "Le Virus Respiratoire Syncytial (VRS) : État Actuel Des Connaissances."

Rameix-Welti, MA, Ronan Le Goffic, Pierre-Louis Hervé, Julien Sourimant, Aude Rémot, Sabine Riffault, Qin Yu, Marie Galloux, Elyanne Gault, and Jean-François Eléouët. 2014. "Visualizing the Replication of Respiratory Syncytial Virus in Cells and in Living Mice." *Nature Communications* 5 (January): 5104. https://doi.org/10.1038/ncomms6104.

Ramos-Nascimento, Ana, Bárbara Kellen, Filipe Ferreira, Marta Alenquer, Sílvia Vale-Costa, Graça Raposo, Cédric Delevoye, and Maria João Amorim. 2017. "KIF13A Mediates Trafficking of Influenza A Virus Ribonucleoproteins." *Journal of Cell Science* 130 (23): 4038–50. https://doi.org/10.1242/jcs.210807.

Ravi, Laxmi Iyer, Timothy J. Tan, Boon Huan Tan, and Richard J. Sugrue. 2021. "Virus-Induced Activation of the Rac1 Protein at the Site of Respiratory Syncytial Virus Assembly Is a Requirement for Virus Particle Assembly on Infected Cells." *Virology* 557 (May): 86–99. https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2021.02.008.

Ray, R, Hoft DF, Meyer K, Brown R, Lagging LM, and Belshe RB. 2001. "Immunoregulatory Role of Secreted Glycoprotein G from Respiratory Syncytial Virus." *Virus Research* 75 (2): 147–54. https://doi.org/10.1016/S0168-1702(01)00237-4.

Reck-Peterson, Samara L., William B. Redwine, Ronald D. Vale, and Andrew P. Carter. 2018. "The Cytoplasmic Dynein Transport Machinery and Its Many Cargoes." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 19 (6): 382. https://doi.org/10.1038/S41580-018-0004-3.

Richard, Charles Adrien, Vincent Rincheval, Safa Lassoued, Jenna Fix, Christophe Cardone, Camille Esneau, Sergei Nekhai, et al. 2018. "RSV Hijacks Cellular Protein Phosphatase 1 to Regulate M2-1 Phosphorylation and Viral Transcription." *PLoS Pathogens* 14 (2). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006920.

Rincheval, Vincent, Mickael Lelek, Elyanne Gault, Camille Bouillier, Delphine Sitterlin, Sabine Blouquit-Laye, Marie Galloux, Christophe Zimmer, Jean-François Eleouet, and Marie-Anne Rameix-Welti. 2017a. "Functional Organization of Cytoplasmic Inclusion Bodies in Cells Infected by Respiratory Syncytial Virus." *Nature Communications* 8 (1): 563. https://doi.org/10.1038/s41467-017-00655-9.

Rincheval, Vincent, Mickael Lelek, Elyanne Gault, Camille Bouillier, Delphine Sitterlin, Sabine Blouquit-Laye, Marie Galloux, Christophe Zimmer, Jean François Eleouet, and Marie Anne Rameix-Welti. 2017b. "Functional Organization of Cytoplasmic Inclusion Bodies in Cells Infected by Respiratory Syncytial Virus." *Nature Communications* 8 (1). https://doi.org/10.1038/s41467-017-00655-9.

Risso-Ballester, Jennifer, Marie Galloux, Jingjing Cao, Ronan Le Goffic, Fortune Hontonnou, Aude Jobart-Malfait, Aurore Desquesnes, et al. 2021. "A Condensate-Hardening Drug Blocks RSV Replication in Vivo." *Nature 2021 595:7868* 595 (7868): 596–99. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03703-z.

Rixon, HWM, G Brown, Aitken J, McDonald T, Graham S, and Sugrue RJ. 2004. "The Small Hydrophobic (SH) Protein Accumulates within Lipid-Raft Structures of the Golgi Complex during Respiratory Syncytial Virus Infection." *The Journal of General Virology* 85 (Pt 5): 1153–65. https://doi.org/10.1099/VIR.0.19769-0.

Roberts, Anthony J., Takahide Kon, Peter J. Knight, Kazuo Sutoh, and Stan A. Burgess. 2013. "Functions and Mechanics of Dynein Motor Proteins." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 14 (11): 713. https://doi.org/10.1038/NRM3667.

Roberts, SR, Lichtenstein D, Ball LA, and Wertz GW. 1994. "The Membrane-Associated and Secreted Forms of the Respiratory Syncytial Virus Attachment Glycoprotein G Are Synthesized from Alternative Initiation Codons." *Journal of Virology* 68 (7): 4538–46. https://doi.org/10.1128/JVI.68.7.4538-4546.1994.

Rust, Michael J., Melike Lakadamyali, Feng Zhang, and Xiaowei Zhuang. 2004. "Assembly of Endocytic Machinery around Individual Influenza Viruses during Viral Entry." *Nature Structural & Molecular Biology* 11 (6): 567–73. https://doi.org/10.1038/NSMB769.

San-Juan-Vergara, H, Sampayo-Escobar V, Reyes N, Cha B, Pacheco-Lugo L, Wong T, Peeples ME, Collins PL, Castaño ME, and Mohapatra SS. 2012. "Cholesterol-Rich Microdomains as Docking Platforms for Respiratory Syncytial Virus in Normal Human Bronchial Epithelial Cells." *Journal of Virology* 86 (3): 1832–43. https://doi.org/10.1128/JVI.06274-11.

Sanchez, Ariana D., and Jessica L. Feldman. 2017. "Microtubule-Organizing Centers: From the Centrosome to Non-Centrosomal Sites." *Current Opinion in Cell Biology* 44 (February): 93–101. https://doi.org/10.1016/J.CEB.2016.09.003.

Sanders, Anna A.W.M., and Irina Kaverina. 2015. "Nucleation and Dynamics of Golgi-Derived Microtubules." *Frontiers in Neuroscience* 9 (NOV): 431. https://doi.org/10.3389/FNINS.2015.00431/BIBTEX.

Santangelo, Philip J, and Gang Bao. 2007. "Dynamics of Filamentous Viral RNPs Prior to Egress." *Nucleic Acids Research* 35 (11): 3602–11. https://doi.org/10.1093/nar/gkm246.

Schmidt, Helgo, and Andrew P. Carter. 2016. "Review: Structure and Mechanism of the Dynein Motor ATPase." *Biopolymers* 105 (8): 557–67. https://doi.org/10.1002/BIP.22856.

Schonteich, Eric, Gayle M. Wilson, Jemima Burden, Colin R. Hopkins, Keith Anderson, James R. Goldenring, and Rytis Prekeris. 2008. "The Rip11/Rab11-FIP5 and Kinesin II Complex Regulates Endocytic Protein Recycling." *Journal of Cell Science* 121 (22): 3824–33. https://doi.org/10.1242/JCS.032441.

Sedeyn, Koen, Bert Schepens, and Xavier Saelens. 2019. "Respiratory Syncytial Virus Nonstructural Proteins 1 and 2: Exceptional Disrupters of Innate Immune Responses." *PLoS Pathogens* 15 (10): e1007984. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007984.

Selvaraj, Muniyandi, Kavestri Yegambaram, Eleanor J. A. A. Todd, Charles-Adrien Richard, Rachel L. Dods, Georgia M. Pangratiou, Chi H. Trinh, et al. 2018. "The Structure of the Human Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein Bound to the Interaction Domain of the Phosphoprotein P Defines the Orientation of the Complex." *MBio* 9 (6): 1–13. https://doi.org/10.1128/MBIO.01554-18.

Shahriari, Shadi, Ke-jun Wei, Reena Ghildyal, Shadi Shahriari, Ke-jun Wei, and Reena Ghildyal. 2018. "Respiratory Syncytial Virus Matrix (M) Protein Interacts with Actin In Vitro and in Cell Culture." *Viruses* 10 (10): 535. https://doi.org/10.3390/v10100535.

Shaikh, Fyza Y, Reagan G Cox, Aaron W Lifland, Anne L. Hotard, John V. Williams, Martin L. Moore, Philip J. Santangelo, and James E. Crowe. 2012. "A Critical Phenylalanine Residue in the Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Cytoplasmic Tail Mediates Assembly of Internal Viral Proteins into Viral Filaments and Particles." *MBio* 3 (1): 1–10. https://doi.org/10.1128/mBio.00270-11.

Shaikh, Fyza Y, Thomas J Utley, Ryan E Craven, Meredith C Rogers, Lynne A Lapierre, James R Goldenring, James E Crowe, and Jr. 2012. "Respiratory Syncytial Virus Assembles into Structured Filamentous Virion Particles Independently of Host Cytoskeleton and Related Proteins." *PloS One* 7 (7): e40826. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040826.

Sibert, Bryan S., Joseph Y. Kim, Jie E. Yang, Zunlong Ke, Christopher C. Stobart, Martin M. Moore, and Elizabeth R. Wright. 2021. "Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Assembles as a Lattice with Local and Extended Order That Coordinates the Position of the Fusion Glycoprotein." *BioRxiv*, October, 2021.10.13.464285. https://doi.org/10.1101/2021.10.13.464285.

Snape, Natale, Dongsheng Li, Ting Wei, Hongping Jin, Mary Lor, Daniel J. Rawle, Kirsten M. Spann, and David Harrich. 2018. "The Eukaryotic Translation Elongation Factor 1A Regulation of Actin Stress Fibers Is Important for Infectious RSV Production." *Virology Journal* 15 (1): 1–10. https://doi.org/10.1186/S12985-018-1091-7/FIGURES/4.

Stone, Raychel, Tsuyoshi Hayashi, Shringkhala Bajimaya, Erin Hodges, and Toru Takimoto. 2016. "Critical Role of Rab11a-Mediated Recycling Endosomes in the Assembly of Type I Parainfluenza Viruses." *Virology* 487 (January): 11–18. https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2015.10.008.

Sugawara, M., J. Czaplicki, J. Ferrage, A. Milon, J. F. Haeuw, U. F. Power, N. Corvaïa, T. Nguyen, and A. Beck. 2002. "Structure-Antigenicity Relationship Studies of the Central Conserved Region of Human Respiratory Syncytial Virus Protein G." *The Journal of Peptide Research: Official Journal of the American Peptide Society* 60 (5): 271–82. https://doi.org/10.1034/J.1399-3011.2002.21027.X.

Tanner, Sian J., Antonio Ariza, Charles Adrien Richard, Hannah F. Kyle, Rachel L. Dods, Marie Lise Blondot, Weining Wu, et al. 2014. "Crystal Structure of the Essential Transcription Antiterminator M2-1 Protein of Human Respiratory Syncytial Virus and Implications of Its Phosphorylation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (4): 1580–85. https://doi.org/10.1073/pnas.1317262111.

Tawar, Rajiv G., Stéphane Duquerroy, Clemens Vonrhein, Paloma F. Varela, Laurence Damier-Piolle, Nathalie Castagne, Kirsty MacLellan, et al. 2009. "Crystal Structure of a Nucleocapsid-like Nucleoprotein-RNA Complex of Respiratory Syncytial Virus." *Science* 326 (5957): 1279–83. https://doi.org/10.1126/science.1177634.

Tayyari, Farnoosh, David Marchant, Theo J. Moraes, Wenming Duan, Peter Mastrangelo, and Richard G. Hegele. 2011. "Identification of Nucleolin as a Cellular Receptor for Human Respiratory Syncytial Virus." *Nature Medicine* 17 (9): 1132–35. https://doi.org/10.1038/nm.2444.

Teng, MN, and PL Collins. 2002. "The Central Conserved Cystine Noose of the Attachment G Protein of Human Respiratory Syncytial Virus Is Not Required for Efficient Viral Infection in Vitro or in Vivo." *Journal of Virology* 76 (12): 6164–71. https://doi.org/10.1128/JVI.76.12.6164-6171.2002.

Toya, Mika, Saeko Kobayashi, Miwa Kawasaki, Go Shioi, Mari Kaneko, Takashi Ishiuchi, Kazuyo Misaki, Wenxiang Meng, and Masatoshi Takeichi. 2016. "CAMSAP3 Orients the Apical-to-Basal Polarity of Microtubule Arrays in Epithelial Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (2): 332–37. https://doi.org/10.1073/PNAS.1520638113.

Tran, Thi-Lan, Nathalie Castagné, Virginie Dubosclard, Sylvie Noinville, Emmanuelle Koch, Mohammed Moudjou, Céline Henry, Julie Bernard, Robert Paul Yeo, and Jean-François Eléouët. 2009. "The Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein Forms Tetramers and Interacts with RNA and P in a Competitive Manner." *Journal of Virology* 83 (13): 6363–74. https://doi.org/10.1128/jvi.00335-09.

Trevisan, Marta, Veronica Di Antonio, Annalisa Radeghieri, Giorgio Palù, Reena Ghildyal, and Gualtiero Alvisi. 2018. "Molecular Requirements for Self-Interaction of the Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein in Living Mammalian Cells." *Viruses 2018, Vol. 10, Page 109* 10 (3): 109. https://doi.org/10.3390/V10030109.

Tripp, RA, Jones LP, Haynes LM, Zheng H, Murphy PM, and Anderson LJ. 2001. "CX3C Chemokine Mimicry by Respiratory Syncytial Virus G Glycoprotein." *Nature Immunology* 2 (8): 732–38. https://doi.org/10.1038/90675.

Ulloa, L., R. Serra, A. Asenjo, and N. Villanueva. 1998. "Interactions between Cellular Actin and Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV)." *Virus Research* 53 (1): 13–25. https://doi.org/10.1016/S0168-1702(97)00121-4.

Utley, Thomas J, Nicole A Ducharme, Vasundhara Varthakavi, Bryan E Shepherd, Philip J Santangelo, Michael E Lindquist, James R Goldenring, James E Crowe, and Jr. 2008. "Respiratory Syncytial Virus Uses a Vps4-Independent Budding Mechanism Controlled by Rab11-FIP2." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (29): 10209–14. https://doi.org/10.1073/pnas.0712144105.

Vale-Costa, Sílvia, Marta Alenquer, Ana Laura Sousa, Bárbara Kellen, José Ramalho, Erin M. Tranfield, and Maria João Amorim. 2016. "Influenza A Virus Ribonucleoproteins Modulate Host Recycling by Competing with Rab11 Effectors." *J Cell Sci* 129 (8): 1697–1710. https://doi.org/10.1242/JCS.188409.

Vale-Costa, Sílvia, and Maria João Amorim. 2016. "Recycling Endosomes and Viral Infection." *Viruses 2016, Vol. 8, Page 64* 8 (3): 64. https://doi.org/10.3390/V8030064.

Vanover, Daryll, Daisy V Smith, Emmeline L Blanchard, Eric Alonas, Jonathan L Kirschman, Aaron W Lifland, Chiara Zurla, and Philip J Santangelo. 2017. "RSV Glycoprotein and Genomic RNA Dynamics Reveal Filament Assembly Prior to the Plasma Membrane." *Nature Communications* 8 (1): 667. https://doi.org/10.1038/s41467-017-00732-z.

Veler, Hana, Haitian Fan, Jeremy Keown, Jane Sharps, Marjorie Fournier, Jonathan M Grimes, and Ervin Fodor. 2022. "The C-Terminal Domains of the PB2 Subunit of the Influenza A Virus RNA Polymerase Directly Interact with Cellular GTPase Rab11a." *Journal of Virology*, January, jvi0197921. https://doi.org/10.1128/JVI.01979-21.

Vetter, Melanie, Jing Wang, Esben Lorentzen, and Dusanka Deretic. 2015. "Novel Topography of the Rab11-Effector Interaction Network within a Ciliary Membrane Targeting Complex." *Https://Doi.Org/10.1080/21541248.2015.1091539* 6 (4): 165–73. https://doi.org/10.1080/21541248.2015.1091539.

Walters, Matthew S., Kazunori Gomi, Beth Ashbridge, Malcolm A.S. Moore, Vanessa Arbelaez, Jonna

Heldrich, Bi Sen Ding, Shahin Rafii, Michelle R. Staudt, and Ronald G. Crystal. 2013. "Generation of a Human Airway Epithelium Derived Basal Cell Line with Multipotent Differentiation Capacity." *Respiratory Research* 14 (1): 1–18. https://doi.org/10.1186/1465-9921-14-135/FIGURES/9.

Wang, I-Hsuan, Christoph J Burckhardt, Artur Yakimovich, and Urs F Greber. 2018. "Imaging, Tracking and Computational Analyses of Virus Entry and Egress with the Cytoskeleton." *Viruses* 10 (4). https://doi.org/10.3390/v10040166.

Weber, Elke, Barbara Humbert, Hans-Jürgen Streckert, and Hermann Werchau. 1995. "Nonstructural Protein 2 (NS2) of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Detected by an Antipeptide Serum." *Respiration; International Review of Thoracic Diseases* 62 (1): 27–33. https://doi.org/10.1159/000196385.

Wei, Ting, Dongsheng Li, Daneth Marcial, Moshin Khan, Min Hsuan Lin, Natale Snape, Reena Ghildyal, David Harrich, and Kirsten Spann. 2014. "The Eukaryotic Elongation Factor 1A Is Critical for Genome Replication of the Paramyxovirus Respiratory Syncytial Virus." *PLOS ONE* 9 (12): e114447. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0114447.

Welz, Tobias, Joel Wellbourne-Wood, and Eugen Kerkhoff. 2014. "Orchestration of Cell Surface Proteins by Rab11." *Trends in Cell Biology* 24 (7): 407–15. https://doi.org/10.1016/J.TCB.2014.02.004.

Whelan, S. P. J., J. N. Barr, and G. W. Wertz. 2004. "Transcription and Replication of Nonsegmented Negative-Strand RNA Viruses." *Current Topics in Microbiology and Immunology* 283: 61–119. https://doi.org/10.1007/978-3-662-06099-5_3.

Whitehead, Stephen S., Alexander Bukreyev, Michael N. Teng, Cai-Yen Firestone, Marisa St. Claire, William R. Elkins, Peter L. Collins, and Brian R. Murphy. 1999. "Recombinant Respiratory Syncytial Virus Bearing a Deletion of Either the NS2 or SH Gene Is Attenuated in Chimpanzees." *Journal of Virology* 73 (4): 3438. /pmc/articles/PMC104109/.

Xu, Haijiao, Xian Hao, Shaowen Wang, Zhiyong Wang, Mingjun Cai, Junguang Jiang, Qiwei Qin, Maolin Zhang, and Hongda Wang. 2015. "Real-Time Imaging of Rabies Virus Entry into Living Vero Cells." *Scientific Reports* 5 (July). https://doi.org/10.1038/SREP11753.

Yacovone, Shalane K., Amanda M. Smelser, Jed C. Macosko, George Holzwarth, David A. Ornelles, and Douglas S. Lyles. 2016. "Migration of Nucleocapsids in Vesicular Stomatitis Virus-Infected Cells Is Dependent on Both Microtubules and Actin Filaments." *Journal of Virology* 90 (13): 6159–70. https://doi.org/10.1128/JVI.00488-16/ASSET/869B7DD9-BF3F-4115-9A29-518094EC697A/ASSETS/GRAPHIC/ZJV9991817510010.JPEG.

Yeo, Dawn Su Yin, Robin Chan, Gaie Brown, Li Ying, Richard Sutejo, Jim Aitken, Boon Huan Tan, Markus R. Wenk, and Richard J. Sugrue. 2009. "Evidence That Selective Changes in the Lipid Composition of Raft-Membranes Occur during Respiratory Syncytial Virus Infection." *Virology* 386 (1): 168–82. https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2008.12.017.

Yin, HS, Wen X, Paterson RG, Lamb RA, and Jardetzky TS. 2006. "Structure of the Parainfluenza Virus 5 F Protein in Its Metastable, Prefusion Conformation." *Nature* 439 (7072): 38–44. https://doi.org/10.1038/NATURE04322.

Zan, Jie, Song Liu, Dong Nan Sun, Kai Kun Mo, Yan Yan, Juan Liu, Bo Li Hu, Jin Yan Gu, Min Liao, and Ji Yong Zhou. 2017. "Rabies Virus Infection Induces Microtubule Depolymerization to Facilitate Viral RNA Synthesis by Upregulating HDAC6." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7 (APR): 146. https://doi.org/10.3389/FCIMB.2017.00146/FULL.

Zegers, Mirjam M.P., and Dick Hoekstra. 1998. "Mechanisms and Functional Features of Polarized Membrane Traffic in Epithelial and Hepatic Cells." *The Biochemical Journal* 336 (Pt 2) (Pt 2): 257–69. https://doi.org/10.1042/BJ3360257.

Zhang, Li Juan, Li Xia, Shu Lin Liu, En Ze Sun, Qiu Mei Wu, Li Wen, Zhi Ling Zhang, and Dai Wen Pang. 2018. "A 'Driver Switchover' Mechanism of Influenza Virus Transport from Microfilaments to Microtubules." *ACS Nano* 12 (1): 474–84. https://doi.org/10.1021/ACSNANO.7B06926/SUPPL_FILE/NN7B06926_SI_011.AVI.

Zheng, Lin Ling, Chun Mei Li, Shu Jun Zhen, Yuan Fang Li, and Cheng Zhi Huang. 2017. "A Dynamic Cell Entry Pathway of Respiratory Syncytial Virus Revealed by Tracking the Quantum Dot-Labeled Single Virus." *Nanoscale* 9 (23): 7880–87. https://doi.org/10.1039/C7NR02162C.

Zulkefli, Khalisah L., Fiona J. Houghton, Prajakta Gosavi, and Paul A. Gleeson. 2019. "A Role for Rab11 in the Homeostasis of the Endosome-Lysosomal Pathway." *Experimental Cell Research* 380 (1): 55–68. https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2019.04.010.

Zupa, Erik, Peng Liu, Martin Würtz, Elmar Schiebel, and Stefan Pfeffer. 2021. "The Structure of the γ-TuRC: A 25-Years-Old Molecular Puzzle." *Current Opinion in Structural Biology* 66 (February): 15–21. https://doi.org/10.1016/J.SBI.2020.08.008.