



HAL
open science

Inhibiteurs du transport membranaire cellulaire contre le Virus Respiratoire Syncytial

Adrien Le Rouzic

► **To cite this version:**

Adrien Le Rouzic. Inhibiteurs du transport membranaire cellulaire contre le Virus Respiratoire Syncytial. Chimie thérapeutique. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASQ067 . tel-04606823

HAL Id: tel-04606823

<https://theses.hal.science/tel-04606823>

Submitted on 10 Jun 2024

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.

Inhibiteurs du transport membranaire cellulaire contre le Virus Respiratoire Syncytial

Inhibitors of cellular membrane trafficking against Respiratory Syncytial Virus

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569 Innovation Thérapeutique du Fondamental à l'Appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : Chimie Médicinale
Graduate School : Santé et médicaments
Réfèrent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée dans les unités de recherche

VIM (Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE)

Médicaments et technologie pour la santé (Université Paris-Saclay, CEA, INRAE)

Sous la direction de **Daniel GILLET**, Directeur de recherche
et la co-direction de **Marie GALLOUX**, Directrice de recherche

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 07 décembre 2023, par

Adrien LE ROUZIC

Composition du Jury

membres du jury avec voix délibératives

Chahrazade EL AMRI

Professeure des universités,
Sorbonne Université

Présidente du jury

Slim FOURATI

Professeur des universités –
praticien hospitalier, Université Pa-
ris-Est-Créteil-Val-de-Marne

Rapporteur & Examineur

Delphine MURIAUX

Directrice de recherche, CNRS

Rapporteuse & Examinatrice

Bruno BEAUMELLE

Directeur de recherche, CNRS

Examineur

Titre : Inhibiteurs du transport membranaire cellulaire contre le Virus Respiratoire Syncytial

Mots clés : Virus Respiratoire Syncytial / Développement thérapeutique / Transport rétrograde / Biologie cellulaire / Virologie / Microbiologie

Résumé : Le virus respiratoire syncytial (VRS) est la première cause d'infections respiratoires aiguës (bronchiolite, pneumonie) chez les jeunes enfants. Ce virus est également responsable d'infections respiratoires graves chez les personnes âgées et immunodéprimées. En l'absence de traitement efficace pour lutter contre ces infections, la recherche de nouvelles stratégies antivirales reste un enjeu de santé publique.

La molécule Retro-2.2 est un nouveau dérivé optimisé de l'inhibiteur de transport rétrograde intracellulaire Retro-2. Cette famille chimique présente une activité antivirale contre une douzaine de virus.

Dans le cadre de ce projet, nous avons montré que le composé Retro-2.2 présente une activité antivirale contre le VRS, avec une concentration efficace médiane (EC_{50}) proche de 2 μM en culture cellulaire. Nous avons également mis en évidence que le traitement par Retro-2.2 induit une diminution de la formation des syncytia, conséquence de l'infection par le VRS en culture cellulaire, associée à un défaut de formation de nouveaux virions.

Des observations similaires ont été réalisées lors de l'extinction de la Syntaxine-5 et de Sec16A, protéines endogène impliquée dans le transport intracellulaire rétrograde décrites comme cibles de la molécule Retro-2. L'ensemble des travaux menés a permis de mettre en évidence un défaut d'adressage des protéines virales de fusion F et d'attachement G à la membrane plasmique suite au traitement par Retro-2.2. L'efficacité du composé Retro-2.2 a également été évaluée *in vivo*, sur modèle murin. Toutefois les caractéristiques de pharmacocinétique et de biodistribution défavorables pour Retro-2.2 n'ont pas permis de protéger des souris contre une infection par le VRS.

En conclusion, nos données suggèrent que les molécules ciblant les voies de trafic intracellulaire représentent une nouvelle classe d'antiviraux d'intérêt contre le VRS.

Title: Inhibitors of cellular membrane trafficking against Respiratory Syncytial Virus

Keywords : Respiratory Syncytial Virus / Retrograde transport / Therapeutics / Cellular biology / Virology / Microbiology

Abstract: The Respiratory Syncytial Virus (RSV) is the leading cause of acute respiratory infections, such as bronchiolitis and pneumonia, in young children. It also causes severe infections in the elderly and immunocompromised individuals. Given the absence of an effective treatment for these infections, finding new antiviral strategies remains a public health priority.

The molecule Retro-2.2 is a newly optimized derivative of the intracellular retrograde transport inhibitor Retro-2, which belongs to a chemical family known for its antiviral activity against a several classes of viruses. In the context of this project, we have demonstrated that Retro-2.2 exhibits a median effective concentration (EC_{50}) of approximately 2 μM against RSV in cell culture. We have also found that treatment with Retro-2.2 leads to a reduction in the formation of syncytia, a consequence of RSV infection in cell culture, associated with a defect in the formation of new virions.

Similar observations were made when Syntaxin-5 or Sec16, two cellular proteins involved in intracellular retrograde transports, and described as targets of Retro-2.2, were down-regulated. This work has highlighted a defect in the targeting of the viral fusion protein F and attachment protein G to the plasma membrane of infected cells following treatment with Retro-2.2. The efficacy of the compound Retro-2.2 was also evaluated *in vivo*, using a murine model of RSV infection. However, the unfavorable pharmacokinetic and biodistribution characteristics of Retro-2.2 did not allow to protect mice against RSV infection.

In conclusion, our data suggest that molecules targeting intracellular trafficking pathways represent a new class of antivirals of interest against RSV.

Remerciements

Je souhaite commencer par remercier les membres de mon jury de thèse : Dr Charazade El Amri, Dr Slim Fourati, Dr Delphine Muriaux et Dr Bruno Beaumelle, d'avoir accepté d'évaluer mes travaux.

Je remercie les membres de mon comité de suivi de thèse : Dr Pierre-Olivier Vidalain et Dr Bruno Beaumelle pour le temps et les conseils qu'ils m'ont accordé.

Au cours de ces trois années, j'ai eu la chance d'être encadré par le Dr Marie Galloux et le Dr Daniel Gillet, qui ont co-dirigé cette thèse. Marie, merci pour ta patience et ton énergie. Tu as su tenir la barre avec brio, ta disponibilité de tous les instants et ton enthousiasme ont été décisifs pour mener ce projet à bon port. Daniel, merci pour tes conseils avisés, et pour la confiance que tu m'as accordé dès mon arrivée dans ton laboratoire pour mon stage de M2.

J'ai également eu le privilège de partager la vie de deux équipes de recherche, et un projet n'est rien sans les relations humaines qui le jalonnent. Je remercie l'ensemble des personnes de la VIM et du SIMoS pour leur bienveillance et les échanges enrichissant qu'ils nourrissent.

Un grand merci au Dr Julien Barbier. Tu as apporté un soutien et une expertise indispensables à la réussite de ce projet. Une pensée pour les membres de l'équipe « Toxines, transport et innovation Thérapeutique », passés ou présents : Sylvain, Ombeline, Pierre, Blandine, Delphine, Florian, Eva, . Merci pour votre aide et pour tous les moments passés à discuter, de science ou d'autres choses. Merci Lucie pour ta bonne humeur communicative. Bon courage à Marine qui reprend le flambeau !

Merci également à Mathilde et Peggy pour leur aide et leurs conseils éclairés.

Merci aux membres de l'équipe BMP de l'INRAE : Jean-François, Christophe, Didier, Fortune, Julien, Charles-Adrien, Jenna, Charlotte, Monika, Lucas et Maxime. Un remerciement à Clémentine pour son aide précieuse lors des longues semaines d'expérimentations. Merci également aux doctorants (et désormais docteurs pour certaines !) de l'équipe Hortense et Lorène d'avoir montré l'exemple et force à Vincent et Célia, vous tenez le bon bout !

Enfin, je remercie mes proches, famille et amis, d'avoir répondu présent pendant ces 3 années. Votre soutien était constant, dans les moments difficiles comme dans les réussites. Merci à Chloé avec qui je partage les joies et les mésaventures, merci d'être à mes cotés.

Liste des abréviations

AAV : virus adéno-associés

ACC : agent du coryza des chimpanzées

ADME : Absorption, distribution, métabolisation et excrétion

AMM : autorisation de mise sur le marché

AMPV : metapneumovirus aviaire

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

BVRS : virus respiratoire syncytial bovin

CARD : caspase recruitment domain

CC₅₀ : concentration cytotoxique médiane

CD : domaine connecteur

CPV : orthopneumovirus canin

Cryo-EM : cryo-microscopie électronique

CTD : domaine C-terminal

EBOV : virus Ebola

EC₅₀ : concentration efficace médiane

eIF4G : eukaryotic translation initiation factor 4G

ERES : site de sortie du réticulum endoplasmique

ERGIC : compartiment intermédiaire entre réticulum endoplasmique et appareil de Golgi

EV71 : entérovirus 71

GAGs : glycosaminoglycanes

GE : Gene end

GS : Gene start

HBD : Heparin binding domain

HBV : virus de l'hépatite B

HCMV : cytomégalovirus humain
HMPV : metapneumovirus humain
HSP : heat shock protein
HSV2 : herpès simplex virus type 2
HVRs : virus respiratoire syncytial humain
IB : inclusion bodies / corps d'inclusion
IBAG : inclusion bodies associated granules
ICAM1 : Intercellular adhesion molecule 1
ICTV : international committee on taxonomy of viruses
IFN : interférons
IMPDH : inosine monophosphate déshydrogénase
IL-6 et IL-8 : Interleukine 6 et 8
IS : indice de selectivité
M6PR : manose-6-phosphate
MARV : virus de Marburg
MAVS : mitochondrial antiviral signalling protein
MPV : virus de la pneumonie murine
MTase : méthyltransférase
NC : nucléocapside
NTD : domaine N-terminal
OD : domaine d'oligomérisation OVRs : virus respiratoire syncytial ovin
PABP : poly(A)-binding protein
PDI : protéine disulfure isomérase
PIB : produit intérieur brut
PRNTase : polyribonucléotidyltransférase
RdRp : ARN-polymérase ARN-dépendante
RE : Réticulum endoplasmique
RMN : résonance magnétique nucléaire
SAR : relation structure-activité

SARS-CoV-2 : severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

SC : sous-cutanée

siRNA : petit ARN interférent

SOV : orthopneumovirus porcin

StxB : sous-unité B des shigatoxines

Syn-5 : Syntaxine-5

TGN : réseau transgolgien

TLR: récepteur de type Toll

VACV : virus de la Vaccine

VRS : virus respiratoire syncytial

ZBD : domaine de fixation au zinc

Table des matières

INTRODUCTION	8
1 LE VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL	10
1.1 CLASSIFICATION.....	10
1.2 EPIDEMIOLOGIE.....	12
1.2.1 Populations touchées et circulation.....	12
1.2.2 Infection et maladies associées.....	14
1.3 LA PARTICULE VIRALE.....	16
1.3.1 Les protéines du complexe polymérase.....	18
1.3.2 La protéine M et les protéines de l'enveloppe virale.....	26
1.4 LE CYCLE VIRAL.....	33
1.4.1 Entrée dans la cellule.....	35
1.4.2 Les usines virales, ou corps d'inclusions cytoplasmiques.....	38
1.4.3 Réplication et transcription.....	40
1.4.4 Assemblage et bourgeonnement.....	42
1.4.5 Contrôle de la réponse immunitaire.....	43
1.5 VACCINS ET TRAITEMENTS.....	44
1.5.1 Vaccins contre le VRS.....	44
1.5.2 Anticorps monoclonaux.....	45
1.5.3 Stratégies antivirales.....	46
2 RETRO-2, UNE MOLECULE ANTI-PATHOGENES INTRACELLULAIRES DE SPECTRE LARGE	49
2.1 DECOUVERTE DE RETRO-2.....	49
2.2 MECANISME D'ACTION ET OPTIMISATION DE RETRO-2.....	51
2.2.1 Sec16A, protéine cible de Retro-2.....	51
2.2.2 Action sur le transport intracellulaire.....	51
2.2.3 ASNA1, cible alternative.....	53
2.2.4 Optimisation par étude de Relation Structure-Activité.....	53
2.3 ACTIVITE DE SPECTRE LARGE CONTRE LES PATHOGENES INTRACELLULAIRES.....	55
2.3.1 Activité contre des bactéries intracellulaires.....	55
2.3.2 Activités contre des parasites intracellulaires.....	56
2.3.3 Activité antivirale.....	56
OBJECTIFS DE LA THESE	61
RESULTATS	63
3 ACTIVITE ANTIVIRALE DE RETRO-2.2 IN VITRO ET MECANISME D'ACTION ASSOCIE	64
3.1 INTRODUCTION.....	64
3.2 PUBLICATION : « A NEW DERIVATIVE OF RETRO-2 DISPLAYS ANTIVIRAL ACTIVITY AGAINST RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS ».....	68
3.3 UNE TECHNIQUE DE QUANTIFICATION DE LA TAILLE ET DU NOMBRE DE SYNCYTIA.....	89
3.3.1 Matériel et méthodes.....	89
3.3.2 Résultats de la quantification.....	91
3.4 DISCUSSION.....	93
4 ACTIVITE ANTIVIRALE IN VIVO	98
4.1 PHARMACOCINETIQUE DE RETRO-2.2.....	99
4.2 EVALUATION DE LA TOXICITE DE RETRO-2.2 CHEZ LA SOURIS.....	103
4.3 TESTS D'ACTIVITE ANTIVIRALE DE RETRO-2.2 IN VIVO EN MODELE MURIN.....	106
4.3.1 Principe des expériences in vivo sur le VRS.....	107
4.3.2 Challenge in vivo contre le VRS.....	109
4.4 DISCUSSION.....	111
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	114
ANNEXE	122
BIBLIOGRAPHIE	127

Introduction

1 LE VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL

Le Virus Respiratoire Syncytial (VRS) a été isolé pour la première fois en 1956 chez de jeunes chimpanzés malades. Ce premier isolat fut nommé Agent du Coryza des Chimpanzés (ACC) (Blount *et al.*, 1956). Un an plus tard, ce même virus fut isolé à partir de sécrétions nasales de nourrissons souffrant de maladies respiratoires graves, et nommé Virus Respiratoire Syncytial en raison de sa capacité à former des syncytia en cultures de cellules (Chanock *et al.*, 1957). Dans les années suivantes, une association entre le VRS et les maladies respiratoires aiguës a été prouvée (Beem *et al.*, 1960).

1.1 CLASSIFICATION

Le VRS appartient à l'ordre des *Mononegavirales*, regroupant des virus enveloppés à génome ARN simple brin non-segmenté de polarité négative (Figure 1). L'ordre des *Mononegavirales* comprend d'autres pathogènes représentant une menace en santé humaine, tels que les virus hémorragiques Ebola et Marburg (famille *Filoviridae*), les virus de la rougeole, Nipah et Sendai (famille *Paramyxoviridae*), ou encore le virus de la rage (famille *Rhabdoviridae*).

Le VRS appartient à la famille des *Pneumoviridae*, subdivisée en 2 genres : *Orthopneumovirus* et *Metapneumovirus* (Afonso *et al.*, 2016). Le genre *Metapneumovirus* est constitué des métapneumovirus humain et aviaire (HMPV et AMPV respectivement). Le genre *Orthopneumovirus* est constitué des VRS humain (HVRS) et bovin (BVRS), et du virus de la pneumonie murine (MPV). Enfin, d'autres virus phylogénétiquement proches non inclus dans la classification de l'ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) ont été isolés : le VRS ovin (OVRS) (Mallipeddi et Samal, 1993), et les orthopneumovirus porcin (SOV) (Hause *et al.*, 2016) et canin (CPV) (Song *et al.*, 2021).

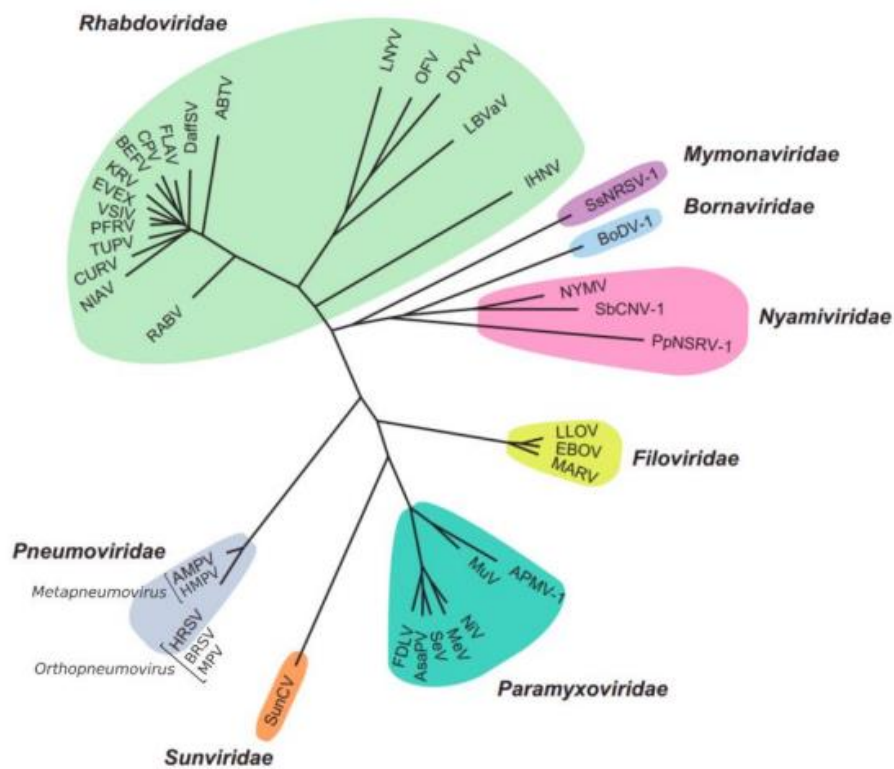


Figure 1: Arbre phylogénétique de l'ordre *Mononegavirales*. Cet arbre est basé sur les alignements de séquences en acides aminés des polymérases virales. Figure adaptée de (Ortega *et al.*, 2019).

1.2 EPIDEMIOLOGIE

1.2.1 Populations touchées et circulation

Le VRS est la principale cause d'infections respiratoires aiguës chez l'enfant dans le monde, et tous les enfants sont infectés avant l'âge de 2 ans (Glezen *et al.*, 1986). A titre d'exemple ; en 2019, 33 millions de cas d'infections respiratoires aiguës chez les enfants de moins de 5 ans ont été imputés au VRS, conduisant à des hospitalisations dans 10% des cas et à 100 000 décès. A noter que la plupart des décès liés au VRS survient dans les pays à faible Produit Intérieur Brut (PIB) (Li *et al.*, 2022) (Figure 2).

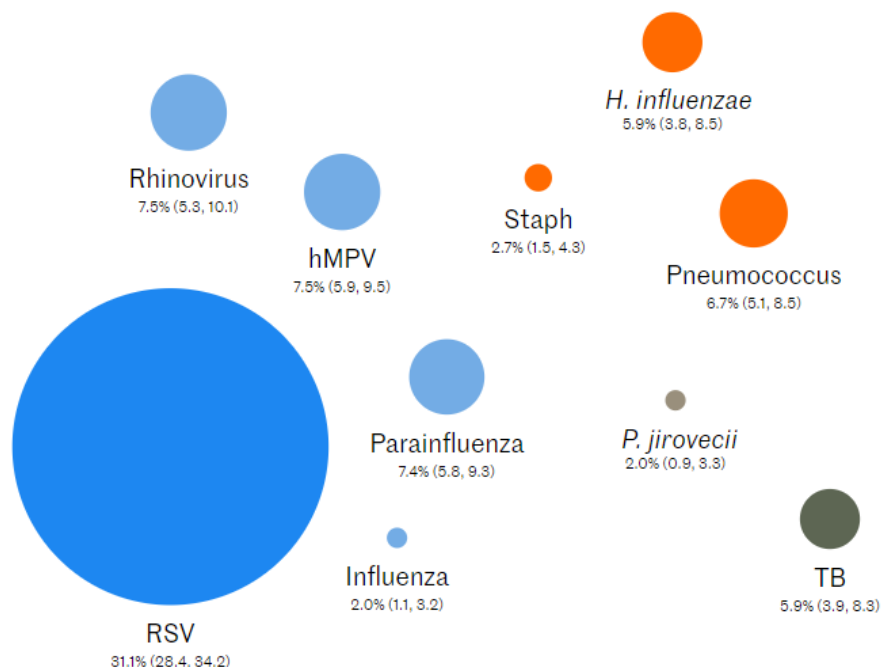


Figure 2 : Les principales causes de pneumonie sévère chez l'enfant, par ordre d'importance : Virus Respiratoire Syncytial, Rhinovirus, Métapneumovirus humain (HMPV), virus parainfluenza, Pneumocoque (*Streptococcus pneumoniae*), *Haemophilus influenzae*, Tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*), *Staphylococcus aureus*, virus de la grippe (Influenza) et *Pneumocystis jirovecii*. Ces pourcentages sont des moyennes obtenues dans sept pays (Gambie, Mali, Kenya, Zambie, Afrique du Sud, Bangladesh et Thaïlande). Données adaptées de : <http://perchresults.org/>, PERCH, 2019.

Les réinfections sont courantes tout au long de la vie, entraînant des symptômes bénins, similaires à ceux d'un rhume. Toutefois, pour les adultes présentant des facteurs de risques tels que des problèmes cardiaques ou respiratoires, le VRS représente une menace équivalente à celle de la grippe saisonnière (Falsey *et al.*, 2021). De même, les infections peuvent conduire à des détresses respiratoires aiguës chez les personnes âgées et les personnes immunodéprimées. Ainsi, en 2015 dans le monde, 1,5 millions de cas d'infections au VRS ont été signalés chez l'adulte, avec environ 215 000 d'hospitalisation. (Shi *et al.*, 2020).

Dans les régions tempérées, les épidémies de VRS sont saisonnières, avec des flambées épidémiques pendant la période hivernale (Midgley *et al.*, 2017). Cette saisonnalité ne se retrouve pas dans les pays chauds, où des flambées épidémiques peuvent apparaître tout au long de l'année, particulièrement pendant les saisons humides (Paynter, 2015).

Toutefois, lors de la pandémie du COVID-19, les consignes sanitaires mises en place pour limiter la dissémination du SARS-CoV-2 (distanciation sociale, fermeture des services publics, port du masque, etc...) ont conduit à une forte diminution de la transmission des autres virus respiratoires, notamment le VRS (Nawrocki *et al.*, 2021). Le caractère saisonnier de l'épidémie au VRS a ainsi changé, avec des cas d'infections en période estivale suite à la levée des restrictions sanitaires (Figure 3). D'autre part, les prédictions anticipant des flambées épidémiques plus importantes suite à cette période (Baker *et al.*, 2020) ont été confirmées, avec une augmentation importante du taux d'hospitalisation des enfants en bas âge sur la saison 2022-2023 ([RSV-NET Interactive Dashboard | CDC](#)) (Figure 3).

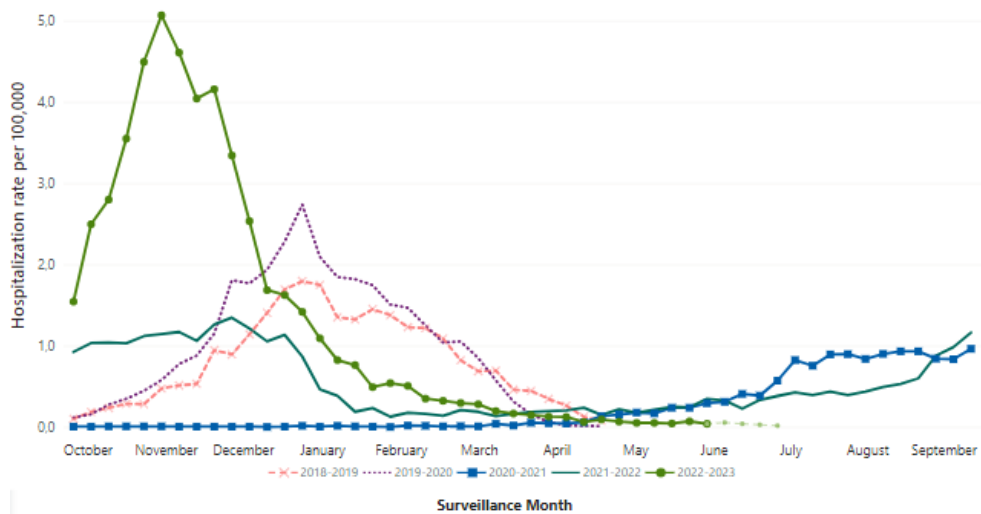


Figure 3 : Ratio d'hospitalisation pour 100 000 enfants entre 0 et 4 ans, depuis 2018 aux Etats-Unis. Données actualisées le 19/07/2023. Figure adaptée à partir de [RSV-NET Interactive Dashboard | CDC](#).

1.2.2 Infection et maladies associées

Le VRS est transmis par voie aérienne (particules virales dans les gouttelettes de sécrétions respiratoires) ou par contact direct avec une surface contaminée. Le temps d'incubation peut varier entre 2 et 8 jours, et le malade reste contagieux pendant 8 jours (Hall et Douglas, 1981). La réponse immunitaire au VRS est à court ou moyen terme. En conséquence, tout adulte ou enfant de plus de 5 ans possède des anticorps contre le VRS, mais leur taux diminue quelques semaines ou mois après l'infection. Les réinfections sont donc fréquentes (Openshaw et Tregoning, 2005 ; Russel *et al.*, 2017).

Le premier site d'infection est généralement la paroi nasopharyngée. L'inflammation de la muqueuse déclenche des rhinorrhées. Dans certains cas plus graves, comme chez les jeunes enfants ou les personnes à risque, l'infection peut se propager dans les voies respiratoires et causer des bronchiolites ou des pneumonies.

La sévérité de l'infection est liée à la charge virale (Garcia-Mauriño *et al.*, 2019), mais surtout à une réaction immunitaire exacerbée et inadaptée. En effet, l'infection des cellules épithéliales par le VRS déclenche l'activation des récepteurs de type Toll : TLR-2, TLR-3, TLR-4 et TLR-7 dans les poumons (Sartorius *et al.*, 2021). Cela conduit à la production de cytokines telles que l'interleukine-6 (IL-6), l'IL-8 ou encore les interférons de type I et III (IFN) par les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales. Ces signaux conduisent au recrutement vers les poumons de cellules de l'immunité innée, comme les neutrophiles, les monocytes et les cellules dendritiques (Openshaw *et al.*, 2017). Plus spécifiquement chez les très jeunes enfants, l'infection induit une réponse immunitaire de type Th2 et Th17 conduisant à l'activation de neutrophiles et éosinophiles, associée à une inflammation exacerbée, comparée à la réponse de type Th1 développée chez l'adulte infecté (Lukens *et al.*, 2010).

L'immunité conférée par les anticorps maternels protège l'enfant contre les infections graves liées au VRS (Piedra *et al.*, 2003). Cependant, le transfert placentaire d'anticorps entre la mère et l'enfant prend place entre les semaines 28 et 32 de la grossesse, laissant les enfants prématurés très exposés à des formes sévères de l'infection (Citron *et al.*, 2021).

Enfin, outre les complications respiratoires liées à l'infection, des enfants ayant déclaré une bronchiolite ou une pneumonie sévère seraient sujets à des complications à long terme, comme des sifflements respiratoires, des otites, ou de l'asthme (Sigurs *et al.*, 2010). Des travaux ont démontré que l'absence d'infection par le VRS dans la première année de vie réduisait les risques de développer de l'asthme à 5 ans (Billard et Bont, 2023). Toutefois, le lien de causalité entre l'infection au VRS et ces complications n'a toujours pas été démontré (Brunwasser *et al.*, 2020), et aucune étude à long terme sur le développement de l'asthme lié au VRS n'a été conduite pour le moment.

1.3 LA PARTICULE VIRALE

Le VRS possède un génome à ARN simple brin non-segmenté de polarité négative, d'environ 15,2 kb. De part et d'autre du génome, des séquences promotrices partiellement complémentaires ont été décrites. La séquence *Leader*, en amont du premier gène (gène NS1), permet la fixation de la polymérase, afin d'initier la transcription des ARN messagers viraux et la synthèse de l'ARN anti-génomique (+). La séquence *Trailer*, en aval du dernier gène (L), permet d'initier la réplication du brin d'ARN génomique (-).

Le génome contient dix gènes qui codent pour onze protéines, le gène M2 contenant deux cadres ouverts de lecture (Fearn et Collins, 1999) (Figure 4A). Chaque gène est encadré par des séquences d'initiation et d'arrêt de transcription : séquences *gene start* (GS) et *gene end* (GE) respectivement. Ces gènes codent pour les deux protéines non-structurales NS1 et NS2 interférant avec le système immunitaire de l'hôte, huit protéines structurales présentes dans la particule virale et enfin la protéine M2-2.

Le VRS est un virus enveloppé dont la membrane est issue de la membrane des cellules infectées (Figure 4B). Les particules virales du VRS sont pléiomorphes, avec des formes filamenteuses (200 nm à 2 µm) ou sphériques (diamètre de 100 nm à 1 µm) (Liljeroos *et al.*, 2013) (Figure 4C). La membrane contient trois protéines transmembranaires : la glycoprotéine (G), qui permet l'attachement aux cellules de l'hôte (Levine *et al.*, 1987), la protéine de fusion (F) interagissant avec les récepteurs cellulaires et responsable de la fusion entre la particule virale et la membrane cellulaire (Walsh et Hruska, 1983), et la petite protéine hydrophobe (SH), canal ionique dont la fonction n'est pas clairement définie mais qui pourrait participer à la modulation de la réponse immunitaire (Russel *et al.*, 2015 ; Triantafilou *et al.*, 2013).

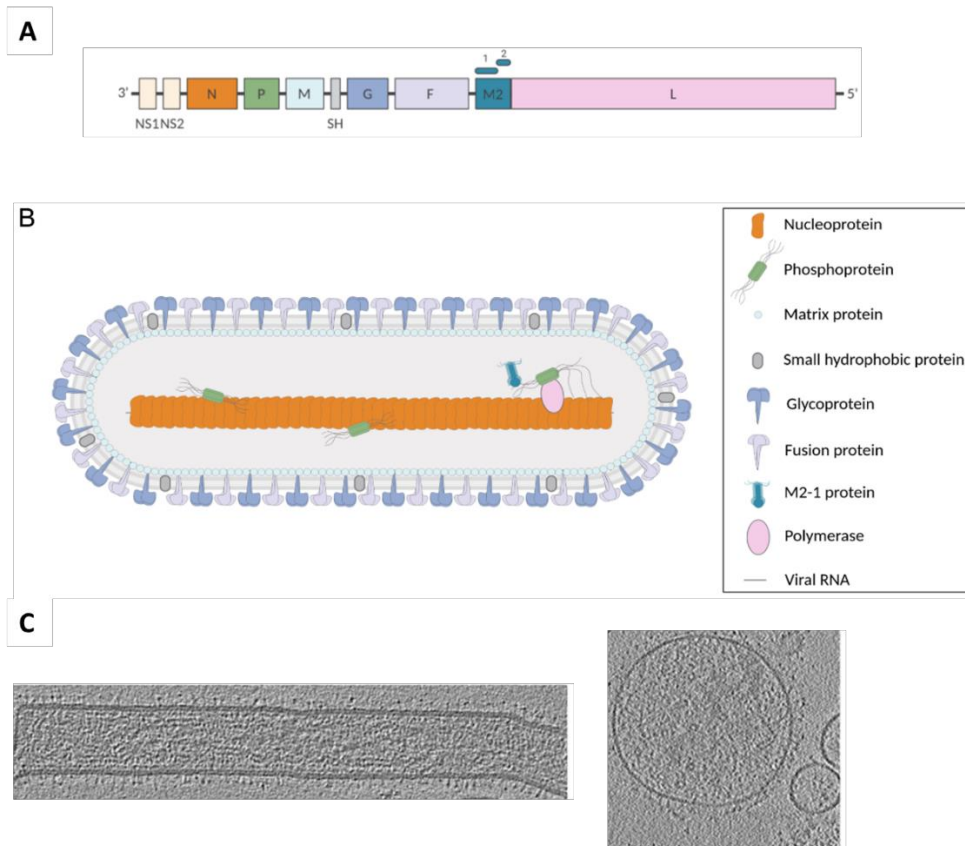


Figure 4 : Génome et particule virale du VRS. **(A)** Schéma du génome du VRS, chaque boîte représente un gène. **(B)** Schéma de la particule virale du VRS. Figure adaptée de (Decool *et al.*, 2021). Les protéines structurales sont représentées à droite du schéma. **(C)** Tomographies de particules virales du VRS, mettant en évidence une morphologie pléiomorphe filamenteuse (gauche) ou sphérique (droite). Figure adaptée de (Liljeroos *et al.*, 2013).

La face interne de la membrane de la particule virale est recouverte par la protéine de matrice (M), qui joue un rôle essentiel dans l'assemblage des nouveaux virions (Marty *et al.*, 2004).

Le génome du VRS est encapsidé par la nucléoprotéine (N). Ce complexe N-ARN forme une nucléocapside (NC) hélicoïdale (Bakker *et al.*, 2013). Cette NC est associée à la polymérase virale (L), responsable de la réplication et la transcription du génome, à la phosphoprotéine (P), cofacteur de la L, et à la protéine M2-1 qui est un facteur d'élongation de transcription (Collins *et al.*, 1996). A noter que la protéine M2-2, qui serait impliquée dans l'activation de la réplication, n'est quant à elle pas retrouvée associée à la particule virale (Bermingham and Collins, 1999).

1.3.1 Les protéines du complexe polymérase

L'activité de la polymérase L requiert son interaction avec la phosphoprotéine P, qui médie son recrutement à la NC. D'autre part, la transcription du VRS dépend du recrutement par P de la protéine M2-1. Le fonctionnement de ce complexe protéique repose par conséquent sur de nombreuses interactions protéine-protéine hautement spécifiques et transitoires, au sein desquelles la protéine P joue le rôle central de connecteur entre les différents partenaires.

Ces dernières années ont été marquées par la caractérisation structurale des quatre protéines du complexe polymérase, seules ou en complexe. Les paragraphes suivants décrivent ces différentes protéines et leur rôle respectif au sein du complexe.

1.3.1.1 La phosphoprotéine P

La phosphoprotéine P (241 acides aminés, 27 kDa), est composée d'un domaine central d'oligomérisation (OD) lui permettant de former des tétramères (Castagné *et al.*, 2004; Gilman *et al.*, 2019; Llorente *et al.*, 2008, Llorente *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2017) (Figure 5), et de domaines N-terminaux (NTD) et C-terminaux (CTD) intrinsèquement désordonnés. Différents sites de phosphorylation ont pu être identifiés sur P (Barik *et al.*, 1995; Navarro *et al.*, 1991; Sanchez-Seco *et al.*, 1995). Toutefois, le rôle de ces modifications post-traductionnelles est inconnu à l'heure actuelle, les mutations de ces résidus n'inhibant pas la réplication et la transcription virales (Lu *et al.*, 2002; Villanueva *et al.*, 2000).

Les domaines N- et C-terminaux de P, capables d'adopter une structure secondaire lors de l'interaction avec d'autres protéines du complexe polymérase (Castagné *et al.*, 2004 ; Noval *et al.*, 2016 ; Pereira *et al.*, 2017 ; Simabuco *et al.*, 2011), jouent un rôle majeur dans les modulations d'interactions au sein du complexe polymérase. Plus spécifiquement au niveau de sa partie N-terminale, les résidus (1-40) et (90-110) de P sont respectivement impliqués dans les interactions avec la forme monomérique de N (N⁰) (Galloux 2015 ; Esneau 2019) et avec M2-1 (Tran *et al.*, 2009; Blondot *et al.*, 2012). En outre, il a également pu être montré que ce bras N-terminal interagit avec la phosphatase cellulaire PPI impliquée dans la déphosphorylation de M2-1 (Richard *et al.*, 2018), et participe à l'interaction de P avec la protéine de matrice M (Bajorek *et al.*, 2021). L'extrémité C-terminale de P

est quant à elle impliquée dans l'interaction avec L, (Sourimant *et al.*, 2015 ; Gilman *et al.*, 2019) (Figure 5), et la NC (Tran *et al.*, 2007, Galloux *et al.*, 2012. Ouizougun-Oubari *et al.*, 2015).

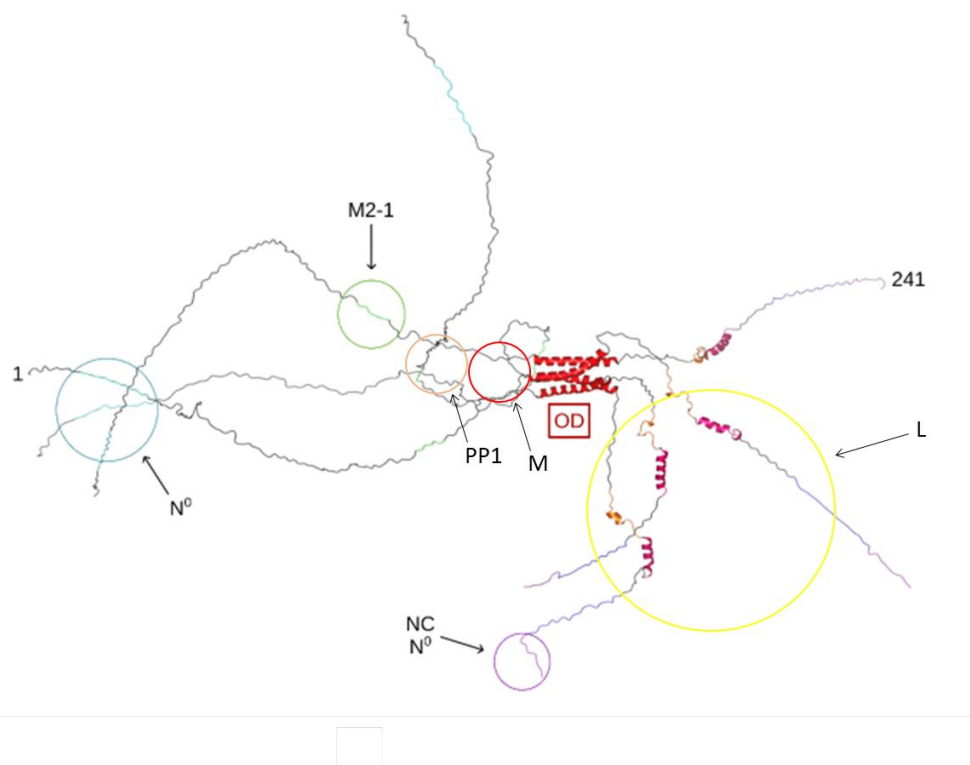


Figure 5 : Structure d'un tétramère de P. Les régions d'interaction avec les protéines virales N⁰, M2-1, NC, L, M et la phosphatase cellulaire PP1 sont indiquées par des cercles. Adapté de (Pereira *et al.*, 2017).

1.3.1.2 La polymérase L

La polymérase L du VRS est une ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp, *RNA-Dependent RNA-Polymerase*), de 250 kDa, responsable de la transcription et la réplication du génome viral. Cette protéine présente cinq domaines fonctionnels et structuraux : un domaine RdRp, un domaine polyribonucléotidyltransférase (PRNTase) qui permet de synthétiser la coiffe 5' des ARN messagers (ARNm) viraux, un domaine connecteur (CD, *Connector Domain*), un domaine méthyltransférase (MTase) responsable de la méthylation de la coiffe des ARNm, et un domaine C-terminal (CTD, *C-Terminal Domain*) dont la fonction reste à déterminer (Gilman *et al.*, 2019). Les différentes activités enzymatiques de L ne seront pas détaillées dans le cadre présent. Toutefois, il est important de noter que les sites actifs de L représentent autant de cibles thérapeutiques d'intérêt.

La structure des domaines RdRp et PRNTase, en interaction avec un tétramère de P, a été résolue par cryo-microscopie électronique (cryo-EM) (Gilman *et al.*, 2019) (Figure 6). Cette structure a permis de mettre en évidence la complexité de l'interaction L-P, chaque bras C-terminal de P (tétramère) adoptant une structure différente au contact de la L.

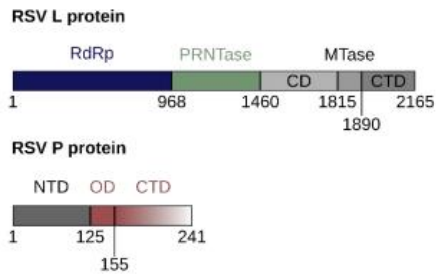
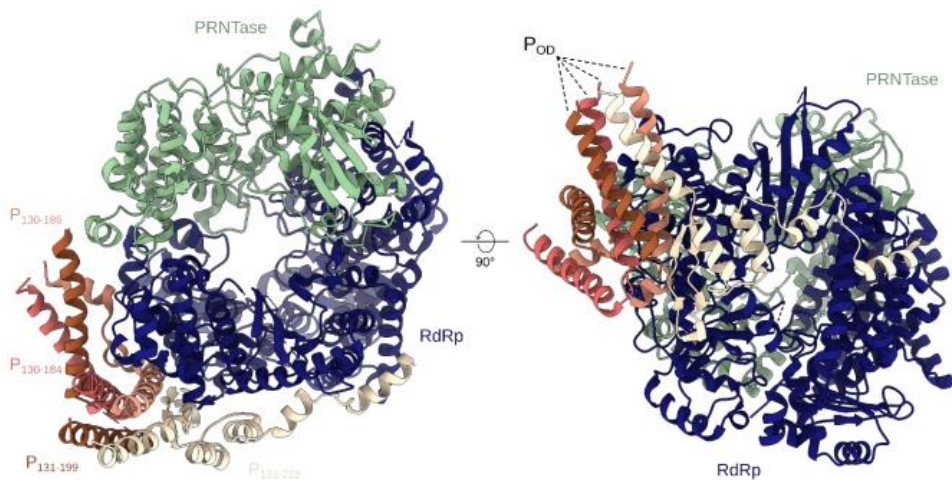
A**B**

Figure 6 : Structure cryo-EM du complexe L-P. **(A)** Représentation schématique des séquences de L et P et de leurs sous-domaines structuraux. Les schémas ne sont pas à l'échelle. **(B)** Structure cryo-EM du complexe L-P (PDB: 6PZK, Gilman *et al.*, 2019). Les domaines RdRp et PRNTase sont colorés suivant le code couleur du schéma de la séquence. Chaque monomère de P est coloré dans une nuance de rose.

1.3.1.3 La nucléoprotéine N

La nucléoprotéine N (391 acides aminés, 44 kDa), serait présente sous deux formes au cours du cycle viral : la forme néosynthétisée monomérique N^0 , et la forme oligomérique liée à l'ARN viral appelée nucléocapside (NC).

La structure de la N recombinante exprimée en *E. coli* et purifiée sous forme d'anneaux composés de dix protomères complexés à l'ARN a pu être déterminée par cristallographie en 2009 (Tawar *et al.*, 2009) (Figure 7B). Cette structure a mis en évidence la présence de deux domaines globulaires, un domaine N-terminal (NTD) et un domaine C-terminal (CTD), principalement composés d'hélices- α et reliés par une région charnière. Au niveau de la région charnière, l'interface entre NTD et CTD forme le sillon d'interaction avec l'ARN, chaque protéine N fixant sept nucléotides (Tawar *et al.*, 2009). Enfin, les extrémités N- et C-terminales de N (N- et C-terminal arm), composées d'environ 30 résidus, jouent un rôle majeur dans l'interaction entre protomères N_i-N_{i+1} et N_i-N_{i-1} (Figure 7B).

Très récemment, la structure par cryo-EM d'hélices de N recombinante, exprimée en cellules d'insecte, a été résolue (Figure 7C). Cette structure met en évidence une organisation atypique des hélices de VRS comparée à celle des autres *Mononegavirales*, avec en particulier une orientation différente des protomères de N par rapport à l'axe de l'hélice, répétée tous les deux tours d'hélice (Gonnin *et al.*, 2023). Cette orientation des protomères induit une accessibilité à l'ARN différente en fonction du protomère considéré, qui pourrait jouer un rôle dans l'activité de la polymérase.

La protéine N présente une forte tendance à s'oligomériser couplée à une forte affinité pour l'ARN. Au cours du cycle viral, la N néosynthétisée doit par conséquent être maintenue monomérique et libre d'ARN (forme N^0) afin d'encapsider spécifiquement les génomes et antigénomes du VRS. Le maintien de la forme N^0 dépend de son interaction avec la protéine P, qui agit ici comme un chaperon moléculaire (Figure 7D). Dans cette conformation, les résidus N-terminaux de P se fixent sur le CTD, empêchant l'interaction du bras N-terminal d'un autre protomère de N (Galloux 2015, Esneau 2019) (Figure 7D). Cette compétition d'interactions inhiberait l'oligomérisation de N. D'autre part, il a pu être montré que sous la forme N^0 , le bras C-terminal de N se replie au niveau du sillon d'interaction avec l'ARN, inhibant ainsi l'encapsidation (Esneau 2019). Si la structure de la forme N^0 du VRS n'est toujours pas déterminée à ce jour, la structure cristallographique de la N^0 de HMPV corrèle avec ces observations (Renner *et al.*, 2016).

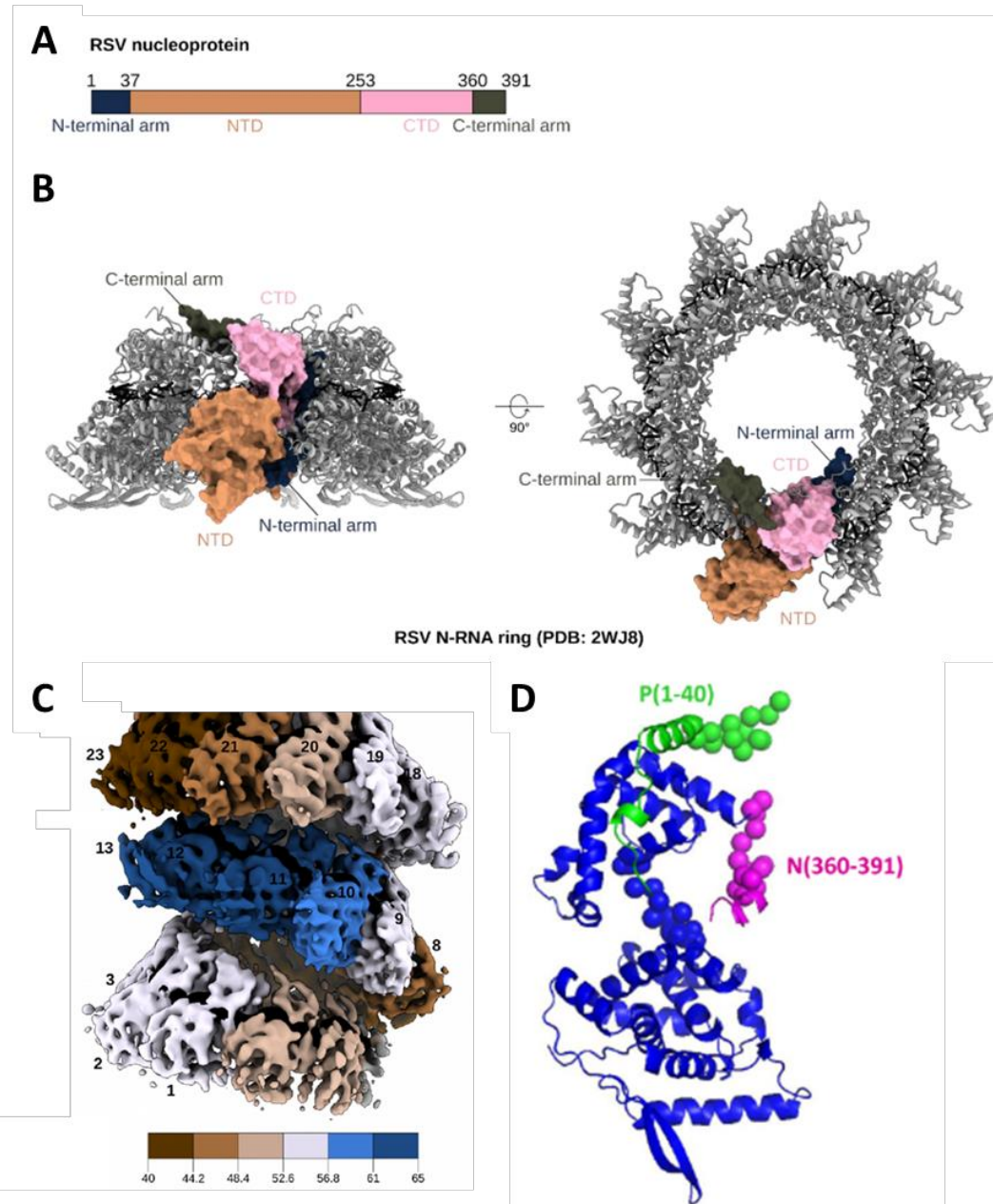


Figure 7 : Structures de la nucléoprotéine N. **(A)** Schéma de la séquence de N mettant en évidence les sous-domaines structuraux. **(B)** Structure cristallographique d'un anneau de N-ARN (PDB: 2WJ8, Tawar *et al.*, 2009). Un protomère de N est coloré suivant le code couleur utilisé en (A), les autres protomères sont en gris, l'ARN est en noir. **(C)** Structure cryo-EM de la nucléocapside du VRS (Gonnin *et al.*, 2023), un protomère est coloré suivant le code couleur utilisé en (A, B). **(D)** Modèle d'un monomère de N⁰ en interaction avec les 40 premiers résidus de P. Le protomère de N (résidus 31-382) est coloré en bleu, le bras C-terminal de N (résidus 383-391) est coloré en rose, et le peptide de P est coloré en vert (d'après Esneau *et al.*, 2019).

1.3.1.4 La protéine M2-1

La protéine M2-1 (194 résidus, 22 kDa) comporte un domaine de fixation au zinc (ZBD, *Zinc Binding Domain*), un domaine de tétramérisation (OD), un domaine globulaire (*domain core*), et une région désordonnée de vingt acides aminés C-terminale (Blondot *et al.*, 2012; Tanner *et al.*, 2014). M2-1 présente deux sites de phosphorylation, sur les sérines 58 et 61 (Cartee and Wertz, 2001) (Figure 8).

Le tétramère de M2-1 joue le rôle d'anti-terminateur de transcription. En effet, au cours de la transcription, la polymérase L a tendance à se décrocher du génome en fin de gène, au niveau des séquences GE. Ceci expliquerait le gradient d'expression des gènes viraux en fonction de leur position sur le génome. Si ces observations ont été récemment remises en question, il a néanmoins pu être démontré que M2-1 est nécessaire à l'expression de l'ensemble des gènes viraux, et favoriserait la processivité de la polymérase L le long du génome viral, (Collins *et al.*, 1996 ; Fearn and Collins, 1999 ; Hardy and Wertz, 1998 ; Sutherland *et al.*, 2001). M2-1 interagit avec la protéine P et les ARNm viraux. Plus spécifiquement, un site d'interaction à l'ARN a été identifié sur le domaine ZBD (Gao *et al.*, 2020), et un second site de fixation à l'ARN a été caractérisé sur le domaine core (Blondot *et al.*, 2012). Ce second site est proche et chevauchant avec celui de fixation de la P (Blondot *et al.*, 2012).

Le mécanisme d'action de M2-1 reste mal caractérisé. Au cours du cycle viral, la protéine M2-1 est recrutée au sein des usines virales via son interaction avec la protéine P. Cette interaction induit la déphosphorylation de M2-1, médiée par la phosphatase cellulaire PPI recrutée par P. Cette déphosphorylation conduit à une transition d'interaction M2-1-P vers M2-1 ARNm (Richard *et al.*, 2018).

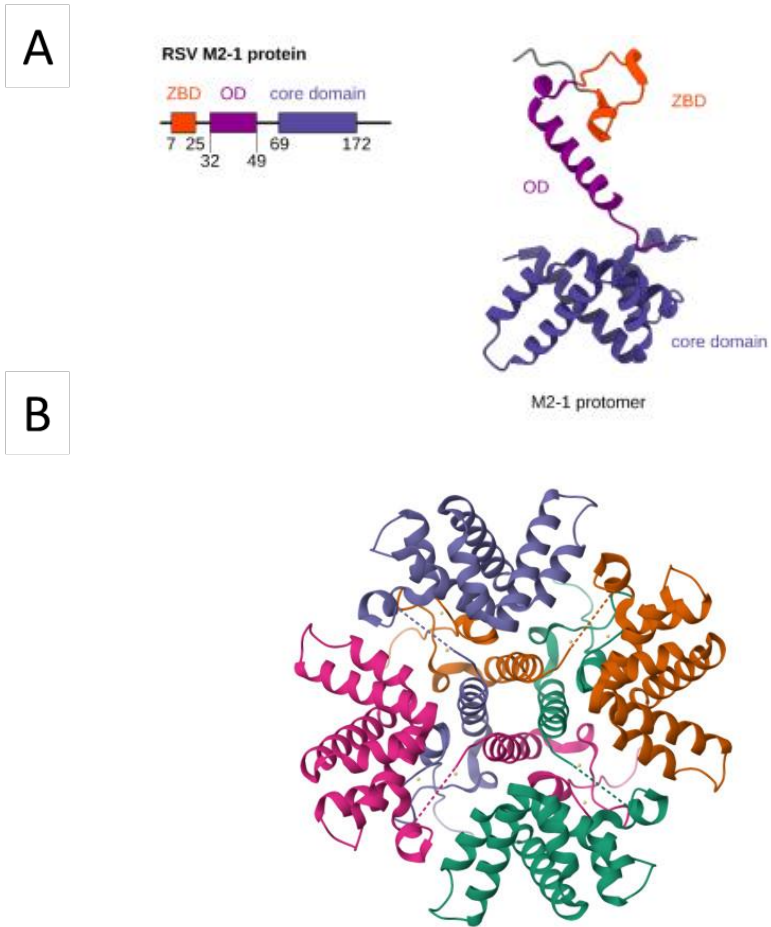


Figure 8 : Structure de la protéine M2-1. **(A)** Schéma de la séquence de M2-1 (gauche) et structure cristallographique d'un protomère de M2-1 (PDB : 6GOY, Selvaraj *et al.*, 2018) (droite). Les sous-domaines structuraux sont indiqués. **(B)** Structure cristallographique d'un tétramère de M2-1 (PDB : 4C3D, Tanner *et al.*, 2014). Chaque protomère de M2-1 est dans une couleur différente.

1.3.2 La protéine M et les protéines de l'enveloppe virale

Le VRS est un virus enveloppé dont l'assemblage dépend de la protéine de matrice M. La membrane contient trois protéines virales : la petite protéine hydrophobe (SH), la glycoprotéine (G) et la protéine de fusion (F). En particulier, les protéines G et F jouent un rôle clé dans l'entrée du virus dans la cellule hôte, et représentent en conséquence des cibles thérapeutiques d'intérêt.

1.3.2.1 La protéine de matrice M

La protéine M joue un rôle central dans l'assemblage de la particule virale. La structure cristallographique de dimères de M (29 kDa) a été obtenue en 2015 (Förster *et al.*, 2015) (Figure 9), révélant une organisation structurale très proche de celle des autres virus de l'ordre *Mononegavirale* (Dessen *et al.*, 2000 ; Neumann *et al.*, 2009 ; Battisti *et al.*, 2012 ; Leyrat *et al.*, 2014). M est composée de deux domaines composés d'hélices alpha et feuillets bêta, reliés par une région centrale désordonnée.

Différents états d'oligomérisation de M ont été caractérisés (Money *et al.*, 2009). Toutefois, des données ont montré que la forme dimérique est indispensable au bourgeonnement (Förster *et al.*, 2015). Le passage de la forme dimère à des niveaux plus importants d'oligomérisation, lorsque M est en contact avec la membrane cellulaire, déclencherait la formation de nouvelles particules virales (Harrison *et al.*, 2010).



Figure 9 : Structure du dimère de M, issue de (PDB : 4V23, Förster *et al.*, 2015). Chaque protomère est coloré différemment.

1.3.2.2 La petite protéine hydrophobe (SH)

La petite protéine hydrophobe SH, peu abondante dans les particules virales, est un canal ionique dont la fonction n'est pas clairement comprise à ce jour.

Il a pu être observé que cette protéine s'accumule dans les cellules infectées au niveau de l'appareil de Golgi (Rixon *et al.*, 2004), suggérant une activité sur les voies de sécrétions des cellules infectées. Cependant, aucune donnée ne confirme cette hypothèse actuellement.

Des résultats suggèrent également que SH joue un rôle d'auxiliaire lors de la fusion (Heminway *et al.*, 1994; Perez *et al.*, 1997; Techaarpornkul *et al.*, 2001) à travers son interaction avec la protéine de fusion F (Feldman *et al.*, 2001). Toutefois, la protéine SH n'est pas indispensable pour la réplication du VRS et la formation de nouvelles particules virales.

Plus certainement, la protéine SH pourrait jouer un rôle dans les mécanismes d'évasion du virus au système immunitaire de l'hôte (Bukreyev *et al.*, 1997). En effet, chez l'animal infecté, la déplétion du gène codant pour SH entraîne une atténuation de la réplication virale, indiquant son rôle dans la pathogénicité (Techaarpornkul *et al.*, 2001). Enfin, des travaux ont démontré que SH inhibe les processus d'apoptose dans les cellules infectées (Fuentes *et al.*, 2007), mais le mécanisme exact de cette inhibition reste inconnu.

1.3.2.3 La glycoprotéine (G)

Cette protéine membranaire permet l'attachement aux cellules de l'hôte, et favorise l'entrée du virus dans la cellule. Deux formes de G sont produites par les cellules infectées : une forme « longue » qui exerce la fonction d'attachement (Levine *et al.*, 1987), et une forme « tronquée » sécrétée (sG) qui agit comme un leurre pour le système immunitaire (Hendricks *et al.*, 1987). En effet, la séquence codant la glycoprotéine G contient un codon AUG alternatif qui donne lieu à une transcription alternative. Dans la séquence complète, cet AUG code le résidu Met48, localisé dans le domaine transmembranaire (Roberts *et al.*, 1994). La forme tronquée de la protéine subit une protéolyse, conduisant à la libération du domaine extracellulaire de son ancrage à la membrane plasmique (Hendricks *et al.*, 1988) (Figure 10).

La glycoprotéine G est une protéine transmembranaire de type II d'environ 300 acides aminés, dont la taille varie entre les souches de VRS. Le domaine extracellulaire contient deux régions variables analogues à la mucine, une région centrale fortement conservée et une région de fixation à l'héparine (Figure 10). La séquence de la glycoprotéine G est la moins conservée du génome du VRS, les régions analogues à la mucine constituant des déterminants pour les souches de VRS (Mufson *et al.*, 1985).

Le domaine extracellulaire subit des modifications post-traductionnelles sous la forme de glycosylations, qui représentent 60% de la masse moléculaire de la protéine (Satake *et al.*, 1985 ; Wertz *et al.*, 1985). Les régions analogues à la mucine contiennent près de 35% de sérines et de thréonines et sont intrinsèquement désordonnées (Wertz *et al.*, 1985).

La région centrale de 26 acides aminés varie en fonction de la souche virale mais contient treize acides aminés strictement conservés qui se superposent en partie à un domaine chimiokine. Ce domaine contient quatre cystéines s'associant pour former un motif CX₃C (Gorman *et al.*, 1997). La structure de la région centrale de la glycoprotéine G a été résolue par RMN (Sugawara *et al.*, 2002) mais la structure complète de la glycoprotéine G est inconnue pour le moment.

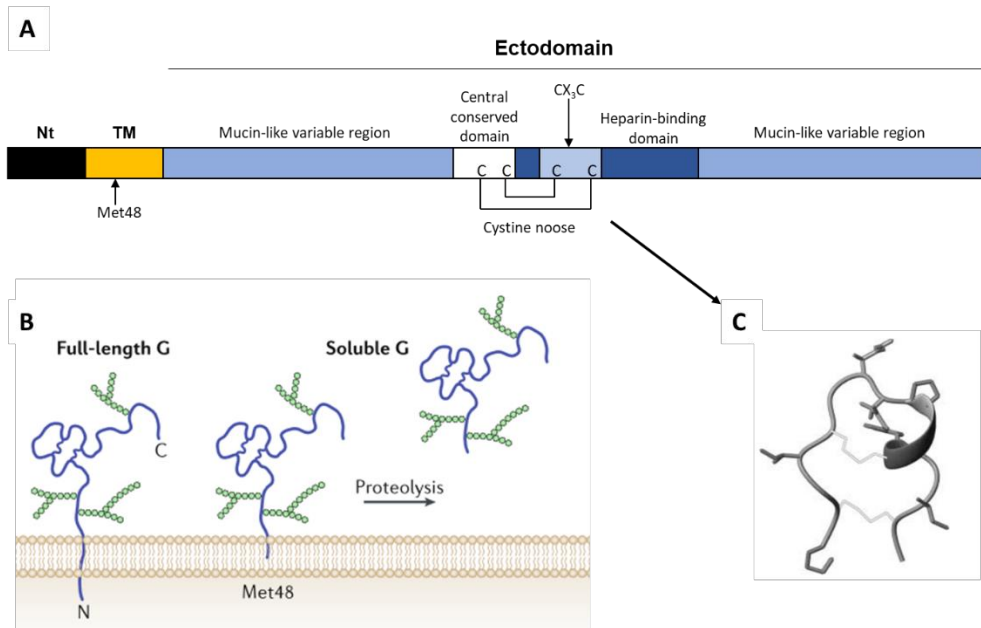


Figure 10 : Structure de la glycoprotéine G. **(A)** Schéma de la séquence de G, chaque domaine est représenté par une boîte. Nt = domaine cytoplasmique N-terminal, TM = domaine transmembranaire **(B)** Schéma des deux isoformes de G, figure adaptée de (Battles et McLellan, 2019) **(C)** Structure de la région centrale de G portant le motif CX₃C, résolue par (Sugawara *et al.*, 2002).

1.3.2.4 La protéine de fusion (F)

La protéine F médie l'entrée du virus dans la cellule en interagissant avec différents récepteurs (décrits dans la section 1.4.1.1 de ce manuscrit), et induit la fusion entre membrane cellulaire et virale, nécessaire à la libération du génome viral dans le cytoplasme de la cellule hôte.

La protéine F est une protéine transmembranaire de type I de 574 acides aminés qui partage des similarités de structure avec d'autres protéines de fusion de *Paramyxoviridae* (Yin *et al.*, 2005 ; Yin *et al.*, 2006). La F est exprimée sous la forme d'un précurseur F₀. Lors de sa maturation, F₀ est clivée sur deux sites séparés de 27 acides aminés, libérant le peptide 27 (pep27) (Figure 11A) (Zimmer *et al.*, 2001). Cet évènement a lieu au niveau du *trans*-Golgi lorsque F est transportée vers la membrane plasmique, et est effectué par une protéase de type furine (Collins et Mottet, 1991). La maturation de F₀ génère ainsi deux sous-unités : l'extrémité C-terminale F₁ (résidus 137 à 574), et l'extrémité N-terminale F₂ (résidus 26 à 109) de masses respectives 50 kDa et 15 kDa. Ces deux sous-unités sont connectées par deux ponts disulfures (Figure 11) (Bolt *et al.*, 2000). Trois protomères de F s'associent ensuite pour former une protéine trimérique mature.

Une fois mature, la protéine de F adopte sa conformation pré-fusion, de forme sphéroïdale (McLellan *et al.*, 2013). Dans cette conformation, le peptide de fusion (FP), situé à l'extrémité N-terminale de la sous-unité F₁, est enfoui dans la cavité centrale de la protéine (Figure 11B). La conformation pré-fusion de F possède une faible énergie d'activation. En conséquence, cette forme instable présente une forte propension à changer de conformation vers la forme post-fusion (Liljeroos *et al.*, 2013 ; Killikelly *et al.*, 2016). Lors du changement de conformation de la pré-fusion vers la post-fusion, le peptide de fusion est exposé en surface, à distance de l'enveloppe virale, permettant son insertion dans la membrane cellulaire. (Figure 11B).

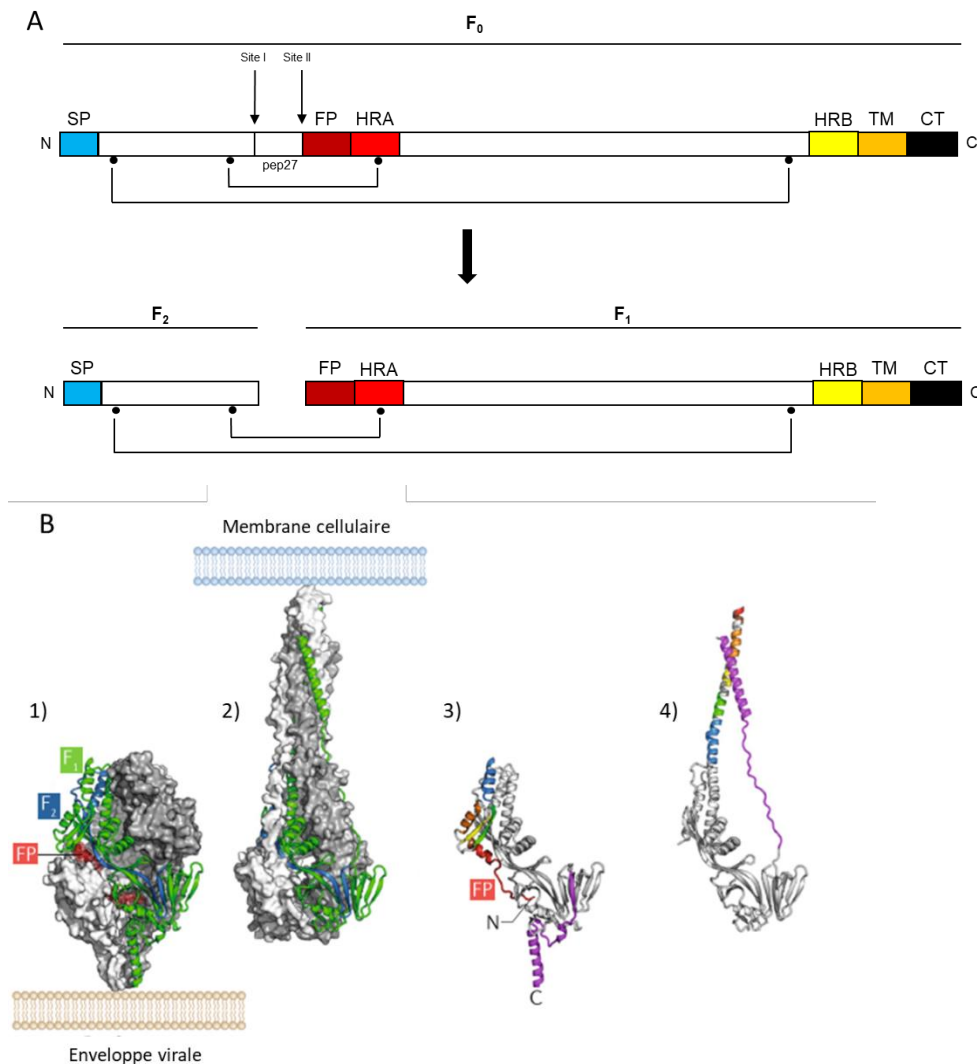


Figure 11 : Structure de la protéine de fusion F. **(A)** Séquences de la protéine de fusion F du VRS avant et après maturation. F_0 = forme précurseur non mature, F_1 et F_2 = les deux sous-unités de la protéine mature, SP= peptide signal, TM= domaine transmembranaire, FP= peptide de fusion, CT= domaine cytoplasmique C-terminal (*cytoplasmic tail*), HRA et HRB= régions de répétition d'heptades. **(B)** Structures 3D des trimères de F du VRS sous formes pré-fusion (1) (PDB : 3RRR, McLellan *et al.*, 2011), et post-fusion (2) (PDB : 4JHW, McLellan *et al.*, 2013), et des protomères pré-fusion (3) et post-fusion (4). Figure adaptée de (Battles et McLellan, 2019).

Le changement de conformation de la F induit également l'association sous forme d'épingle trimérique des répétitions d'heptades situées aux extrémités N- et C-terminales de la sous-unité F₁ (Figure 11). Ces épingles permettent le rapprochement des deux membranes pour effectuer la fusion.

L'ensemble du processus de changement de conformation de la protéine de F est irréversible, la conformation post-fusion étant extrêmement stable avec un point de fusion supérieur à 90°C (McLellan *et al.*, 2011). D'autre part, le différentiel d'énergie libre entre les deux conformations de la protéine F est suffisant pour déstabiliser et fusionner les deux membranes juxtaposées. Ce processus, indépendant du pH (Srinivasakumar *et al.*, 1991), explique la formation de syncytia en culture cellulaire.

1.4 LE CYCLE VIRAL

Le VRS effectue l'intégralité de son cycle dans le cytoplasme des cellules infectées. Le processus d'entrée du virus dans la cellule s'effectue en deux étapes : attachement de la particule virale à la cellule hôte puis fusion des membranes virales et cellulaires (Figure 12). Comme précédemment évoqué, ces deux étapes sont médiées par les protéines F et G.

Après fusion, le complexe ribonucléoprotéique (RNP, contenant NC, L, P, et M2-1) est libéré dans le cytoplasme (Figure 12). La réplication et la transcription se déroulent au sein de structures viro-induites appelées corps d'inclusion cytoplasmiques (IBs, *pour inclusion bodies*) ou usines virales (Rincheval *et al.*, 2017) (Figure 12). Les IBs contiennent l'ensemble des ARNm viraux, concentrés avec M2-1 au sein de sous structures (IBAG pour *IB associated granule*). Ces ARNm sont ensuite exportés vers le cytoplasme de la cellule. La traduction des ARNm viraux s'effectue grâce à la machinerie cellulaire d'expression des protéines (Figure 12). En particulier, les protéines transmembranaires virales (F, G et SH) sont exprimées à travers le système Réticulum Endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi avant d'être acheminées à la membrane plasmique.

Enfin, l'assemblage de nouvelles particules virales et le bourgeonnement prennent place à la membrane plasmique (Figure 12).

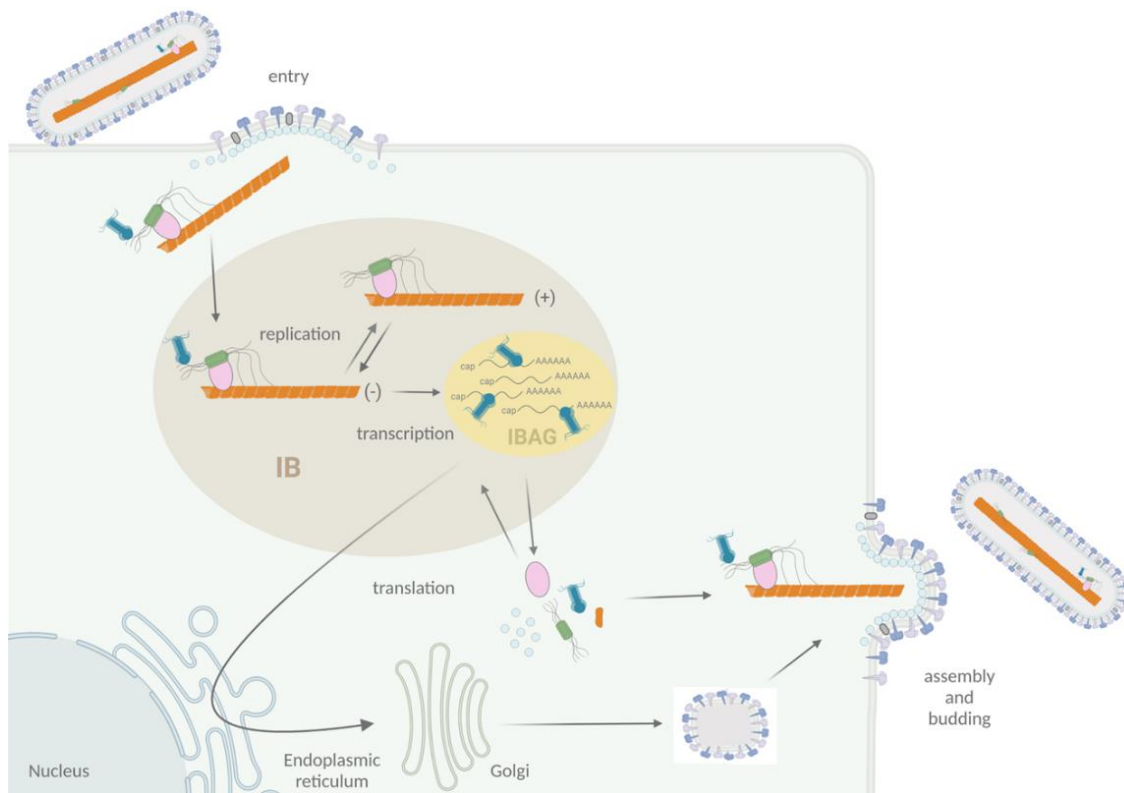


Figure 12 : Schéma du cycle viral du VRS. IB : *Inclusion Body* (corps d'inclusion cytoplasmique), IBAG : *Inclusion Body Associated Granule* (granule associée au corps d'inclusion). Figure adaptée de (Decool *et al.*, 2021). Les protéines virales sont représentées suivant le code couleur de la [figure 4](#).

1.4.1 Entrée dans la cellule

Le tropisme du VRS est très restreint dans l'organisme, il se limite aux cellules épithéliales ciliées des voies respiratoires, ainsi qu'au pneumocytes de type I (Johnson *et al.*, 2007). Le VRS peut également infecter des macrophages alvéolaires mais l'infection n'est, dans ce cas, pas productive (Heyckers *et al.*, 2019).

1.4.1.1 Attachement

Lors de l'infection, le rôle principal de la protéine G est de permettre aux particules virales d'entrer en contact avec les cellules de l'hôte.

La glycoprotéine G est porteuse d'un domaine de fixation à l'héparine (HBD, *Heparin Binding Domain*) (Figure 10), qui lui permet d'interagir avec les glycosaminoglycanes (GAGs) présents à la surface de nombreuses cellules (Krusat et Streckert, 1997). L'absence de ce domaine chez des variants de G n'abolit cependant pas l'interaction avec les GAGs, suggérant une interaction avec d'autres régions de la protéine G (Escribano-Romero *et al.*, 2004). A noter que la faible abondance de GAGs à la surface des cellules épithéliales ciliées des voies respiratoires remet en doute leur importance dans l'étape d'attachement du virus à la cellule hôte (Johnson *et al.*, 2015).

Un autre partenaire d'interaction avec G est le récepteur de chimiokine CX₃C (CX₃CR1). Ce récepteur est exprimé par différents types cellulaires dont des cellules épithéliales et endothéliales (Imai *et al.*, 1997 ; Kim *et al.*, 2011). Il est exprimé dans les poumons par les cellules épithéliales ciliées (Jeong *et al.*, 2015 ; Anderson *et al.*, 2020). Dans la séquence de la protéine G se trouve un motif CX₃C analogue à celui présent dans la séquence de la fractalkine, le ligand principal de CX₃CR1 (Tripp *et al.*, 2001 ; Kim *et al.*, 2011). Lors de l'infection au VRS, le domaine CX₃C de la protéine G se fixe au récepteur CX₃CR1 à la fois *in vitro* mais aussi *in vivo* (Jeong *et al.*, 2015 ; Anderson *et al.*, 2020 ; Green *et al.*, 2021). Les GAGs sont peu exprimés dans les cellules de l'épithélium respiratoire humain, CX₃CR1 est donc un candidat d'interaction avec G plus crédible que les GAGs *in vivo* (Anderson *et al.*, 1988 ; Johnson *et al.*, 2015 ; Anderson *et al.*, 2020 ; Green *et al.*, 2021).

Toutefois, la protéine G n'est pas indispensable à l'infection, la délétion des gènes codant les protéines G et SH permettant la réplication du virus en culture cellulaire (Karron *et al.*, 1997 ; Techaarpornkul *et al.*, 2001). Ces données indiquent que F suffit pour médier l'attachement aux cellules de l'hôte.

Il a ainsi été démontré que F interagit avec les GAGs (Feldman *et al.*, 2000). Différentes études ont également permis d'identifier des récepteurs de F qui pourraient jouer un rôle dans l'attachement et/ou la fusion du VRS avec la cellule hôte. Premièrement, des données suggèrent une interaction entre F et l'*Intercellular adhesion molecule 1* (ICAM1) (Behera *et al.*, 2001). Les niveaux d'expression de ICAM1 augmentent significativement dans les cellules lors de l'infection au VRS (Arnold et König, 1996 ; Wang *et al.*, 2000), contribuant à l'inflammation et à l'obstruction des voies respiratoires (Stark *et al.*, 1996). Un autre récepteur potentiel pour le VRS est l'*Epidermal growth factor receptor* (EGFR) (Currier *et al.*, 2016). Une augmentation de l'expression d'EGFR a été observée lors de l'infection au VRS, associée à une augmentation de la macropinocytose (Krzyzaniak *et al.*, 2013). Enfin, des données suggèrent une interaction entre F et la nucléoline (Tayyari *et al.*, 2011 ; Mastrangelo *et al.*, 2021). Malgré les faibles niveaux d'expression de la nucléoline à la membrane cellulaire, cette protéine possède une demi-vie très courte (<1 heure), et la présence de nucléoline à la membrane rend possible son interaction avec F (Hegele, 2012).

Il faut noter que pour tous ces récepteurs et facteurs d'attachement, aucune interaction biophysique ou biochimique n'a encore été démontrée.

1.4.1.2 Fusion

Une fois l'attachement à la cellule hôte effectué, la fusion entre la membrane cellulaire et la membrane virale doit avoir lieu pour permettre la libération du complexe RNP dans le cytoplasme.

Deux mécanismes sont proposés pour décrire l'entrée du VRS dans les cellules. Des travaux proposent que la fusion débute à la membrane plasmique dans des régions riches en cholestérols (San-Juan-Vergara *et al.*, 2012). D'autres données suggèrent une entrée du virus par macropinocytose (Krzyzaniak *et al.*, 2013).

D'autre part, le mécanisme détaillé de la fusion reste largement incompris. La première hypothèse considère la possibilité d'une activation médiée par l'interaction avec un récepteur fonctionnel, par exemple la nucléoline (Figure 13). Cette hypothèse reste à démontrer.

Une hypothèse alternative est l'absence de contrôle du VRS sur l'activation de la fusion. En effet la forme pré-fusion de F est très instable et change de conformation vers la forme post-fusion (Liljeroos *et al.*, 2013). Il est par conséquent possible que le taux de conversion basal entre pré-fusion et post-fusion suffise pour effectuer une fusion efficace du VRS avec la cellule, une fois que l'attachement a suffisamment rapproché la membrane cellulaire de la membrane virale (Figure 13). Cette hypothèse nécessite cependant d'être démontrée.

Enfin, il est possible que la protéine G interagisse avec F pour la stabiliser dans la conformation pré-fusion. Cette hypothèse est remise en cause par la viabilité des virions en l'absence de G et SH, et par la structure désordonnée de G (Leyrat *et al.*, 2014).

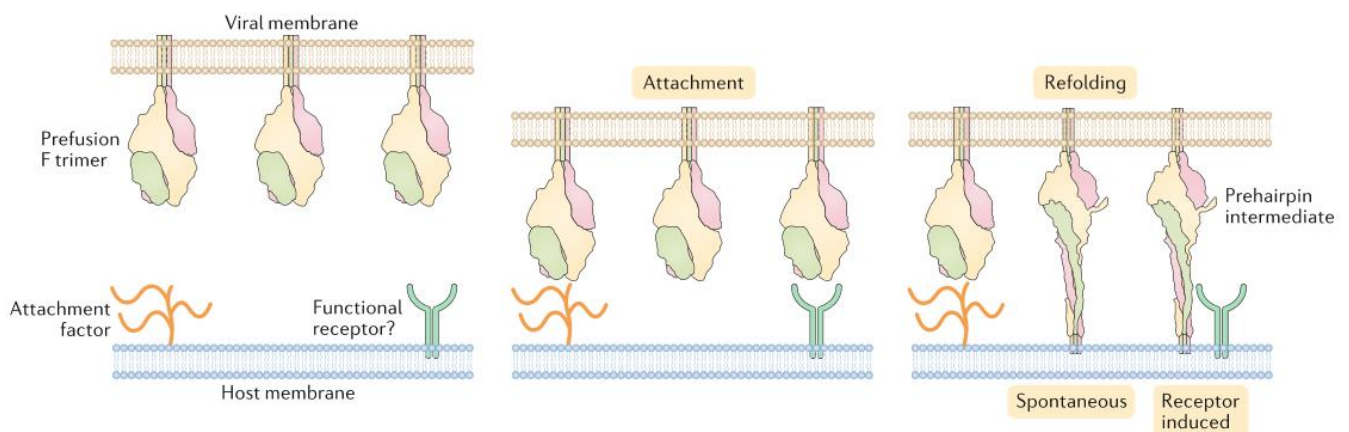


Figure 13 : Modèles d'attachement et fusion du VRS médiés par la protéine F. La protéine de fusion F peut interagir avec des facteurs cellulaires pour effectuer l'attachement du VRS à la cellule. La protéine F peut aussi interagir avec un récepteur fonctionnel qui induirait un changement de conformation de F. Enfin, F pourrait changer de conformation spontanément pour effectuer la fusion. Figure adaptée de (Battles et McLellan, 2019).

1.4.2 Les usines virales, ou corps d'inclusions cytoplasmiques

Après libération du complexe RNP dans le cytoplasme de la cellule hôte, la formation de structures cytoplasmiques sans membranes est observée (Norrby *et al.*, 1970) (Figure 14). Ces structures nommées corps d'inclusion cytoplasmiques (IBs), sont retrouvées lors de l'infection par les virus de l'ordre des *Mononegavirales* : HMPV (Cifuentes-Muñoz *et al.*, 2017), les virus parainfluenza 3 et 5 (HPIV3, PIV5 respectivement) (Zhang *et al.*, 2017 ; Carlos *et al.*, 2009) le virus Nipah (NiV) (Ringel *et al.*, 2019), le virus de la rage (Lahaye *et al.*, 2009), le virus de la rougeole (MeV) (Zhou *et al.*, 2019), le VSV (Heinrich *et al.*, 2010), le virus Ebola (EBOV) (Hoenen *et al.*, 2012) et le virus de Marburg (MARV) (Kolesnikova *et al.*, 2000). Longtemps considérées comme des structures permettant de concentrer des produits de dégradation issus de l'infection, plusieurs études récentes ont permis de démontrer qu'il s'agit d'usines virales où ont lieu les étapes de réplication et transcription du génome viral (Rincheval *et al.*, 2017). Il a également pu être montré que ces structures sont des organelles liquides, dont la formation est induite par des mécanismes de séparation de phase dépendants des interactions entre les protéines N et P (Galloux *et al.*, 2020).

A ce titre, les IBs concentrent l'ensemble des protéines du complexe polymérase (N, P, L et M2-1) ainsi que l'ARN génomique/anti-génomique et les ARNm viraux (Rincheval *et al.*, 2017). Une particularité du VRS est la présence, au sein des IBs, de sous-compartiments appelés IBAGs où se concentrent des ARNm viraux associés à la protéine M2-1 (Rincheval *et al.*, 2017) (Figure 14).

D'autres protéines virales ont également été retrouvées associées aux IBs, telles que les protéines NS2 et M (Ghildyal *et al.*, 2002 ; Weber *et al.*, 1995). De même, différentes protéines cellulaires ont pu être identifiées au sein des IBs : la phosphatase PP1 (Richard *et al.*, 2018), l'actine (Jeffrey *et al.*, 2007), les protéines chaperons HSP70 et HSP90 (*Heat Shock Protein*) (Munday *et al.*, 2015; Radhakrishnan *et al.*, 2010), des protéines impliquées dans la réponse immunitaire innée (MDA5 et MAVS) (Lifland *et al.*, 2012), et les protéines régulatrices de la transcription *poly(A)-binding protein* (PABP) et *eukaryotic translation initiation factor 4 G* (eIF4G) (Rincheval *et al.*, 2017).

Ainsi, outre leur fonction dans la réplication/transcription virale, ces organelles joueraient un rôle dans le contrôle de la réponse immunitaire innée de l'hôte, ainsi que dans l'assemblage des nouvelles particules virales en tant que plateforme de sorties des génomes viraux néosynthésés.

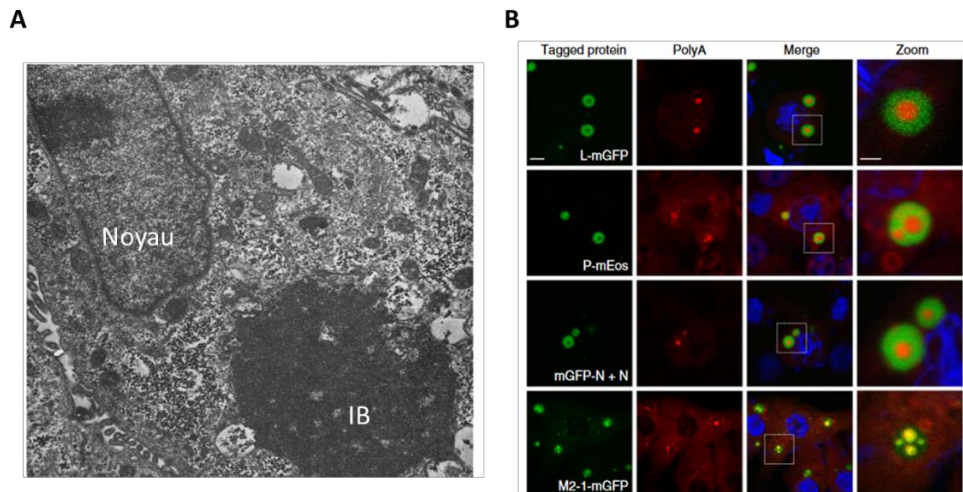


Figure 14 : Les corps d'inclusion cytoplasmiques du VRS. **(A)** Observation de cellules infectées par le VRS en microscopie électronique, mettant en évidence les IBs. Grossissement X24 000. Adapté de (Norrby *et al.*, 1970). **(B)** Images de cellules transfectées avec les protéines N, P, L et M2-1 du VRS, associées à la GFP (*Green Fluorescent Protein*). Les noyaux sont marqués avec du Hoechst 33342. Des analyses de FISH (*fluorescent in situ hybridation*) permettent de visualiser les ARNm poly(A). Les images de la colonne de droite mettent en évidence les IBAGs au sein desquels se concentrent M2-1 et les ARNm viraux, mais desquels sont exclues L, N, et P. Echelle = 5 μ m et 2 μ m pour les zooms (colonne de droite). Adapté à partir de (Rincheval *et al.*, 2017).

1.4.3 Réplication et transcription

La polymérase L effectue l'ensemble des activités catalytiques nécessaires à la transcription et à la réplication du génome viral. A noter que le génome du VRS étant constamment encapsidé par N, il est attendu que la NC « s'ouvre » de manière transitoire pour permettre à L d'accéder au génome (Galloux *et al.*, 2012 ; García-Barreno *et al.*, 1996 ; Mallipeddi *et al.*, 1996 ; Slack et Easton, 1998 ; Tran *et al.*, 2007). Ce mécanisme reste toutefois à caractériser, mais implique que la réplication dépende de la transcription et de la production de protéine N néo-synthétisée et compétente pour l'encapsidation des antigénomes et génomes viraux.

La transcription des ARNm viraux est initiée par la reconnaissance de la séquence « leader » en 3' du génome, à partir du troisième nucléotide (Tremaglio *et al.*, 2013). Aucune amorce n'est nécessaire à la synthèse, la synthèse d'ARN serait contrôlée par une boucle d'amorce située dans le domaine PRNTase de L. Après synthèse et libération de la séquence *leader*, la L initie une nouvelle synthèse d'ARN sur le premier codon *start*. La transcription est séquentielle, chaque gène étant flanqué de codons *start* et *stop*, en 3' et 5' respectivement (Kuo *et al.*, 1996). Comme précédemment mentionné (voir partie 1.3.1.4) M2-1 est indispensable à la transcription de l'ensemble des gènes (Collins *et al.*, 1996 ; Grosfeld *et al.*, 1995). Toutefois, si M2-1 favorise la processivité de L le long du génome, le mécanisme d'action de M2-1 reste inconnu.

La L effectue la synthèse des ARNm viraux ainsi que celle de la coiffe et la méthylation des ARNm (Barik, 1993 ; Liuzzi *et al.*, 2005) (Figure 15). La coiffe subit une méthylation (N-7-méthylation) qui permet la reconnaissance par le facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4F (EIF4F, *eukaryotic translation initiation factor 4F*) (Filipowicz *et al.*, 1976). Les ARNm viraux subissent également une méthylation (2'-O-méthylation) sur les deux premiers nucléotides, signal moléculaire du « soi », évitant la reconnaissance par des senseurs tels que RIG-I et MDA5 (Devarkar *et al.*, 2016 ; Züst *et al.*, 2011). Ainsi, les ARNm viraux ne sont pas différenciables des ARNm cellulaires.

Les mécanismes impliqués dans la régulation de la transition de l'activité transcriptase vers réplicase n'ont toujours pas été caractérisés. Des données de la littérature suggèrent un rôle de la protéine M2-2 (Jin *et al.*, 2000 ; Bermingham et Collins, 1999 ; Blanchard *et al.*, 2020).

La réplication du génome viral peut s'initier sur deux sites : le dernier nucléotide en 3' de la séquence *leader* du génome pour synthétiser l'antigénome, ou le dernier nucléotide en 3' de la séquence *trailer* de l'antigénome pour synthétiser le génome (Braun *et al.*, 2017 ; Mink *et al.*, 1991). Lors de la réplication, les séquences GS et GE sont ignorées, donnant lieu à la synthèse complète du génome. L'antigénome est encapsidé par N au même titre que le génome, et sert à la synthèse des génomes.

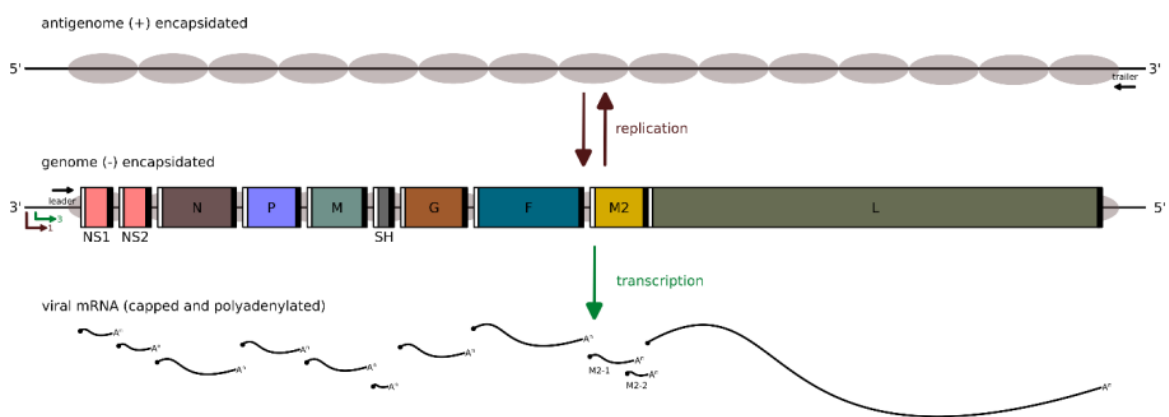


Figure 15 : Réplication et transcription du VRS. Les gènes sont représentés par des boîtes de couleurs différentes, chaque gène est encadré par les séquences GS (*start*, blanc) et GE (*stop*, noir). Le génome et l'antigénome sont encapsidés par N (ovale gris). Le site d'initiation de la réplication est indiqué par une flèche marron, le site d'initiation de la transcription est indiqué par une flèche verte.

1.4.4 Assemblage et bourgeonnement

Les particules virales du VRS s'assemblent à la surface apicale de cellules épithéliales en formant des filaments (Ke *et al.*, 2018 ; Roberts *et al.*, 1995). L'assemblage au niveau de la membrane cellulaire requiert la présence des protéines P, M et F du VRS. La dimérisation de M permet d'amorcer l'assemblage qui se poursuit lorsque M s'oligomérisent, permettant la maturation et la libération des particules virales (Bajorek *et al.*, 2014 ; Förster *et al.*, 2015). Une analyse des particules virales du VRS par cryo-tomographie électronique a récemment révélé la formation d'un treillis hélicoïdal de dimères de M sous la membrane (Conley *et al.*, 2022).

Les mécanismes exacts de l'adressage des protéines virales à la membrane plasmique et d'assemblage des particules virales sont encore largement incompris. Le modèle hypothétique de l'assemblage du VRS se base sur l'interaction en M et le domaine C-terminal de la protéine de fusion F. P est supposé jouer le rôle de connecteur à travers ses interactions avec M et la nucléocapside NC (Meshram *et al.*, 2016 ; Shaikh *et al.*, 2012). De récents travaux suggèrent qu'une interaction entre M et les lipides de la membrane est nécessaire pour la production de particules virales (Swain *et al.*, 2023, bioRxiv preprint).

D'autres travaux proposent l'existence d'évènements d'assemblage dans le cytoplasme des cellules infectées. En effet, ces travaux suggèrent une co-localisation de la glycoprotéine G avec l'ARN génomique du VRS au sein de vésicules d'assemblage cytoplasmiques (Blanchard *et al.*, 2020 ; Vanover *et al.*, 2017 ; Vijayakrishnan *et al.*, 2022, bioRxiv preprint).

1.4.5 Contrôle de la réponse immunitaire

Le contrôle de la réponse immunitaire de l'hôte est un élément clé pour une répllication virale efficace. Les protéines NS1 et NS2 jouent un rôle d'inhibition de la réponse immunitaire. Il a été démontré que NS1 et NS2 ne sont pas indispensables au VRS, mais que leur délétion conduit à des titres viraux réduits en culture cellulaire (Teng *et al.*, 2000 ; Teng and Collins, 1999).

Ces deux protéines perturbent la voie de signalisation MAVS (*Mitochondrial Antiviral Signalling Protein*). NS1 se fixe directement à MAVS et bloque son interaction avec RIG-I (Boyapalle *et al.*, 2012), tandis que NS2 interagit avec le domaine CARD (*Caspase Recruitment Domain*) de RIG-I (Ling *et al.*, 2009). Ces perturbations inhibent les réponses interféron de la cellule (Spann *et al.*, 2005 ; Swedan *et al.*, 2011).

NS1 est également décrite pour son interaction avec la sous-unité 25 du complexe médiateur (MED25) (Dong *et al.*, 2022). MED25 permet l'interaction entre la polymérase II et certains facteurs de transcription. La fixation de NS1 à MED25 pourrait ainsi interférer avec les mécanismes de régulation de l'expression de certains gènes de la cellule infectée.

1.5 VACCINS ET TRAITEMENTS

1.5.1 Vaccins contre le VRS

L'historique du développement des vaccins contre le VRS est marqué par un essai clinique désastreux ayant eu lieu dans les années 1960. Le virus inactivé au formaldéhyde évalué comme candidat vaccin chez l'enfant avait conduit au décès de deux enfants, et induisait des formes graves de bronchiolite ou pneumonie chez les enfants infectés suite à la vaccination. Ce candidat vaccin entraînait en effet une réponse inflammatoire exacerbée, causant des cas graves de bronchiolite (Murphy *et al.*, 1986 ; Openshaw et Tregoning, 2005).

Cet évènement a alerté la communauté scientifique sur la complexité du développement de vaccins contre le VRS, en particulier pour l'enfant. Le développement de ces vaccins a connu une accélération récente, mais les précautions prises n'empêchent pas l'échec de certains candidats vaccins lors des essais cliniques (Taylor, 2021 ; Madhi *et al.*, 2020 ; Novavax, 2019). Ainsi, 19 candidats vaccins sont actuellement en cours de développement pour la prévention de l'infection au VRS ([RSV Vaccine and mAb Snapshot | PATH](#)).

Très récemment, trois vaccins ont cependant obtenu leurs Autorisations de Mise sur le Marché (AMM) : deux vaccins dédiés aux personnes âgées ou les adultes à risque (AREXVY, GlaxoSmithKline et ABRYVVO, Pfizer), et un vaccin dédié aux femmes enceintes (ABRYVVO, Pfizer). Ce dernier vaccin induit une immunisation passive du nouveau-né jusqu'à 6 mois après la naissance (Kampmann *et al.*, 2023). Ce sont les premiers vaccins approuvés contre le VRS dans le monde (Walsh, 2023 ; Papi *et al.*, 2023 ; Vidal Valero, 2023). La seule limitation à la vaccination maternelle est son bénéfice réduit chez les prématurés, l'immunité maternelle étant transmise principalement pendant les dernières semaines de grossesse (Citron *et al.*, 2021).

Les durées d'immunisation apportées par ces vaccins sont incertaines. Des études sont en cours pour déterminer avec certitude la durée de protection conférée par les vaccins commercialisés en 2023. Il est néanmoins attendu que l'immunité muco-sale soit de court terme, nécessitant une administration annuelle du vaccin aux personnes âgées ou à risque. De même, chaque grossesse nécessitera l'administration du vaccin à la femme enceinte.

Si la vaccination représente l'approche de prédilection pour lutter contre les infections par le VRS, celle-ci reste néanmoins insuffisante, rendant nécessaire le développement de stratégies préventives et curatives.

1.5.2 Anticorps monoclonaux

L'immunisation passive contre le VRS est une stratégie étudiée depuis de nombreuses années. La première approche a consisté en l'administration de gammaglobulines polyclonales (RSV-IVIG, RespiGam) (Groothuis *et al.*, 1993 ; Meissner *et al.*, 2003), mais RSV-IVIG a été retiré du marché en 2004, après l'apparition d'effets secondaires importants.

En 1998, le palivizumab (Synagis, Astra-Zeneca) a été approuvé pour le traitement préventif des enfants à risque (Gonzales *et al.*, 2023 ; Fitzpatrick *et al.*, 2021). Le palivizumab est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre la protéine de fusion F du VRS, ciblant l'épitope II présent sur les deux conformations pré-fusion et post-fusion. Cet anticorps possède une demi-vie de 28 jours, une administration mensuelle est donc nécessaire pendant la saison de flambée épidémique du VRS. Son prix important limite son utilisation aux enfants prématurés ou à risque (Shahabi *et al.*, 2018), et exclue son utilisation dans la plupart de pays. Enfin, des études récentes ont mis en évidence une efficacité de protection limitée (50%) (Pinquier *et al.*, 2023).

Plus récemment, le nirsevimab (BEYFORTUS, Astra-Zeneca et Sanofi) a obtenu son AMM. Le nirsevimab cible l'épitope Ø de F, uniquement présent sur la forme pré-fusion, et possède une bonne efficacité de protection contre le VRS (Griffin *et al.*, 2020 ; Hammitt *et al.*, 2022). De plus cet anticorps a un profil de toxicité meilleur que le palivizumab (Astra-Zeneca, communiqué de presse 3 mars 2022, [Nirsevimab significantly protected infants against RSV disease in Phase III MELODY trial \(astrazeneca.com\)](https://www.astrazeneca.com)) et surtout une demi-vie plus étendue que le palivizumab. Ce nouveau traitement devrait s'avérer plus accessible (une seule injection pour la saison), et plus efficace.

Le développement de mutants d'échappement est un risque potentiel de l'utilisation massive d'anticorps monoclonaux pour la prévention de l'infection au VRS. Toutefois, concernant l'étude du nirsevimab, il a été démontré que le taux d'apparition de mutants d'échappement était faible (Wilkins *et al.*, 2023).

1.5.3 Stratégies antivirales

A ce jour, un seul traitement antiviral est commercialisé contre le VRS : la ribavirine, un analogue nucléosidique. Cependant son efficacité est très discutée et sa toxicité restreint son utilisation aux cas graves d'infection au VRS chez des personnes immunodéprimées (Ventre *et al.*, 2007 ; Johnson *et al.*, 1997 ; Turner *et al.*, 2014).

Les stratégies de traitements antiviraux contre le VRS impliquent une prise en charge rapide, donc un diagnostic précoce. Dans les 24 à 48 heures qui suivent l'apparition des symptômes, le VRS cause des dégâts cytopathologiques directs, dus à la réplication du virus dans les cellules épithéliales (*fire damage*, figure 16). La réponse immunitaire de l'hôte, principale cause des symptômes sévères, prend ensuite le relai et conduit à des dégâts collatéraux (*damage from fighting fire*, figure 16). Les stratégies antivirales doivent par conséquent prendre en compte ce mécanisme pour adapter le traitement. Pendant les phases précoces de l'infection, l'utilisation d'antiviraux est préconisée pour inhiber la réplication du virus, et des stratégies d'immuno-modulation peuvent être utilisées pour contrecarrer les dégâts créés par la réponse immunitaire (Lôwensteyn et Bont, 2020).

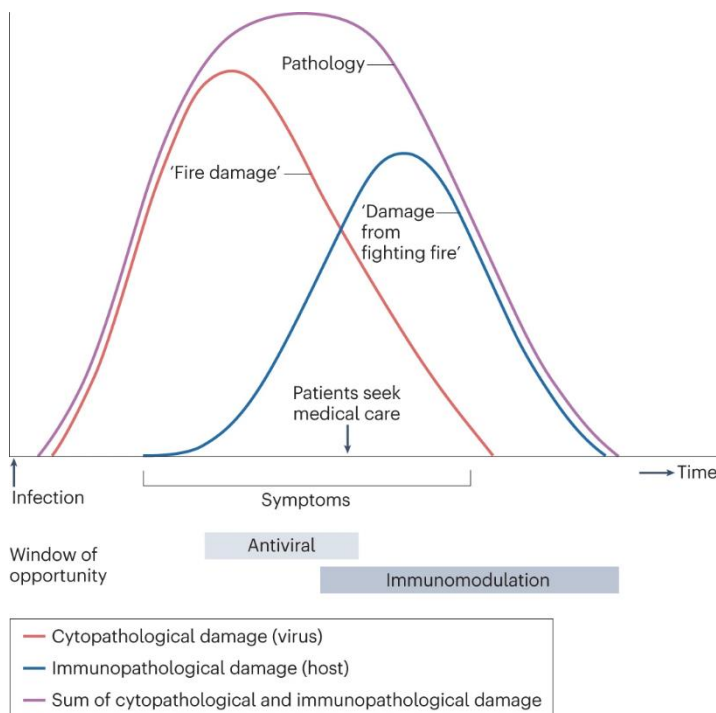


Figure 16 : Stratégie antivirale et d'immuno-modulation contre l'infection au VRS. Le VRS cause des dégâts directs lors de sa réplication (*fire damage*), puis la réponse immunitaire cause des dégâts collatéraux (*damage from fighting fire*) au niveau des voies respiratoires. La stratégie optimale de traitement pourrait combiner des antiviraux pendant les premières heures de l'infection (24-48h) puis l'utilisation de traitement d'immuno-modulation. Figure adaptée de (Langedijk et Bont, 2023).

La plupart des composés antiviraux développés actuellement sont des inhibiteurs de fusion, bloquant l'entrée du VRS dans les cellules. Le ziresovir (ARK Biopharmaceutical) est en cours d'obtention d'une AMM en Chine après des résultats de phase III positifs (GlobeNewswire, 2022 press release). Un autre composé, le sisunatovir (RV521) est entré en phase IIa après de bons résultats lors de challenges contre le VRS chez l'humain (DeVincenzo *et al.*, 2020).

La seconde cible d'intérêt pour le développement d'antiviraux est la protéine L. En effet, de nombreux efforts de développement thérapeutique se concentrent sur l'objectif d'inhiber les processus de réplication et de transcription du génome viral, processus pris en charge par la L.

Le domaine RdRp de la L est ciblé par des analogues nucléosidiques, comme la ribavirine citée plus haut. Parmi ces analogues nucléosidiques, l'ALS-8176 (Alios Biopharma) présentait des résultats de phases IIb positifs, mais l'apparition de mutants d'échappement a provoqué l'abandon du développement de ce composé (Deval *et al.*, 2015). Le composé BI-D, une petite molécule appartenant à la famille des imidazoquinoléines, présentait des résultats intéressants. L'activité de cette petite molécule conduisait à la formation d'ARNm tronqués reconnus par la voie RIG-I. Une fois de plus, l'apparition de mutants d'échappement a découragé le développement de ce composé (Liuzzi *et al.*, 2005). Enfin, d'autres composés ciblent la protéine N, comme la molécule EDP-938 (Ahmad *et al.*, 2022), ou ALN-RSVOA, un petit ARN interférent (siRNA) réduisant le titre viral *in vitro* et *in vivo* (Alvarez *et al.*, 2009).

De la même manière que les anticorps monoclonaux, les antiviraux induisent l'apparition de mutants d'échappement. Il est donc essentiel de maintenir les efforts de développement thérapeutique contre le VRS.

2 RETRO-2, UNE MOLECULE ANTI-PATHOGENES INTRACELLULAIRES DE SPECTRE LARGE

2.1 DECOUVERTE DE RETRO-2

La molécule Retro-2 a initialement été découverte lors d'un criblage à haut débit visant à identifier des inhibiteurs de la ricine sur cellules A549 (équipe de Daniel GILLET et Julien BARBIER, en collaboration avec le Service de Chimie Bio-organique et de Marquage (CEA/SCBM) (Stechmann *et al.*, 2010).

La ricine est une toxine de plante (figure 17), dont le mécanisme d'action s'apparente aux toxines bactériennes à activité intracellulaire. Cette protéine est composée des deux sous-unités (chaines A et B) reliées par un pont disulfure. La ricine se lie par sa sous-unité B aux galactosyls des glycoprotéines et glycolipides exposés à la surface des cellules cibles (Endo *et al.*, 1987). Après endocytose, la ricine est transportée dans les endosomes jusqu'au réticulum endoplasmique (RE) (Figure 17). Dans le RE, la réduction du pont disulfure provoque la dissociation des chaines A et B qui est suivie d'un dépliage partiel de la chaîne A, lui permettant de traverser la membrane du RE, probablement par l'intermédiaire du translocon Sec61p, de la même manière que les protéines du RE mal repliées. Dans le cytoplasme, la chaîne A se replie dans sa conformation biologiquement active pour inactiver des ribosomes (Figure 17). La synthèse des protéines s'arrête et les cellules meurent par apoptose (Endo *et al.*, 1987).

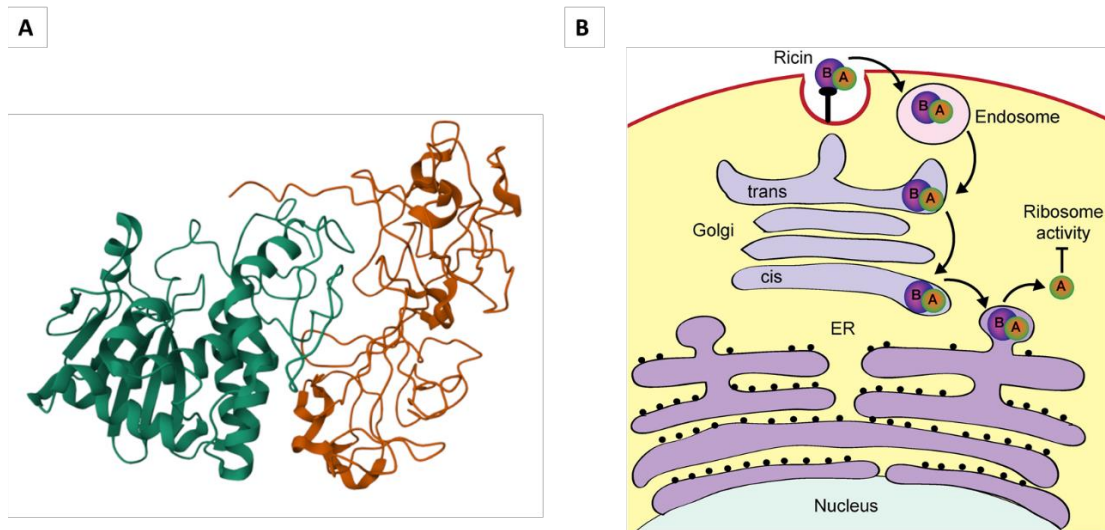


Figure 17 : structure et mécanisme d'action de la ricine. **(A)** Structure cristallographique de la ricine, la chaîne A est coloriée en vert et la chaîne B est coloriée en orange (PDB : 2AAI, Rutenber *et al.*, 1994). **(B)** schéma du mécanisme d'action de la ricine dans les cellules. La toxine entre dans les cellules et utilise le transport rétrograde vers le RE. La chaîne A est libéré dans le cytoplasme et inhibe l'activité des ribosomes. Schéma adapté de (Bozza *et al.*, 2015).

Le principe du test réalisé lors du criblage reposait sur la mesure de l'incorporation de leucine radiomarquée au ^{14}C lors de la synthèse protéique, processus inhibé par l'activité de la ricine. Lors du criblage de plusieurs banques moléculaires, trois composés ont été identifiés comme des touches : ABMA, Retro-1 et Retro-2. Ces trois composés bloquent tous le transport de la ricine dans la cellule. ABMA bloque le transport endo-lysosomal de la ricine (Wu *et al.*, 2017) au niveau de l'endosome tardif. Retro-1 et Retro-2 bloquent le transport rétrograde de la ricine entre les endosomes précoces et l'appareil de Golgi, sans affecter les voies de transport endogènes (Stechmann *et al.*, 2010).

Dans ce manuscrit nous nous intéresserons uniquement aux composés de la famille Retro-2.

2.2 MECANISME D'ACTION ET OPTIMISATION DE RETRO-2

2.2.1 Sec16A, protéine cible de Retro-2

Afin d'identifier la cible de Retro-2 dans la cellule, une sonde optimisée pour la chimie *click* a été dérivée du composé Retro-2. Par analyse par spectrométrie de masse, il a pu être montré que la sonde Retro-2 interagit avec la protéine Sec16A. Sec16A est une protéine d'environ 250 kDa. C'est un composant des sites de sortie du RE (ERES, *Endoplasmic Reticulum Exit Sites*) qui régule les voies de sécrétion des protéines provenant du RE (Forrester *et al.*, 2020). Notamment, Sec16A contrôle l'initiation de l'assemblage des vésicules COPII, régulant de fait la dynamique de ces vésicules transportant les protéines du RE vers un compartiment intermédiaire entre RE et appareil de Golgi, appelé ERGIC (*ER-Golgi intermediate compartment*) (Peotter *et al.*, 2019).

2.2.2 Action sur le transport intracellulaire

Il a pu être montré que le composé Retro-2 exerce une activité inhibitrice sur le transport de la ricine et des Shigatoxines (Stx-1 et Stx-2) entre les endosomes et le réseau transgolgien (TGN) (Stechmann *et al.*, 2010) (Figure 18). Les mécanismes impliqués dans cet effet ont été étudiés au moyen de méthodes biochimiques et par imagerie, en utilisant la sous-unité B de la Shigatoxine (StxB). Cette sous-unité, liée à un marqueur fluorescent, atteint l'appareil de Golgi en 45 minutes dans la condition contrôle. Si les cellules sont traitées avec 20 μ M de Retro-2 au préalable, StxB est retenue dans les endosomes précoces et dans les endosomes de recyclage. Ces données expliquent la spécificité d'action de Retro-2 en fonction des toxines considérées. En effet, les toxines intracellulaires exploitent soit la voie de transport rétrograde soit la voie endo-lysosomale. La ricine exploite ces deux voies, et les toxines bactériennes sont plus sélectives de certaines voies. Ainsi la toxine diphtérique n'est pas affectée par Retro-2 alors que le transport des Stx est bloqué très efficacement par Retro-2.

L'impact du traitement sur le transport endogène a également été évalué. Il conclut à l'absence de perturbation des voies suivantes : endocytose dépendante de la clathrine, voie de dégradation lysosomale, transport antérograde et transport rétrograde de certains cargos endogènes comme le récepteur au manose-6-phosphate (M6PR) et TGN46 (Stechmann *et al.*, 2010).

En revanche, en utilisant une méthode RUSH (*Retention Using Selective Hook*) qui permet de suivre spécifiquement la dynamique de certaines protéines, une inhibition du transport antérograde de la syntaxine-5 (Syn-5) a pu être observée dans des cellules incubées en présence de Retro-2 (Forrester *et al.*, 2020). Syn-5 est une protéine SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor*), formant des complexes en association avec d'autres protéines au niveau du *cis*-Golgi et au niveau du *medial/trans*-Golgi. Ces complexes permettent le transport entre le RE et l'appareil de Golgi (Stechmann *et al.*, 2010).

La déplétion par siRNA de l'expression du gène codant pour Sec16A induit un phénotype similaire à celui observé lors du traitement avec Retro-2 : la Syn-5 est relocalisée au niveau du RE et StxB est accumulée dans les endosomes précoces (Forrester *et al.*, 2020).

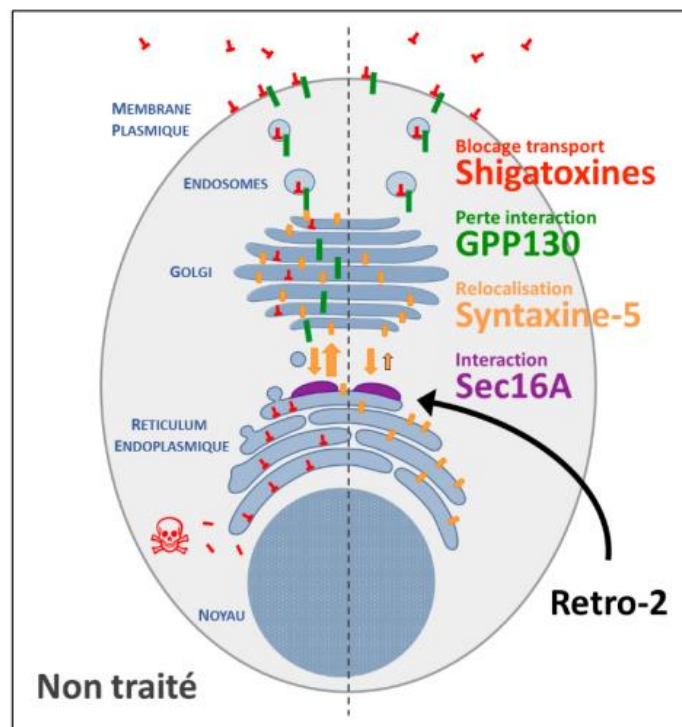


Figure 18 : Modèle du mécanisme d'action de Retro-2 sur le routage des toxines intracellulaires. Dans la condition non traitée, Syn-5 effectue son cycle dépendant de Sec16A entre l'appareil de Golgi et le RE. La protéine GPP130 effectue un cycle entre la membrane plasmique et l'appareil de Golgi. Syn-5 et GPP130 interagissent directement et cette interaction est essentielle à l'entrée des Stx dans les cellules. Retro-2 se fixe à Sec16A et réduit le transport antérograde de Syn-5, entraînant sa relocalisation dans le RE. La relocalisation de Syn-5 limite son interaction avec GPP130 et bloque donc l'entrée des toxines dans la cellule. Figure adaptée de (Forrester *et al.*, 2020).

2.2.3 ASNA1, cible alternative

Dans une autre étude, la recherche de cibles cellulaires de Retro-2 a été réalisée par criblage CRISPR/Cas9 (Morgens *et al.*, 2019). Brièvement, des cellules K562 (lignée de leucémie humaine) déplétées pour l'expression de certains gènes par CRISPR/Cas9 ont été intoxiquées par la ricine, afin d'identifier les déplétions reproduisant l'effet de Retro-2.

Les auteurs ont déduit de cette étude que le KO de la protéine ASNA1 reproduit le phénotype induit par le traitement avec Retro-2 (Morgens *et al.*, 2019). ASNA1 appartient à la voie TRC (*Tail Recognition Complex*), qui régule l'adressage et l'ancrage membranaire des protéines qui possèdent un domaine transmembranaire en C-terminal (Favaloro *et al.*, 2010). La Syn-5 fait partie de ces protéines, et l'inhibition de la voie TRC induit sa relocalisation au niveau du RE. Il est suggéré qu'ASNA1 est plus généralement impliquée dans les voies de transport rétrograde (Norlin *et al.*, 2016).

2.2.4 Optimisation par étude de Relation Structure-Activité

Des études de Relation Structure-Activité (SAR en anglais) ont été réalisées en collaboration avec l'équipe de Jean-Christophe Cintrat (CEA-Saclay, SCBM), afin d'améliorer l'activité du composé Retro-2. Retro-2 est actif sous sa forme cyclisée (Figure 19) (Park *et al.*, 2012). Lors des études de SAR, le noyau benzoquinolone a été conservé et l'optimisation s'est concentrée sur les groupements périphériques de la molécule (Noel *et al.*, 2013 ; Gupta *et al.*, 2014). Pour chaque position (R1, R2 ou R3, Figure 19), le meilleur pharmacophore a été sélectionné pour former le composé optimisé Retro-2.1.

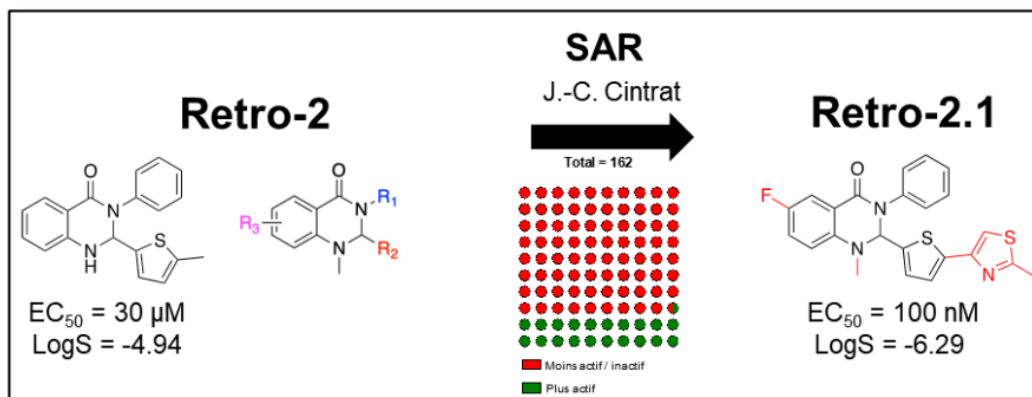


Figure 19 : Optimisation de Retro-2 par étude SAR.

En outre, au cours de la thèse de Robin VINCK (Vinck, 2019) il a pu être mis évidence que, dans l'organisme, le composé Retro-2.1 est rapidement métabolisé par l'ajout de groupements hydroxyles sur le squelette de la molécule. Deux nouvelles molécules constituent les métabolites majoritaires : Retro-2.1-OH et Retro-2.1-diOH. Les métabolites potentiels correspondant à ces nouvelles formules chimiques ont ensuite été synthétisés pour tester leurs EC_{50} et déterminer par LC-MS lesquels sont les véritables métabolites (Vinck, 2019 ; Caramelle, 2023).

Parmi la série de métabolites potentiels testés, l'un d'entre eux présente une activité accrue contre les Stx : le composé mono-hydroxylé Retro-2.2 (Tableau 1). Il est à noter que le véritable métabolite majoritaire n'est pas Retro-2.2 et est hydroxylé sur le groupe méthyle porté par le groupe thiazole de la molécule Retro-2.1 (Vinck, 2019).

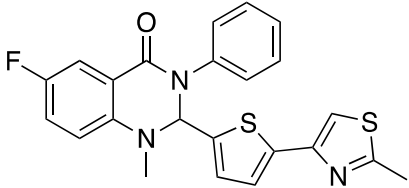
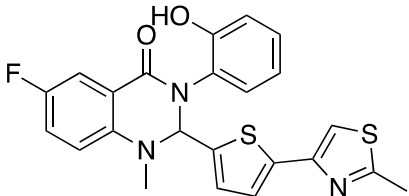
Nom	Structure	MM (g/mol)	EC ₅₀ contre Stx1
Retro-2.1		435,54	52 nM
Retro-2.2		451,53	25 nM

Tableau 1 : Structure, masse moléculaire et activité biologique des composés Retro-2.1 et Retro-2.2. L'activité biologique est évaluée contre la Shigatoxine Stx1 (Thèse Lucie Caramelle, 2023).

2.3 ACTIVITE DE SPECTRE LARGE CONTRE LES PATHOGENES INTRACELLULAIRES

Outre l'inhibition de l'infection par les toxines comme la ricine ou les Stx, les composés de la famille Retro-2 présentent une activité neutralisante contre une variété de pathogènes intracellulaires, détaillée dans cette partie.

2.3.1 Activité contre des bactéries intracellulaires

Deux bactéries intracellulaires obligatoires sont sensibles au traitement par Retro-2 (Figure 20).

Chlamydia trachomatis. Cette bactérie est responsable d'infections oculaires, pulmonaires, et sexuellement transmissibles. Un traitement avec Retro-2 (20 µM) induit une diminution significative de la réplication bactérienne, avec une diminution de 40% de la taille des inclusions cytoplasmiques liées à l'infection. L'infection ne persiste pas après le traitement (Aeberhard *et al.*, 2015 ; Banhart *et al.*, 2017 ; Gupta *et al.*, 2017).

Simkania negevensis. Cette bactérie est associée à des infections respiratoires communautaires. Elle se développe dans des inclusions cytoplasmiques en interaction avec le RE. Retro-2 inhibe l'infection en réduisant la taille des inclusions, en bloquant la réplication de nouvelles bactéries et l'infection de nouvelles cellules (Herweg *et al.*, 2015).

2.3.2 Activités contre des parasites intracellulaires

Leishmania. Ces parasites intracellulaires sont à l'origine de la maladie appelée leishmaniose, et sont transmis par des insectes de la sous-famille *Phlebotominae* (Young *et al.*, 2019). Les symptômes se manifestent sous plusieurs formes qui peuvent aller de bénigne mais invalidante (forme cutanée) à fatale (forme viscérale) en l'absence de traitement. L'infection se caractérise par la formation de compartiments cellulaires (LPV, *Leishmania Parasitophorous Vacuoles*) aux caractéristiques proches des endosomes et lysosomes. Ces LPV contiennent des protéines participant aux voies de sécrétion dont Syn-5 (Craig *et al.*, 2017). Il a été démontré que le traitement par Retro-2 (75 ou 100 μM) inhibe l'infection par *Leishmania amazonensis* sur cellules et chez la souris, notamment en bloquant l'interaction entre Syn-5 et les LPV (Canton et Kima, 2012) (Figure 20).

De plus, le composé Retro-2 protège les souris contre l'infection à *Leishmania amazonensis* à une dose de 100 mg/kg. La protection n'est pas statistiquement significative mais une diminution du nombre de parasite est observée (Canton et Kima, 2012).

2.3.3 Activité antivirale

Actuellement, plus d'une douzaine de virus ont pu être identifiés comme sensibles au traitement en présence de Retro-2 ou de son dérivé Retro-2.1 (Figure 20).

Polyomavirus (JCPyV, BKPyV et SV40). Une étude a évalué l'activité du dérivé Retro-2.1 contre l'infection aux *polyomavirus* sur des cellules SVG-A (Cellules astrocytaires humaines). Retro-2.1 protège les cellules SVG-A contre le JCPyV (EC_{50} = 3,9 μM), le BKPyV (EC_{50} = 6,6 μM) et le SV40 (EC_{50} = 7,9 μM). Cette étude démontre également le mécanisme d'action du composé, qui bloque le transport rétrograde des virus vers le RE, empêchant leur décapsidation qui a lieu dans cette organelle (Treasure et Nelson, 2020). L'infection est par conséquent bloquée dès le stade précoce.

Virus adéno-associés (AAV). Les AAV (Adeno-associated viruses) effectuent leur cycle de réplication au sein du noyau des cellules infectées, et utilisent la voie de transport rétrograde, dépendante de la Syn-5, pour atteindre le noyau. Lors du traitement par Retro-2.1, la Syn-5 étant relocalisée, les virions ne peuvent pas atteindre le noyau (Nonnenmacher *et al.*, 2015). Le composé Retro-2.1 inhibe ainsi l'infection de différents types cellulaires (HeLa, Huh7, HepG2, HUVECs, HCAECs et RACMs) par les AAV.

Enterovirus 71 (EV71). Ce virus compte parmi les pathogènes responsables du syndrome pieds-mains-bouche chez les enfants. Il est également la cause de syndromes neurologiques. Un pré-traitement avec Retro-2.1 pendant 5 heures avant l'infection protège contre l'infection *in vitro*, avec une EC₅₀ de 50 nM, et un indice de sélectivité élevé (>5000) indiquant une faible toxicité (Dai *et al.*, 2017). Le traitement n'impacte pas la réplication ou la transcription du virus, mais induit une diminution du nombre de particules virales dans le surnageant des cellules infectées (Dai *et al.*, 2017).

Lors d'un challenge *in vivo* chez la souris, il a pu être montré que le composé Retro-2 exerce une activité contre l'EV71 à 2 mg/kg et à 10 mg/kg (90% de protection). Cependant, le composé est toxique à forte concentration (50 mg/kg) (Dai *et al.*, 2017).

Poxvirus (VACV). Retro-2.1 inhibe l'infection par le virus de la vaccine (VACV) de 90% à 100 nM. Le traitement a pour conséquence une diminution significative de la quantité de particules virales dans le surnageant des cellules infectées (Harrison *et al.*, 2016). Lors de l'infection, les nouveaux virions sont assemblés dans des régions périnucléaires, puis sont enveloppés par deux membranes avant d'être transportés vers la membrane plasmique pour être disséminés. En absence de traitement, les protéines virales F13 et B5, essentielles au processus d'enveloppement, sont colocalisées près du noyau et dans des structures vésiculaires proches de la membrane plasmique. La protéine F13 est notamment localisée dans l'appareil de Golgi et les endosomes, utilisant le transport rétrograde entre ces structures. Lors du traitement avec Retro-2.1, la protéine F13 est relocalisée et la colocalisation entre les protéines virales F13 et B5 est abolie, ce qui inhibe l'étape d'enveloppement des virions matures. Ainsi, des virions matures non enveloppés sont observés dans le cytoplasme mais aucun virus enveloppé n'est présent dans le milieu extracellulaire (Sivan *et al.*, 2016).

Lors d'un challenge *in vivo* chez la souris, le composé Retro-2 protège les animaux contre l'infection à une dose de 100 mg/kg sans toxicité (Harrison *et al.*, 2016).

Cytomégalo­virus humain (hCMV). Ce virus provoque des maladies sévères notamment chez les immunodéprimés, et des complications fœtales lorsque la femme enceinte est infectée. Lors de l'infection, la formation de compartiments d'assemblage (cVAC) et la réorganisation de certains compartiments dont l'appareil de Golgi, sont observées. De plus, les niveaux d'expression de Syn-5 sont augmentés lors de l'infection, et Retro-2.1 inhibe l'infection avec une EC₅₀ de 15 nM (Cruz *et al.*, 2016 ; Desai *et al.*, 2019).

Herpès simplex virus type 2 (HSV2). Ce virus est à l'origine de l'herpès génital. Un pré-traitement avec Retro-2.1 5h avant l'infection induit une diminution du titre viral et une diminution de la quantité de protéines virales avec une EC₅₀ de 6 µM, et un indice de sélectivité de 21. Retro-2.1 semble inhiber à la fois les étapes d'entrée du virus dans les cellules, mais également l'étape d'assemblage des virus (Dai *et al.*, 2018).

Hépatite B (HBV). Ce virus est la cause de complications au niveau du foie (cirrhose, fibrose hépatique, carcinome hépatocellulaire). Il a été démontré que le HBV exploite le transport rétrograde lors de son entrée dans la cellule, pour échapper aux mécanismes de dégradation lors de l'infection (Li *et al.*, 2023). Le traitement avec Retro-2.1 inhibe l'infection entre 1 et 50 µM, mais le mécanisme précis de l'inhibition n'est pas encore décrit.

Filovirus Ebola et Marburg (EBOV, MARV). Ces virus à ARN, qui appartiennent comme le VRS à l'ordre de *Mononégavirales*, sont la cause de fièvres hémorragiques mortelles. Retro-2.1 inhibe l'infection par le virus EBOV (EC₅₀= 3,7 µM) et le virus MARV (EC₅₀= 1,9 µM). Dans ce cas, le traitement semble bloquer l'infection à une étape tardive de l'entrée de ces virus dans les cellules (Shtanko *et al.*, 2018).

Coronavirus (SARS-CoV-2). En novembre 2020, une publication a révélé les résultats d'un criblage contre SARS-CoV-2, afin de répondre au besoin urgent de contre-mesure contre la pandémie. Sur les 400 composés testés, seul Retro-2.1 inhibait l'infection efficacement avec une EC₅₀ de 80 nM et un indice de sélectivité de 1250 (Holwerda *et al.*, 2020).

Pathogène	Efficacité <i>in vitro</i>	Phénotype du traitement	Référence
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Retro-2 EC ₅₀ = 20 µM	Réduction de la taille des inclusion cytoplasmiques	Aeberhard <i>et al.</i> , 2015 ; Banhart <i>et al.</i> , 2017
<i>Simkania negevensis</i>	Retro-2	Inhibition de la réplication	Herweg <i>et al.</i> , 2015
<i>Leishmania</i>	Retro-2 75-100 µM	Inhibition de la croissance des parasites	Canton et Kima, 2012
Polyomavirus	Retro-2.1 EC ₅₀ = 3,9 µM, 6,6 µM et 7,9 µM	Inhibition du transport des virus vers le RE, blocage de la décapsidation.	Treasure et Nelson, 2020
Virus adéno-associés	Retro-2.1 EC ₅₀ = 1-20 µM	Blocage du transport rétrograde des virions vers leur site de réplication péri-nucléaire	Nonnenmacher <i>et al.</i> , 2015
Entérovirus 71	Retro-2.1 EC ₅₀ = 50 nM	Inhibition de la libération des nouveaux virions	Dai <i>et al.</i> , 2017
Poxvirus (VACV)	Retro-2.1 EC ₅₀ = 100 nM	Relocalisation des protéines B5 et F1 essentielles à l'enveloppement des virions. Inhibition de l'enveloppement.	Sivan <i>et al.</i> , 2016
Cytomégalovirus humain	Retro-2.1 EC ₅₀ = 15 nM	Désorganisation des compartiments d'assemblage du virus	Cruz <i>et al.</i> , 2016 ; Desai <i>et al.</i> , 2019
HSV2	Retro-2.1 EC ₅₀ = 6 µM	Blocage de l'entrée du virus dans les cellules, et blocage de la libération de nouveaux virions.	Dai <i>et al.</i> , 2018
Filovirus	Retro-2.1 EC ₅₀ = 3,7 µM et 1,9 µM	Inhibition de l'entrée des virus dans les cellules	Shtanko <i>et al.</i> , 2018
Hépatite B	Retro-2.1 EC ₅₀ = 1-50 µM	ND	Li <i>et al.</i> , 2023
SARS-CoV-2	Retro-2.1 EC ₅₀ = 80 nM	ND	Holwerda <i>et al.</i> , 2020

Figure 20 : Tableau récapitulatif des activités spectre large *in vitro* du composé Retro-2 et de son dérivé Retro-2.1. Polyomavirus, efficacités notées pour les virus JCPyV, BKPyV et SV40, respectivement. Filovirus, efficacités notées pour les virus EBOV et MARV, respectivement. ND = Non Déterminé

OBJECTIFS DE LA THESE

Comme précédemment présenté, le Virus Respiratoire Syncytial est le principal agent pathogène responsable de bronchiolites et de pneumonies chez les jeunes enfants, les personnes âgées et les personnes immunodéprimées. En 2023, plusieurs vaccins ont été commercialisés contre le VRS. Toutefois, il n'existe pour l'instant pas de traitement antiviral. La plupart des molécules ayant été développées ciblent les protéines F ou L et induisent l'apparition de mutants d'échappement. Il est par conséquent nécessaire d'envisager le développement de nouvelles approches antivirales. En particulier, les stratégies visant à cibler des mécanismes cellulaires nécessaires à la réplication des pathogènes pourraient représenter une alternative et/ou une approche complémentaire.

Mon projet portait sur l'évaluation de l'efficacité antivirale contre le VRS des inhibiteurs du transport rétrograde de la famille Retro-2, en particulier le dérivé optimisé Retro-2.2.

La première partie du projet a consisté à évaluer l'activité de Retro-2.2 *in vitro* sur des cultures de cellules infectées, et à caractériser le mécanisme moléculaire sous-jacent à l'inhibition. Cette étude a fait l'objet d'une publication soumise dans le journal *International Journal of Molecular Sciences*.

Dans un deuxième temps, nous avons souhaité évaluer l'efficacité antivirale de Retro-2.2 *in vivo*, en modèle murin. Les données de pharmacocinétique obtenues pour le composé Retro-2.2, par l'équipe de Daniel Gillet et Julien Barbier au CEA, seront présentées. Nous avons pu démontrer l'absence de toxicité de Retro-2.2, à différentes doses, chez la souris Balb/c femelle. Cependant, les expériences visant à étudier l'activité antivirale de Retro-2.2 *in vivo* chez la souris n'ont pas permis de valider une inhibition de la réplication du VRS *in vivo*. Ces données seront exposées et discutées.

Outre l'évaluation de l'activité antivirale de Retro-2.2, j'ai également eu l'opportunité de participer à une étude visant à déterminer l'activité antivirale de peptides agrafés, *in vivo* chez la souris (collaboration Dr. O. Nyanguile, HES-SO, Sion, Suisse). Ces données, présentées en Annexe de ce manuscrit, seront intégrées à une publication en cours de rédaction.

Résultats

3 ACTIVITE ANTIVIRALE DE RETRO-2.2 *IN VITRO* ET MECANISME D'ACTION ASSOCIE

3.1 INTRODUCTION

Comme décrit précédemment, les composés de la famille Retro-2, particulièrement Retro-2 et Retro-2.1, présentent un large spectre d'activité contre des virus. Le développement de nouveaux dérivés optimisés s'accompagne du test de ces composés sur d'autres pathogènes susceptibles d'être sensibles au traitement. Le VRS a été considéré dans ce cadre.

En 2019, l'activité antivirale des composés de la famille Retro-2 a été évaluée par la société NeoVirTech. Lors de ces essais, des cellules HEp-2 ont été infectées avec le VRS (souche Long, ATCC VR-26) à une MOI de 0.5, puis incubées en présence de six concentrations de molécules. Soixante-douze heures post-infection, les cellules ont été fixées et les cellules ont été incubées en présence d'un anticorps anti-VRS, puis d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488. Les noyaux ont également été marqués au Hoechst (Figure 21). Les cellules ont ensuite été observées avec un microscope CellInsight CX7 High Content Analysis (Thermofisher). Un algorithme permet de détecter et quantifier le taux d'infection grâce au rapport : (nombre de cellules infectées (fluorescentes) / nombre de cellules totales, c'est-à-dire le nombre de noyaux marqués au Hoechst). La quantification avait permis de déterminer une EC50 de l'ordre du nM pour le composé Retro-2.2.

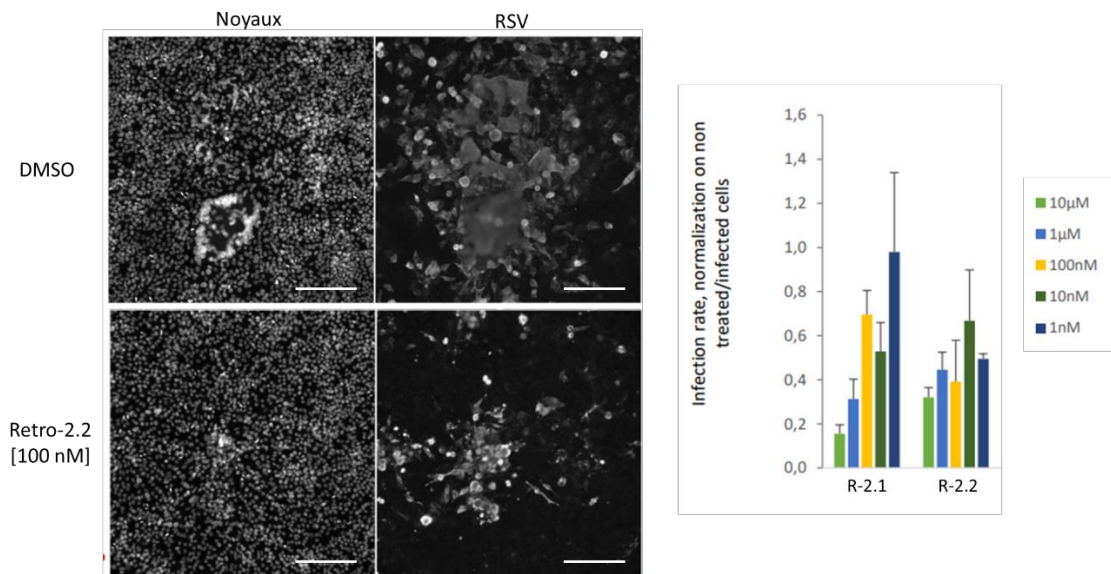


Figure 21 : Résultat de criblage de l'activité antivirale de Retro-2.2 contre le VRS. Des cellules HEp-2 ont été infectées par le VRS (souche Long) avec une multiplicité d'infection (MOI) de 0,5, puis incubées en présence de différentes concentrations de composé Retro-2.2. A gauche, Soixante-douze heures post-infection, les noyaux ont été marqués avec du Hoechst et les cellules infectées révélées par marquage avec un anticorps anti-VRS, suivi d'un marquage avec un anticorps secondaire conjugué à l'Alexa488. Barre d'échelle = 200 μm. A droite, comparaison de l'effet antiviral des composés Retro-2.1 et Retro-2.2 contre le VRS. Mesure effectuée 72h post-infection par microscopie de fluorescence. Les valeurs d'EC₅₀ ont été déterminées en utilisant le logiciel Combenefit (Di Veroli *et al.*, 2016).

Sur la base de ces résultats, une collaboration a été établie entre le Dr. D. Gillet et le Dr. M. Galloux afin de valider cette activité antivirale et de caractériser le mécanisme d'action sous-jacent. En effet, l'équipe Biologie Moléculaire des Pneumovirus, dirigée par le Dr. J.-F. Eléouët depuis près de 20 ans, présente une expertise reconnue sur l'étude fonctionnelle et structurale des protéines du VRS et son mécanisme de réplication. En particulier, l'équipe a développé des virus recombinants exprimant un gène rapporteur mCherry (VRS-mCherry) ou Luciférase (VRS-Luc) (Rameix-Welti *et al.*, 2014) (Figure 22). Ces virus représentent des outils performants pour évaluer la réplication du virus en culture cellulaire en temps réel par suivi de fluorescence ou à un temps donné par quantification de luminescence à partir de lysats de cellules. Le virus VRS-Luc permet d'autre part de suivre l'infection *in vivo* chez la souris par mesure de luminescence à différents jours, sur un même animal.

Dans ce contexte, une partie de mes travaux de thèse visaient à valider l'activité antivirale de Retro-2.2 et à caractériser le mécanisme d'action.

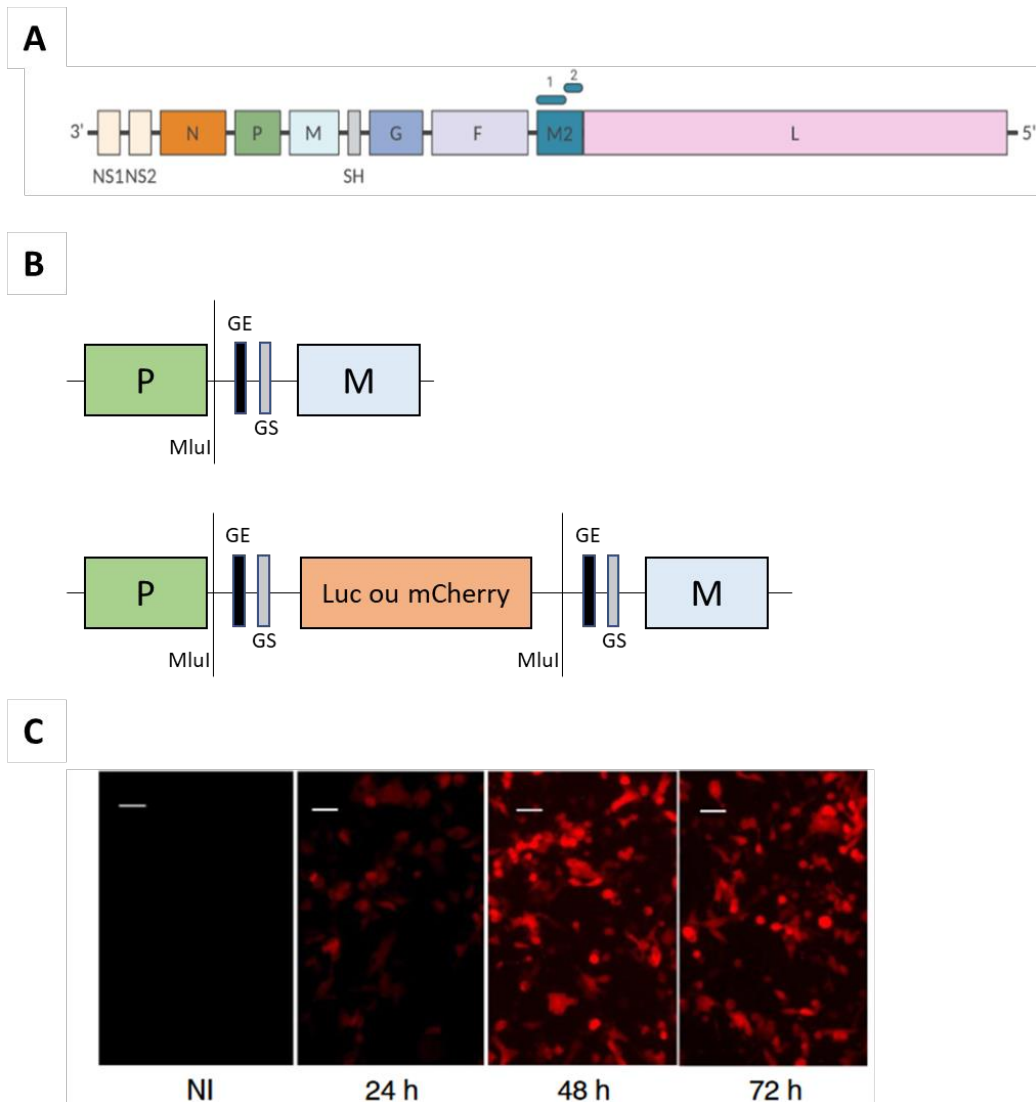


Figure 22 : Schéma de la construction des virus recombinant VRS-Luc ou VRS-mCherry. **(A)** Schéma du génome du VRS, chaque boîte représente un gène. **(B)** Le gène codant pour la Luciférase ou la mCherry a été inséré entre les gènes P et M du génome, avec les signaux GS et GE en amont et en aval, respectivement. **(C)** Images de cellules HEp-2 infectées avec le virus recombinant mCherry à une MOI de 0.01, à différents temps post-infection. Barre d'échelle = 50 μ m. Figure adaptée de (Rameix-Welti *et al.*, 2014).

Mes résultats ont tout d'abord permis de mettre en évidence une activité antivirale de l'ordre du μM , couplée à une certaine toxicité.

De plus, nos expériences ont permis de montrer qu'un traitement préventif n'améliore pas l'efficacité de la molécule. Retro-2.2 n'inhibe donc pas les étapes précoces de l'infection.

Au cours de ces expériences, nous avons également observé une diminution importante de la taille des syncytia formés en cultures de cellules infectées. Ce phénomène, bien qu'aisément observable par microscopie, est difficilement quantifiable. La quantification du nombre et de la taille des syncytia lors de l'infection au VRS a fait l'objet de travaux pendant ma thèse mais ces derniers ne seront pas publiés. Ils seront présentés dans le chapitre 4.3 de ce manuscrit.

En réalisant des marquages par immunofluorescence des cellules infectées, nous avons noté que le traitement par Retro-2.2 n'affecte pas la formation des corps d'inclusion. En revanche l'expression de la protéine F semble impactée par le traitement. En surexprimant F dans des cellules, nous avons vérifié que cette protéine seule était suffisante pour la formation des syncytia, et que le traitement bloquait la formation des syncytia induite par F.

La suite de l'étude a porté sur la description du mécanisme d'inhibition de l'infection. Nous avons émis l'hypothèse que le traitement par Retro-2.2 pouvait bloquer l'expression, la localisation ou la fonction de la protéine F du VRS, et plus largement des protéines membranaires (F, G et SH) du virus, qui sont exprimées à travers le RE et l'appareil de Golgi pendant l'infection.

En utilisant une protéine chimérique composée de la séquence d'adressage et des domaines transmembranaire et cytoplasmique de F, en fusion avec la protéine mCherry et le peptide HiBit (système split-NanoLuciférase), nous avons démontré que l'adressage de la protéine F à la membrane est perturbé par le traitement par Retro-2.2, avec un effet dose-réponse et une EC_{50} d'environ $1 \mu\text{M}$. Une stratégie similaire a également permis de montrer que le traitement par Retro-2.2 altère l'adressage de la protéine G à la membrane plasmique.

Enfin, nous avons étudié l'effet de la déplétion des protéines cibles de Retro-2.2 : Syn-5 et Sec16a. L'utilisation de 20 nM de siRNA contre Syn-5 ou Sec16a sur des cellules A549 inhibe l'infection par le VRS, confirmant l'implication de ces protéines dans le cycle viral, et suggérant que l'inhibition de l'infection exercée par Retro-2.2 est liée à ces protéines régulant le transport rétrograde cellulaire.

3.2 PUBLICATION : « A NEW DERIVATIVE OF RETRO-2 DISPLAYS ANTIVIRAL ACTIVITY AGAINST RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS »

A New Derivative of Retro-2 Displays Antiviral Activity against Respiratory Syncytial Virus

[Adrien Le Rouzic](#) , Jenna Fix , [Robin Vinck](#) , Sandrine Kappler-Gratias , [Romain Volmer](#) , [Franck Gallardo](#) , [Jean-François Eléouët](#) , [Mathilde Keck](#) , [Jean-Christophe Cintrat](#) , [Julien Barbier](#) , [Daniel Gillet](#) ^{*} , [Marie Galloux](#) ^{*}

Posted Date: 26 October 2023

doi: 10.20944/preprints202310.1733.v1

Keywords: Respiratory syncytial virus; Retro-2.2; fusion protein; retrograde transport; antiviral



Preprints.org is a free multidiscipline platform providing preprint service that is dedicated to making early versions of research outputs permanently available and citable. Preprints posted at Preprints.org appear in Web of Science, Crossref, Google Scholar, Scilit, Europe PMC.

Copyright: This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Article

A New Derivative of Retro-2 Displays Antiviral Activity against Respiratory Syncytial Virus

Adrien Le Rouzic ^{1,2}, Jenna Fix ¹, Robin Vinck ^{2,3}, Sandrine Kappler-Gratias ⁴, Romain Volmer ⁵, Franck Gallardo ⁴, Jean-François Eléouët ¹, Mathilde Keck ², Jean-Christophe Cintrat ³, Julien Barbier ², Daniel Gillet ^{2,*} and Marie Galloux ^{1,*}

¹ Université Paris-Saclay-Versailles St Quentin, INRAE, Unité de Virologie et Immunologie Moléculaires (VIM), F-78350 Jouy-en-Josas, France; adrien.le-rouzic@inrae.fr (A.L.R.); jenna.fix@inrae.fr (J.F.); jean-francois.eleouet@inrae.fr (J.-F.E.)

² Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SIMoS, 91191 Gif-sur-Yvette, France; robin.vinck13@gmail.com (R.V.); mathilde.keck@cea.fr (M.K.); julien.barbier@cea.fr (J.B.)

³ Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SCBM, 91191 Gif-sur-Yvette, France; jean-christophe.cintrat@cea.fr

⁴ NeoVirTech SAS, 1 Place Pierre Potier, 31000 Toulouse, France; skappler@neovirtech.com (S.K.-G.); fgallardo@neovirtech.com (F.G.)

⁵ ENVT Université de Toulouse, INRAE, IHAP, UMR 1225, 31300 Toulouse, France; romain.volmer@envt.fr

* Correspondence: daniel.gillet@cea.fr (D.G.); marie.galloux@inrae.fr (M.G.)

Abstract: Human respiratory syncytial virus (hRSV) is the most common cause of bronchiolitis and pneumonia in new-borns, with all children being infected before the age of two. Reinfections are very common throughout life, and can cause severe respiratory infections in the elderly and immunocompromised adults. Although vaccines and preventive antibodies have recently been licensed for use in specific subpopulations of patients, there is still no therapeutic treatment commonly available for these infections. Here, we investigated the potential antiviral activity of Retro-2.2, a derivative of the cellular retrograde transport inhibitor Retro-2, against hRSV. We show that Retro-2.2 inhibits hRSV replication in cell culture, and impairs the ability of hRSV to form syncytia. Our results suggest that Retro-2.2 treatment affects virus spread by disrupting the trafficking of the viral *de novo* synthesized F and G glycoproteins to the plasma membrane, leading to a defect in virion morphogenesis. Taken together, our data show that targeting intracellular transport may be an effective strategy against hRSV infection.

Keywords: Respiratory syncytial virus; Retro-2.2; fusion protein; retrograde transport; antiviral

1. Introduction

The human respiratory syncytial virus (hRSV) is the leading cause of severe lower respiratory tract infection in young children worldwide, and the first cause of hospitalization of new-borns under 6 months of age [1]. A systemic multisite study has shown that hRSV is the first etiological agent responsible for severe pneumonia (more than 30%) in hospitalized children in Asia and Africa [2]. It is noteworthy that hRSV is also a frequent cause of otitis in infants, and that children who suffer from severe hRSV infection are at risk of developing further respiratory complications such as asthma [3,4]. Re-infections occur throughout life with symptoms of common cold in healthy adults, but lead to severe lower respiratory infections in immunocompromised and elderly people [5]. Despite the high impact of hRSV infections on public health, the first vaccines to prevent severe hRSV disease in the elderly were approved by the Food and Drug Administration only in 2023 (GSK, Pfizer) [6][7], followed by a vaccine dedicated to pregnant women (Pfizer) [8]. The only specific treatment commercialized for new-borns remains humanized monoclonal antibodies directed against the fusion protein F responsible for viral entry. The first commercialized antibody (Palivizumab, Synagis®) displays poor benefit-cost ratio, limiting its use to prophylaxis of severe infection in pre-term and high-risk infants [9]. The new prophylactic antibody targeting the pre-fusion form of F

(Nirsevimab, Beyfortus®) has been very recently approved in the European Union for the prevention of hRSV lower respiratory tract disease in newborns and infants during their first hRSV season [10,11].

hRSV belongs to the order *Mononegavirales* and the family *Pneumoviridae*, which are enveloped viruses with a single strand negative sense RNA genome [12]. The attachment of the viral particle to the cell surface and the entry into the host cell are mediated by the viral glycoproteins G and F. More specifically, virus entry involves the fusion between viral and cellular membranes. This fusion is pH-independent [13], mediated by F, and could occur at the plasma membrane or in endosomes after macropinocytosis [14]. Of note, in cell culture the F protein is responsible for the fusion between cells, leading to the formation of syncytia which characterises hRSV infection [15][16]. The fusion allows the release into the cell cytoplasm of the ribonucleoprotein complex (RNP), composed of the viral genome encapsidated by the nucleoprotein N, the viral polymerase L, its cofactor the phosphoprotein P, and the M2-1 protein (transcription factor). Transcription and replication of the viral genome are initiated by the viral polymerase L which is responsible for all RNAs synthesis activities (RNA-dependent RNA polymerase, mRNAs capping and methyltransferase). These steps take place in viral factories that are membraneless liquid organelles, called inclusion bodies (IBs) [17,18]. The viral mRNAs are then exported from IBs to the cytoplasm where viral proteins are expressed. At the final stages of the viral cycle, RNPs and structural viral proteins are addressed to the plasma membrane where assembly occurs, leading to the formation of new filamentous virions which are released by membrane fission.

To date, most developed antiviral strategies aim at targeting the viral F protein to impair virus entry, or the viral polymerase L [19–22]. However, none of these compounds have been commercialized yet, with the main limitation being the emergence of escape mutants upon treatment. In this context, the alternative of targeting cellular pathways involved in the viral cycle may represent a new antiviral approach.

Here, we assessed the potential antiviral activity against hRSV of Retro-2.2, a new optimized derivative of the cellular retrograde transport inhibitor Retro-2 [23]. Retro-2 was initially identified as an inhibitor of the ricin toxin [23]. This molecule and its optimized derivative Retro-2.1 were subsequently shown to display an antiviral activity against various viruses such as polyomaviruses and papillomaviruses [24–26], adeno-associated viruses [27], poxviruses [28,29], Ebola and Marburg viruses [30], and more recently SARS-CoV-2 [31]. Here, our results reveal that hRSV replication is inhibited by Retro-2.2 treatment in infected cell cultures. The treatment induced a defect in the formation of syncytia among hRSV infected cells that correlated with a defect of virions release. Further investigation revealed that Retro-2.2 affects the trafficking of the viral membrane proteins F and G to the plasma membrane. Altogether, our results highlight a new antiviral approach against hRSV, based on the inhibition of the final stages of virion assembly and release.

2. Results

2.1. Retro-2.2 antiviral activity against hRSV

Following *in vitro* screening of Retro-2.1 and different optimized Retro-2 analogues (EP3886859) on DNA and RNA viruses, we investigated the antiviral activity of the Retro-2.2 molecule (Figure 1A) against hRSV virus.

The antiviral activity of Retro-2.2 against hRSV was first assessed on HEp-2 cells infected with a recombinant hRSV expressing the mCherry reporter gene (mCherry-rRSV), which allows to quantify the inhibitory activity of compounds by fluorescence measurement [32–34]. Cells were infected with mCherry-rRSV either in the absence or the presence of serial dilutions of Retro-2.2 for 2 h. After infection, the medium was replaced by medium containing serial dilutions of Retro-2.2, and fluorescence intensity was measured 48 h post-infection. In parallel, the potential cytotoxicity of Retro-2.2 in the same conditions was evaluated on non-infected cells. As shown on Figure 1B, similar results were obtained when the cells were treated during or only after infection, with half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) close to 1.6 μM. These results suggest that Retro-2.2 has no impact on

viral particles or on the early steps of virus entry. A cytotoxic activity of Retro-2.2 was observed, with a calculated half-maximal cytotoxic concentration (CC_{50}) close to 15 μ M. The impact of Retro-2.2 on hRSV replication was also validated on different cell lines usually used as a model for hRSV studies, i.e. A549, BEAS-2B, and 293T, at a concentration of 3 μ M (Supplementary Figure S1). We then further evaluated the effect of Retro-2.2 treatment on viral shedding by quantifying virions in the culture medium of infected cells, by plaque formation assay. Our results showed that treatment with 2 μ M Retro-2.2 induces a \log_{10} decrease in viral titer compared to untreated cells, as well as a reduction of plaque size (Figure 1C). A direct observation of infected cells by fluorescence also revealed a strong effect of Retro-2.2 treatment on the size of the syncytia formed during hRSV infection, with the presence of large syncytia in the control condition compared to numerous but small syncytia in the presence of Retro-2.2 (Figure 1D).

Altogether, these results show that Retro-2.2 inhibits hRSV replication in cell culture. This inhibition is characterized by a defect of syncytia formation and of viral particles release.

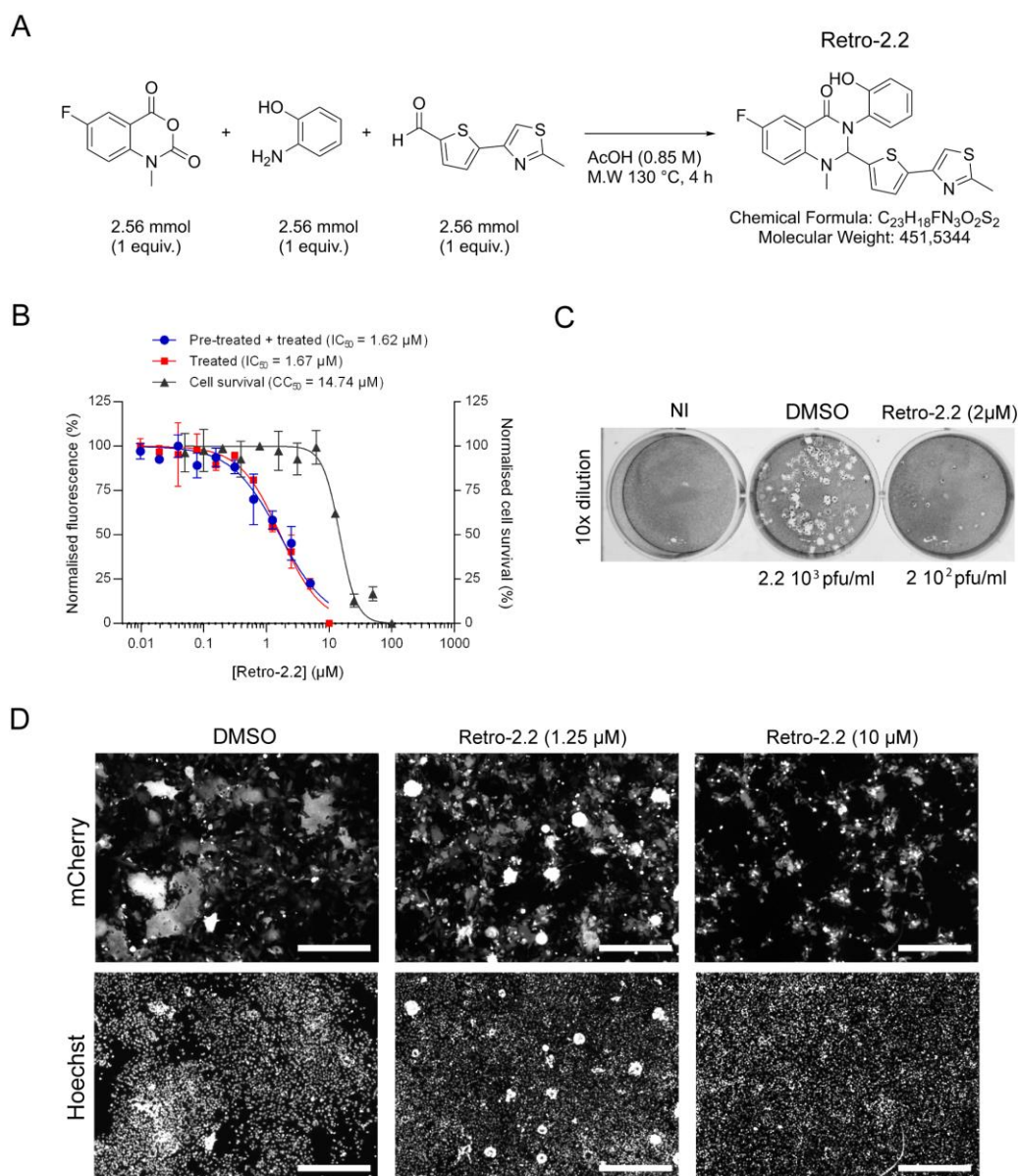


Figure 1. Impact of Retro-2.2 treatment on hRSV replication on Hep-2 cells. **(A)** Scheme of the synthesis of Retro-2.2 compound. **(B)** Cells were infected for 2 h with mCherry-rRSV at MOI 0.2, in the presence (blue curve) or the absence (red curve) of serial dilutions of Retro-2.2. The medium was then replaced to incubate cells in the presence of serial dilutions of Retro-2.2 for 48 h. The viral replication was quantified by measurement of the mCherry fluorescence. In parallel, cell viability

upon treatment with Retro-2.2 was quantified in non-infected HEp-2 cells (black curve). Error bars are standard deviations from duplicates. Data are representative of three experiments. The curves were fitted in Graph Pad software using a four parameters logistic (4PL) regression. IC_{50} and CC_{50} are indicated. (C) Titration of the virions released into the culture media (diluted 10 times) from non-infected cells (NI) or cells infected with mCherry-rRSV, and treated with DMSO (control) or Retro-2.2 at 2 μ M, by plaque formation assay. Calculated viral titers are indicated in pfu/ml. (D) Representative images of HEp-2 cell cultures infected with mCherry-rRSV at MOI 0.2, 48 hours post-infection in the absence or presence of Retro-2.2 at 1.25 and 10 μ M. Upper panel, mCherry fluorescence of infected cells; Lower panel, nuclei colored with Hoechst. Scale bars, 500 μ m.

2.2. Retro-2.2 effect on the formation of IBs and virions assembly in hRSV infected cells

In order to characterize the inhibitory effect of Retro-2.2 against hRSV, we then studied the impact of Retro-2.2 treatment on the formation of IBs and on viral assembly. BEAS-2B cells were infected with recombinant hRSV expressing the firefly Luciferase (Luc-rRSV), which displays the same hRSV sequence and kinetics of replication compared to mCherry-rRSV [32], at MOI 0.2. Cells were incubated for 36 h in the absence or presence of 2 μ M Retro-2.2, a concentration close to the IC_{50} . The N and F proteins were then immunolabelled in order to observe IBs and virions assembly, respectively. Within syncytia observed in untreated cell cultures, the F protein was concentrated in granules around the nuclei, but also at the plasma membrane where a large number of short filaments were observed (Figure 2A). Similar localization of F was observed in cells treated with Retro-2.2, although the distribution of F appeared less homogenous along the plasma membrane and longer filaments were detected compared to the control condition. However, N labelling allowed to validate the presence of IBs of similar shape in both conditions, suggesting that Retro-2.2 did not impair viral genome transcription or replication, nor viral proteins expression (Figure 2A).

Although the formation of syncytia in untreated cell culture makes the comparison difficult, these results suggest that Retro-2.2 could affect the activity of the F protein. We therefore studied the effect of Retro-2.2 in the context of cells expressing only the F protein. BEAS-2B cells were transfected with an hRSV F encoding plasmid before labelling with anti-F and anti-GM130, a marker of the cis-Golgi network, 24 h post-transfection. As shown in Figure 2B, the expression of F alone induced the formation of syncytia similar to those observed during infection and the treatment with Retro-2.2 at 2 μ M impaired the formation of large syncytia. F was also observed in perinuclear granules distinct from the cis-Golgi, and at the plasma membrane in both conditions. It is noteworthy that no modification of the GM130 labelling was observed in the presence of Retro-2.2.

These data suggest that the inhibition of large syncytia formation upon Retro-2.2 treatment during hRSV infection is mainly dependent on its effect on the F protein.

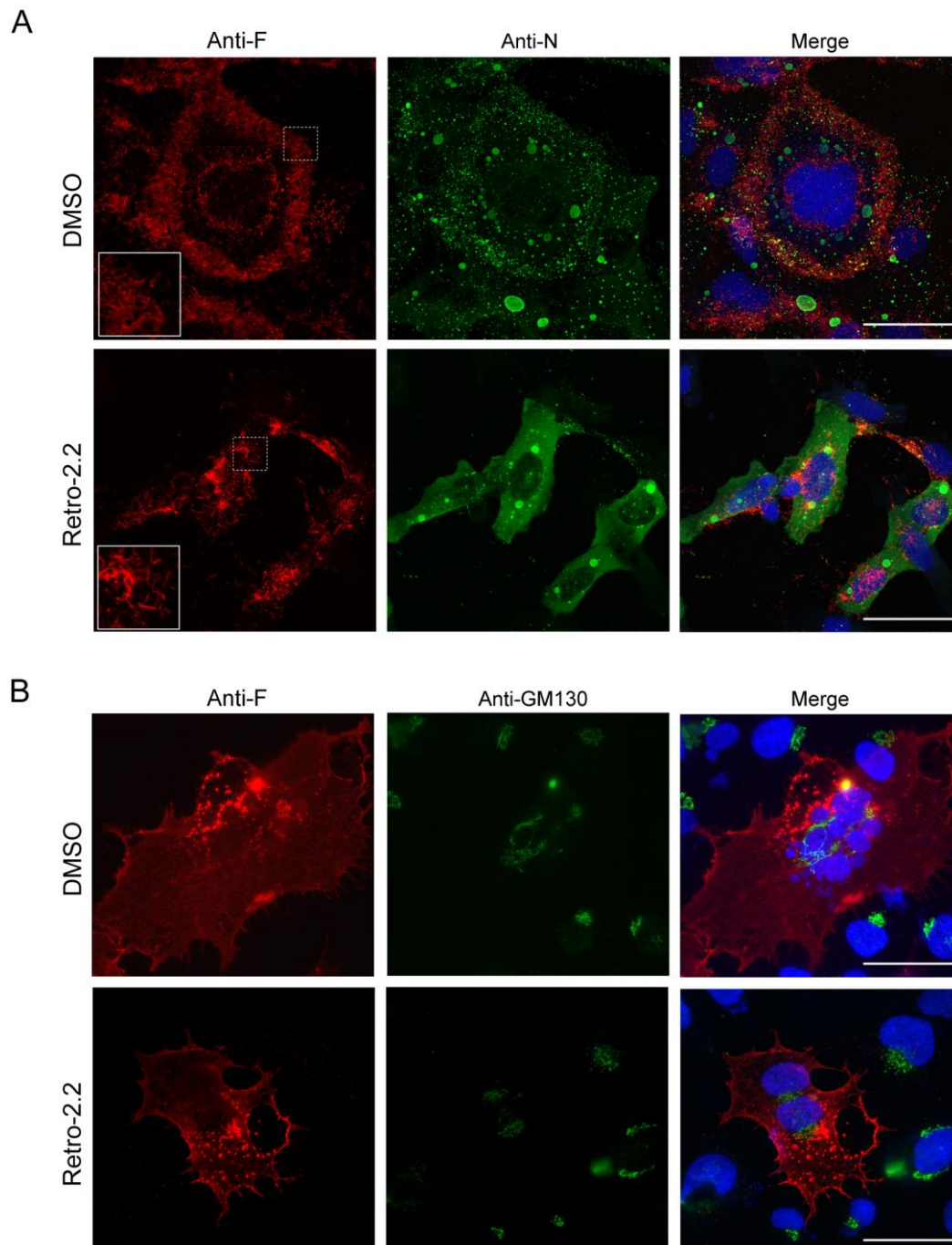


Figure 2. Effect of Retro-2.2 treatment on the localization of N and F viral proteins. **(A)** BEAS-2B cells were infected for 2 h with Luc-rRSV, and the medium was changed to incubate cells in the absence (DMSO) or the presence of Retro-2.2 at 2 μ M. Thirty-six hours post infection cells were fixed, immunostained with anti-F (red) and anti-N (green) antibodies, and nuclei were colored with Hoechst. Insets correspond to the zoom of the regions indicated by dashed squares. **(B)** BEAS-2B cells were transfected with a plasmid encoding the F protein. Twenty-four hours post-transfection cells were fixed and immunostained with anti-F (red) and anti-GM130 (green) antibodies, and nuclei were colored with Hoechst. Images are from confocal microscopy sections. Scale bars, 50 μ m.

2.3. Retro-2.2 affects the trafficking of the F protein to the plasma membrane

The F protein is a class I fusion protein expressed through the endoplasmic reticulum and Golgi network as a precursor F0. It is glycosylated, cleaved by furine to generate the F1 (50 kDa) and F2 (15 kDa) subunits linked by two disulphide bonds, and forms trimers folded in a prefusion conformation

[35] (Figure 3A). We therefore investigated if the Retro-2.2 treatment could impair the maturation of F and/or its trafficking to the plasma membrane. We first analyzed the migration profile on SDS-PAGE of the F protein from infected cells incubated in the absence or presence of Retro-2.2 for 48 hours. Cells were lysed in reducing and non-reducing condition to observe the F1 subunit only or F1 linked to F2, respectively. Surprisingly, Western blot analysis revealed similar migration profiles in all the conditions, with only a band of approximately 50 kDa corresponding to the F1 subunit (Figure 3B). Although we were not able to detect the full-length form of F in these conditions, these data show that Retro-2.2 did not abrogate the cleavage by furine. However, the treatment with Retro-2.2 led to a lower quantity of F protein, which correlates with the inhibition of viral spreading. Nevertheless, we cannot exclude a partial defect of F maturation or the induction of F degradation upon Retro-2.2 treatment. In order to assess the effect of Retro-2.2 on F trafficking, we quantified then the presence of F at the plasma membrane. To overcome the potential bias linked to cell fusion and of immunostaining, we generated a F surrogate which consisted in the insertion in place of the F ectodomain of the sequences of the mCherry and of the HiBit peptide, a 11 amino-acids long optimized peptide of the split Nano Luciferase (Figure 3A) [36]. The plasmid encoding this chimeric protein was transfected in HEp-2 cells which were incubated for 24 h in the absence or presence of 2 μ M Retro-2.2. Analysis of mCherry by fluorescence revealed that the chimeric protein mainly concentrated within intracellular granules upon Retro-2.2 treatment compared to the control condition (Figure 3C, upper panel). Western blot analysis of the chimeric protein expression revealed with an anti-mCherry antibody allowed to confirm that Retro-2.2 did not affect cell transfection nor protein expression or stability (calculated expected size, 42 kDa) (Figure 3C, lower panel). In order to quantify F expression in cells and its specific localization at the plasma membrane, the luminescence activity in total cell lysates or in the cell culture medium was then measured. Our data revealed similar levels of total luminescence in both conditions, but a clear decrease of extracellular luminescence induced by Retro-2.2 treatment (Figure 3D). Finally, we performed a similar experiment to quantify extracellular luminescence in the presence of increased concentrations of Retro-2.2. Our results show a dose dependent inhibition of the presence of the chimeric protein at the plasma membrane, with a calculated IC_{50} close to 1.3 μ M (Figure 3E), that correlated with the antiviral IC_{50} of Retro-2.2 (Figure 1A).

Altogether these results show that Retro-2.2 impairs the trafficking of F to the plasma membrane.

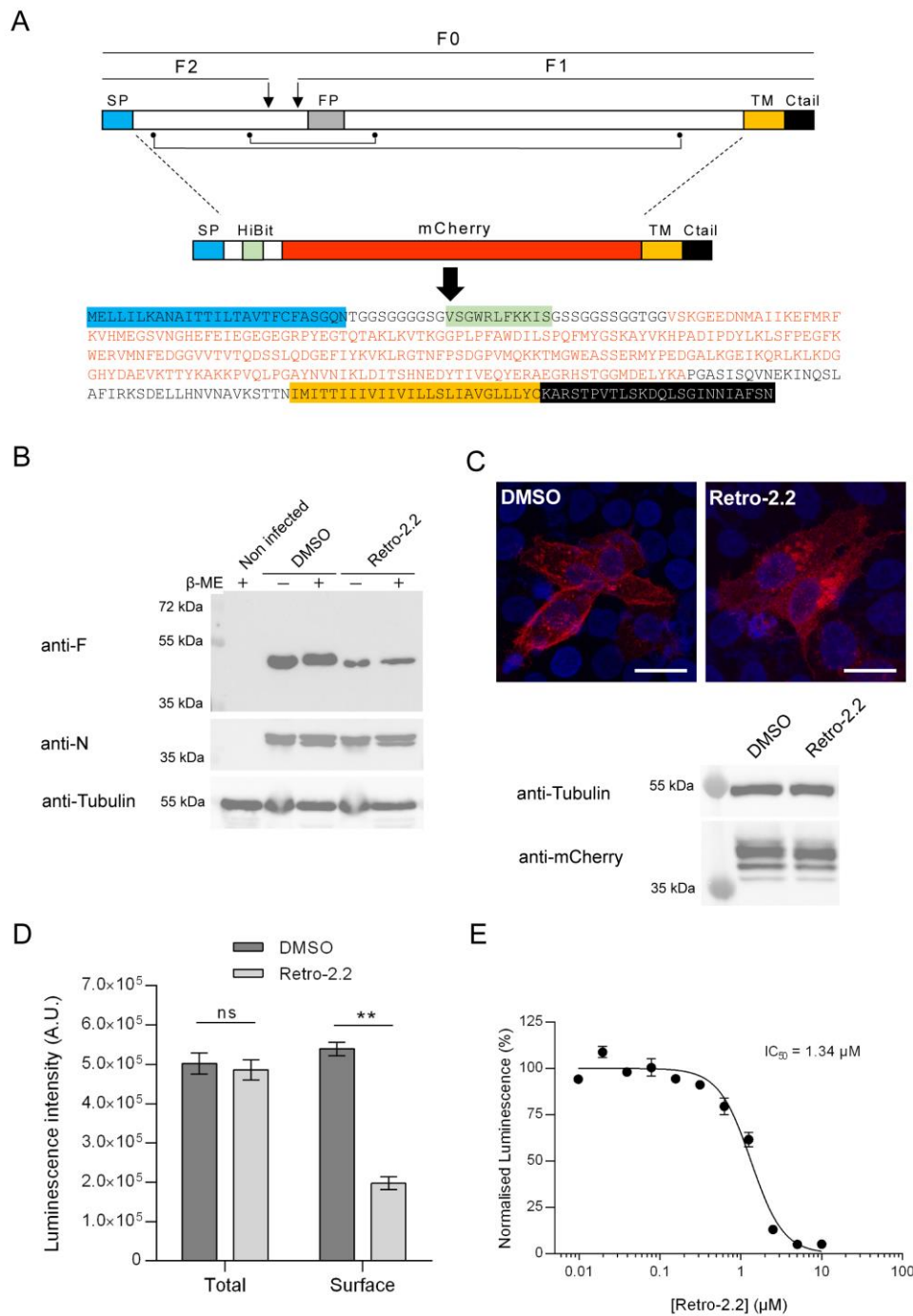


Figure 3. Impact of Retro-2.2 on the trafficking of the F protein to the plasma membrane. **(A)** Schematic representation of the F primary sequence and of the derived chimeric HiBit-mCherry-F protein. The F0 form and the F1 and F2 subunits of F are indicated. Arrows indicate the cleavage sites on F0. The points and lines indicate the cysteines and disulfide bonds. SP, signal peptide; FP, fusion peptide; TM, transmembrane domain; Ctail, intracellular C-terminal domain. The amino acid sequence of the chimeric protein is indicated with domains as colored boxes, and the mCherry sequence written in red. **(B)** Western blot analysis of the migration profile of the F protein from infected HEp-2 cells lysates incubated in the presence of DMSO or Retro-2.2 (2 μM) during 48 h. The presence or absence of β-Mercaptoethanol (β-ME) is indicated. Membranes were sequentially incubated with anti-F, anti-N and anti-tubulin antibodies. Mass weights are indicated on the left. **(C)** HEp-2 cells were transfected with the plasmid encoding the chimeric HiBit-mCherry-F protein. Six hours post-transfection, the medium was replaced to incubate the cells in the presence of Retro-2.2 at 2 μM. Twenty-four hours post-transfection cells were fixed and nuclei were stained with Hoechst, before analysis of the mCherry fluorescence by confocal microscopy (upper panel). Scale bars, 20 μm. The expression of the

chimeric protein was also validated by Western blot using an anti-mCherry antibody (lower panel) and anti-tubulin as a control. **(D)** In parallel, the presence of the chimeric protein in whole cell lysates or at the cell surface was quantified by luminescence measurement. Data are means SEM from quadruplicates. **, $P < 0.01$, ns, not significant. Data are representative of three experiments. **(E)** Similar experiment was performed in the presence of serial dilutions of Retro-2.2 and the presence of the chimeric protein at the cell surface was quantified by extracellular luminescence measurement. Error bars are standard deviations from duplicates. Data are representative of two experiments. The curves were fitted in Graph Pad software using a four parameters logistic (4PL) regression. IC_{50} is indicated.

2.4. Impact of Retro-2.2 on the G glycoprotein trafficking to the plasma membrane

We then studied whether the antiviral activity of Retro-2.2 against hRSV was restricted to F or could also modify the trafficking of the G glycoprotein to the plasma membrane. The G glycoprotein is expressed as a type II membrane protein (Figure 4A), but can also be secreted as a truncated form [37,38]. Although the transmembrane G protein is involved in the initial attachment to the host cell membrane during entry, the G protein was shown to be dispensable for hRSV replication in cell culture [39]. Therefore, the potential effect of Retro-2.2 on this protein could not have been observed using our previous assays. Using a similar strategy described above for F quantification, we generated a chimeric protein by replacing the extracellular domain of G by the HiBit sequence in fusion with EGFP (Figure 4A), and performed the assay described above. Observation of HEp-2 cells transfected with this construct for 24 h in the absence or presence of Retro-2.2 revealed the presence of chimeric protein within intracellular compartments, but no chimeric protein was clearly detected at the plasma membrane (Figure 4B). However, quantification by luminescence of the chimeric protein expression allowed to validate its presence at the plasma membrane, and revealed that Retro-2.2 treatment induced a decrease of the quantity of the chimeric protein at the plasma membrane (Figure 4C). Of note, the expression of the chimeric protein was similar in cells treated with Retro-2.2 compared to the control condition, as confirmed by total luminescence quantification and Western blot analysis of the chimeric protein expression revealed with anti-GFP antibody (calculated expected size, 38 kDa) (Figure 4C). Our results also showed a dose dependent inhibition of the presence of this chimeric protein at the plasma membrane upon Retro-2.2 treatment, with a calculated IC_{50} close to 1.1 μ M (Figure 4D).

These results suggest that Retro-2.2 could affect not only F but also G trafficking to the plasma membrane.

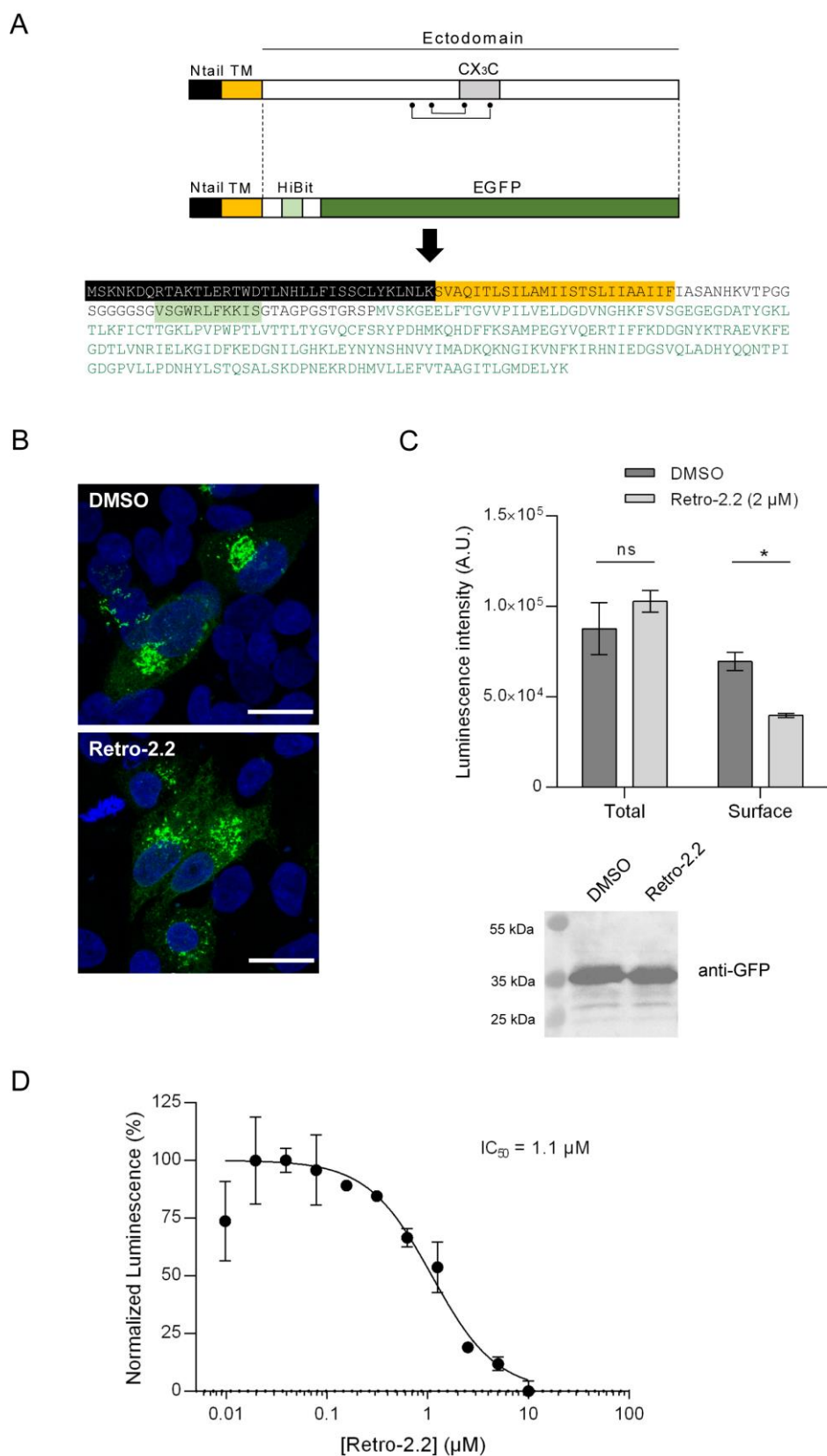


Figure 4. Impact of Retro-2.2 on the addressing of the hRSV G protein to the plasma membrane. **(A)** Schematic representation of the G protein and of the derived chimeric HiBit-EGFP-G protein. The points and line indicate the cysteines and disulfide bonds. Ntail, intracellular N-terminal domain; TM, transmembrane domain; CX₃C, binding domain on the CX₃C receptor. The amino acid sequence of the chimeric protein is indicated with domains represented as colored boxes, and the EGFP sequence

written in green. **(B)** HEp-2 cells were transfected with the plasmid encoding the chimeric HiBit-EGFP-G protein. Six hours post-transfection, the medium was replaced to incubate the cells in the presence of Retro-2.2 at 2 μ M. Twenty-four hours post-transfection cells were fixed and nuclei were stained with Hoechst, before analysis of the EGFP fluorescence by confocal microscopy. Scale bars, 20 μ m. **(C)** In parallel, the luminescence in whole cell lysates or in the extracellular environment was quantified (upper panel), and expression of the chimeric protein was validated by Western blot using an anti-GFP antibody. Data are means SEM from quadruplicats. *, $P < 0.05$; ns, not significant. Data are representative of two experiments. **(D)** Similar experiment was performed in the presence of serial dilutions of Retro-2.2 and the presence of the chimeric protein at the cell surface was quantified by extracellular luminescence measurement. Error bars are standard deviations from duplicates. Data are representative of two experiments. The curves were fitted in Graph Pad software using a four parameters logistic (4PL) regression. IC_{50} is indicated.

2.5. Down-expression of syntaxin-5 and Sec16A impair hRSV replication and syncytia formation

We then considered whether Retro-2.2 antiviral activity could be related to the mechanism of action already described for the Retro-2 compounds. Syntaxin-5 (Syn5) is a SNARE protein that is involved in cellular retrograde transport pathways. Syn5 was previously described to be relocated in the presence of Retro-2 [23]. Sec16A is a protein located at the reticulum endoplasmic exit sites that regulates the formation of COPII vesicles. Sec16A is involved in the endoplasmic reticulum secretion pathway. It was previously identified as a target of the Retro-2 compound [40]. We therefore studied the impact of the down-regulation of Syn5 or Sec16A expression on hRSV replication. Human epithelial A549 cells were transfected with siRNA for 24 h, then infected for 48 h with Luc-rRSV with a MOI of 0.2. Quantification of viral replication by luminescence measurement on cells lysates revealed that down-regulation of Syn5 or Sec16A both induced a 30-40% decrease of the infection (Figure 5A). Western blot analysis of cell lysates confirmed the down-expression of the two isoforms of Syn5 at this final time point (Figure 5A) [41]. Unfortunately, we did not manage to validate Sec16A extinction as we did not succeed to reveal Sec16A expression by Western blot. In order to observe the impact of siRNA on syncytia formation during infection, the same experiment was performed on cells infected with mCherry-rRSV. As shown on Figure 5C, down-regulation of Syn5 and Sec16A expression impaired the formation of large syncytia compared to the control condition.

Therefore, our data reveal that, similarly to the treatment by Retro-2.2, down-regulation of Syn5 or Sec16A expression affects the capacity of hRSV to form large syncytia in cell culture. These observations suggest that Retro-2.2 viral inhibition could be linked to its inhibitory activity on the retrograde pathway.

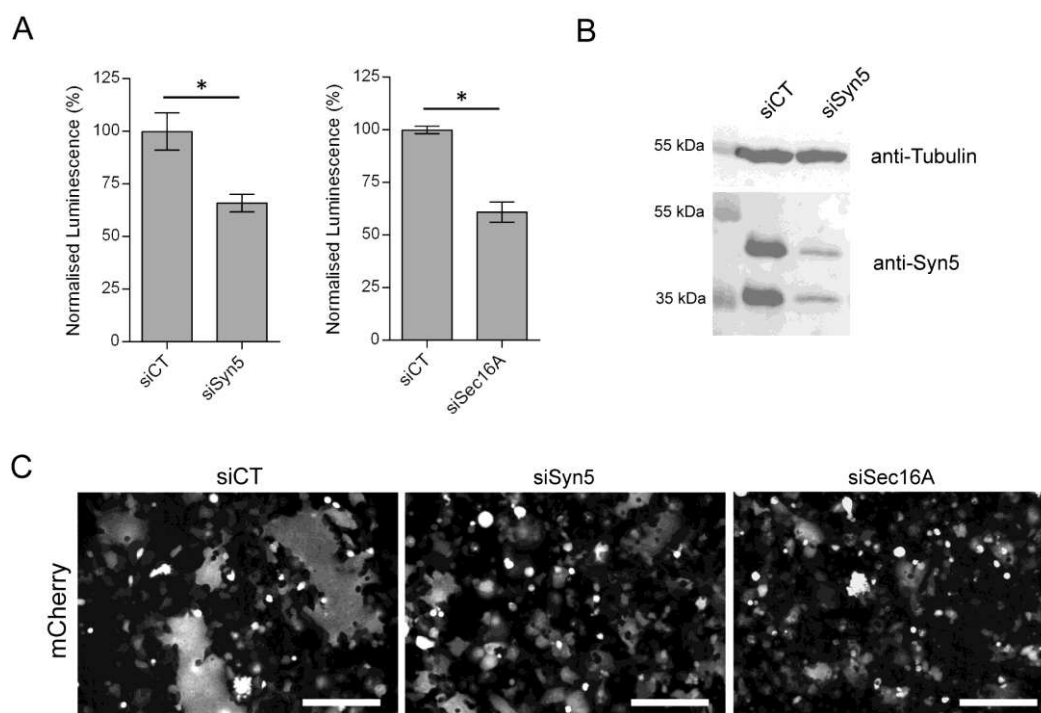


Figure 5. Downregulation of Syn5 and Sec16A expression impair hRSV replication and syncytia formation. HEp-2 cells were transfected with control siRNA (siCT) or siRNA targeting syntaxin-5 (siSyn5) or Sec16A (siSec16A) during 24 h, before infection with Luc-rRSV at MOI 0.2 during 48 h. **(A)** Viral replication was quantified by measuring the luminescence in cell lysates. Data are means SEM from quadruplicates. *, $P < 0.05$. Data are representative of three experiments. **(B)** Western blot analysis of Syn5 expression in total cells lysates. **(C)** HEp-2 cells transfected with siRNA as described above were infected with mCherry-rRSV at MOI 0.2 during 48 h. Representative images of mCherry fluorescence of infected HEp-2 cell cultures. Scale bars, 200 μm .

3. Discussion

Although vaccines against hRSV have been recently commercialized, there is still a need for antiviral treatments to treat hRSV infections. Many attempts have been made by pharmaceutical companies to develop compounds specifically targeting the viral F and L proteins. However, the emergence of escape mutants upon treatment highlights the necessity to search for alternatives and/or complementary antiviral approaches. Among those, strategies aiming at interfering with intracellular trafficking pathways required for pathogen infections could be promising.

In the present study, we evaluated the potential antiviral activity of the Retro-2.2 compound. This compound was derived from the structure-activity relationship study performed to increase the efficiency of the initial Retro-2 molecule and its optimized Retro-2.1 analogue (EP3886859). Retro-2.2 was found twice more effective against Shiga toxins than Retro-2.1, Shiga toxins being reference bacterial toxins using the retrograde transport in our structure-activity relationship study. Retro-2 and Retro-2.1 were shown to be active against a large panel of viruses [42]. Here, we first showed that Retro-2.2 presents an antiviral activity against hRSV in cell cultures, in the micromolar range. However, we also detected a non-expected cytotoxic effect of the compound in our conditions, with a CC_{50} close to 15 μM . This low selectivity index value compared to the one obtained for the optimized Retro-2.1 molecule in previous studies [43,44] will need to be investigated.

Our data also show that Retro-2.2 did not impact the viral particle or the initial infection nor the formation of viral factories, but induced a defect of viral particles release associated to a decrease of syncytia formation in cell culture. Altogether, these results suggest that Retro-2.2 targets a late stage of the viral cycle, and more specifically the F protein function. By engineering chimeric transmembrane fluorescent proteins which display the HiBit peptide fused with the transmembrane

sequences of the F or G proteins, we were able to reveal that Retro-2.2 could impair the traffic of the F but also of the G protein to the plasma membrane. However, despite several attempts of co-immunofluorescence labelling of F and proteins of either the endoplasmic reticulum, the Golgi apparatus or the endosomes (not shown), we were not able to characterize a specific site of retention of the F and G proteins inside the cells. Noteworthy, in order to decipher the specificity of action of Retro-2.2 against hRSV, and to gain information on the cytotoxicity of the treatment, it would be necessary to evaluate the impact of Retro-2.2 treatment on the trafficking of cellular proteins known to be addressed to the plasma membrane such as TGN46 or Cl-MPR. In parallel, we showed that down-regulation of Syn5 and Sec16A, two proteins that were described as indirect and direct targets of Retro-2 respectively, also inhibited hRSV replication in cell culture, and the formation of large syncytia. Taken together, our results strongly suggest that, by modifying the cellular retrograde pathway, Retro-2.2 affects the trafficking of hRSV membrane proteins to the plasma membrane. However, we cannot exclude that Retro-2.2 treatment could also alter the full maturation of the F and G proteins.

As mentioned above, Retro-2.2 displays only low antiviral activity in cell culture. Nevertheless, given the dual effect of the treatment on F and G proteins, and based on the fact that G protein is not critical for hRSV replication in cell culture but favours *in vivo* replication, it would be interesting to test the antiviral activity of this compound *in vivo* in a mouse model. For this purpose, one would expect that, as recently shown for Retro-2.1, the formulation in a thermosensitive hydrogel could foster the delivery of Retro-2.2 *in vivo* [45].

In conclusion, our data highlight that molecules that interfere with the trafficking of intracellular vesicles could be used as antivirals against hRSV. Optimisation of such molecules to improve their selectivity index, their solubility and their delivery *in vivo*, still remains necessary. Finally, our results allowed to extend the list of the pathogens sensitive to Retro-2 derivatives, and reinforce the potential interest of these molecules as broad-spectrum antivirals.

4. Materials and Methods

4.1. Cells

HEp-2 cells (ATCC, CCL-23), A549 (ATCC, CCL-185) and 293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Eurobio) supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum (FCS; Eurobio), 1% L-glutamine, and 1% penicillin-streptomycin. The transformed human bronchial epithelial cell line (BEAS-2B) (ATCC CRL-9609) was maintained in RPMI 1640 medium (Eurobio) supplemented with 10% FCS, 1% L-glutamine, and 1% penicillin-streptomycin. The cells were grown at 37°C in 5% CO₂ and transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) as described by the manufacturer.

4.2. Retro-2.2 compound synthesis

A mixture containing 6-fluoro-1-methyl-2H-benzo[d][1,3]oxazine-2,4(1H)-dione (500 mg, 2.56 mmol), 2-aminophenol (280 mg, 2.56 mmol) and 5-(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)-2-thiophenecarbaldehyde (536 mg, 2.56 mmol) in acetic acid (3 mL), was heated at 130 °C in a microwave synthesizer (CEM) for 4 h. The crude mixture was diluted in ethyl acetate and a saturated NaHCO₃ aqueous solution was added. The mixture was stirred vigorously for 1 h. The aqueous layer was extracted two more times with EtOAc. The combined organic phase was dried over magnesium sulfate, filtered off and the solvent was evaporated under vacuum. Purification by column chromatography (CombiFlash Serlabo; column 40G) on silica gel using cyclohexane/ethyl acetate (60/40) afforded **1** as a pale brown solid (985 mg, 85% yield). At the end of the synthesis the compound was analyzed by ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR), and mass spectrometry (LC-MS). The m/z calculated for C₂₃H₁₈FN₃O₂S₂H [M+H]⁺ (Retro-2.2) was 452.4Da, with a purity of 99.5%.

4.3. Viruses and titration by plaque formation assay

The recombinant mCherry-rRSV and Luc-rRSV corresponding to the RSV Long strain expressing either the mCherry or the firefly luciferase protein were amplified in HEp-2 cells and titrated using a plaque assay procedure as previously described [32]. Briefly, for titration, cells were infected with serial 10-fold dilutions of the viral supernatant in complete minimum essential medium (MEM). The overlay was prepared with Avicel RC581 microcrystalline cellulose (FMC Biopolymer) at a final concentration of 0.6% in complete MEM containing 1% fetal calf serum. After 6 days at 37°C with 5% CO₂, plaques were revealed by staining of the cell layers with a solution containing 0.5% crystal violet and 20% ethanol, and the number of PFU per well was counted.

4.4. Plasmids

pcDNA3.1 codon-optimized plasmid for mammalian expression encoding the hRSV F was a gift from Marty Moore, Emory University [46]. The sequences encoding the chimeric proteins (primary sequences shown in Figures 3 and 4) were optimized for eukaryotic expression and commercially made (GeneCust). The full-length sequence of mCherry-HiBit-F was cloned into pCI vector (Genbank accession n° U47119). For HiBit-GFP-G expression, the optimized sequence encoding the N-terminal and transmembrane domains of G, in fusion with the HiBit sequence was clone in fusion with EGFP into the pEGFP-N2 vector (Clontech).

4.5. Antibodies

The following primary antibodies were used for immunostaining and/or immunoblotting: mouse anti-F (BioRad, Hercules, USA), mouse anti-F 2F7 (Abcam, Cambridge, UK), mouse anti-G (Abcam), rabbit anti-N antiserum [47], rabbit anti-GM130 (Abcam), mouse anti-Syntaxin-5 (Santa Cruz, Dallas, USA), mouse monoclonal anti- β tubulin antibody (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA), rabbit anti-GFP (Invitrogen, Waltham, USA), and anti-mCherry (Rockland immunochemicals, Limerick, USA).

Secondary antibodies directed against mouse and rabbit IgG coupled to HRP (SeraCare, Milford, USA) were used for immunoblotting, and antibodies directed against mouse and rabbit IgG coupled to Alexa 594 or Alexa 488 (Invitrogen) respectively were used for immunostaining.

4.6. Antiviral and cytotoxic activity assays

Cells were seeded at 5×10^4 cells per well in 96-well plates. Twenty-four hours later, the cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 0.2 for 2 h with mCherry-rRSV or Luc-rRSV diluted in MEM without phenol red and without FCS. In parallel, Retro-2.2 compound was serially diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) and then further diluted in MEM without phenol red medium containing 2% FCS. Two hours post-infection, the cell culture medium was replaced by the medium containing Retro-2.2, and plates were incubated at 37 °C for 24 to 48 h before analysis. The mCherry fluorescence was measured using a spectrophotometer (Tecan Infinite M200PRO) with excitation and emission wavelengths of 580 and 620 nm, respectively. For Luc-rRSV replication quantification, cells were lysed in luciferase lysis buffer (30 mM Tris [pH 7.9], 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1% Triton X-100, and 15% glycerol). After the addition of luciferase assay reagent (Promega), luminescence was measured using a Tecan Infinite M200 Pro luminometer (Tecan, Männedorf, Switzerland). The values obtained for noninfected HEp-2 cells was used as a standard for the fluorescence and luminescence background levels respectively, and the value obtained for infected and untreated cells was used to normalize the data. Cytotoxicity assays were performed on non-infected cells incubated for 48 h with the serial dilutions of Retro-2.2, using the CellTiter-Glo luminescent cell viability kit (Promega). Each experiment was performed in duplicate and repeated at least twice. IC₅₀ and CC₅₀ values were calculated by fitting the data to a sigmoidal curve equation in GraphPad software (GraphPad Prism 10).

4.7. siRNA experiments

The control siRNA and siRNAs against Syn-5 and Sec16A were purchased from Qiagen (Quiagen, Hilden, Germany). Each siRNA is a pool containing 4 different sequences (Catalog number: SI03075345, SI03052966, SI00048636 and SI00048615). A549 cells were transfected with the indicated siRNAs at a final concentration of 20 nM by reverse transfection into 96-well plates (7×10^4 cells per well) using Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher) according to the manufacturer's instructions. Briefly, a mixture containing Opti-MEM (Invitrogen), Lipofectamine RNAiMAX, and siRNA was incubated for 5 min at room temperature before being deposited at the bottom of the wells. The cells in MEM without antibiotics were then added dropwise before incubation at 37°C with 5% CO₂. After 24 h of transfection in the presence of siRNA, the medium was removed, and the cells were infected following the protocol described above. Forty-eight hours post-infection, the mCherry fluorescence was measured using a spectrophotometer (Tecan Infinite M200PRO) with excitation and emission wavelengths of 580 and 620 nm, respectively. The values obtained for noninfected HEp-2 cells were used as a standard for the fluorescence background level, and the values obtained for infected cells transfected with the siCT were used to normalize the data. Each experiment was performed in quadruplicate and repeated three times. For each experiment, cells were finally lysed in Laemmli, and Syn5 and tubulin expression was analyzed by Western blotting.

4.8. SDS-PAGE and Western blot analysis

Protein samples were separated by electrophoresis on 12% polyacrylamide gels in Tris-glycine buffer. All samples were boiled for 3 min prior to electrophoresis. Proteins were then transferred to a nitrocellulose membrane (BioRad). The blots were blocked with 5% non-fat milk in PBS Tween20 0.2%, followed by incubation with mouse anti-F antibody (1:1,000), rabbit anti-N antiserum (1:5,000), mouse anti-tubulin (1:1,000), or mouse anti-Syn5 (1:2,000) and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse or anti-rabbit (1:10,000) secondary antibodies (SeraCare). Western blots were developed using Clarity™ Western ECL substrate (Bio-Rad) and exposed using Bio-Rad ChemiDoc Touch Imaging System.

4.9. Immunofluorescence

Cells were seeded in 24-wells plates containing coverslip. Plates were infected or transfected depending on the assay. Cells were fixed using 4% paraformaldehyde for 30 minutes at room temperature, then permeabilized in PBS buffer containing 3% bovine albumin serum (BSA) and 0.1% Triton X-100 for 30 minutes at room temperature. Cells were then washed once in PBS-3% BSA-0.05% Tween20, and incubated with relevant mouse or rabbit primary antibody (anti-F 1:1,000, anti-N 1:20,000 ; anti-GM130 1:1,000) diluted in PBS-3% BSA-0.05% Tween20 for 1 h at room temperature. Cells were washed 3 times with PBS-3% BSA-0.05% Tween20, then incubated with goat anti-mouse or goat anti-rabbit secondary antibody coupled to Alexa 488 or Alexa 594. Cells were then washed 3 times with PBS-3% BSA-0.05% Tween20 and two times with PBS. For nucleus labeling, cells were exposed to Hoechst 33342 stain (Invitrogen) during incubation with secondary antibodies. Coverslips were mounted with ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen). Images were obtained using an inverted SP8x confocal microscope (Leica) using a 63x oil immersion objective. Maximum projections of optical Z slices are shown. Images were processed with Leica imaging software LAS X and ImageJ/FIJI software.

4.10. HiBit Luminescence assay

Hep-2 cells were seeded at 5×10^4 cells per well in 96-well plates or 2×10^5 cells 24-well plates containing coverslips. Cells were transfected in Opti-MEM (Gibco) with 0.2 μg DNA per well (96-well plate) or 1 μg DNA per well (24-well plate) using Lipofectamine 2000 for 5 h. The medium was then changed for Opti-MEM supplemented with Retro-2.2 at various concentrations. Twenty-four hours post-transfection, the expression of chimeric proteins in total cell lysates or at the cell surface was quantified by luminescence measurement using the Nano-Glo HiBiT Lytic Detection System (Promega, N3030) or the Nano-Glo HiBiT Extracellular Detection System (Promega, N2420), respectively, according to manufacturer's protocol. For each experiment, cells were finally lysed in Laemmli, and the expression of chimeric proteins was analyzed by Western blotting.

4.11. Statistical analysis

A nonparametric Mann-Whitney test (comparison of two groups) ($n = 4$ or 6) was used to compare unpaired values (GraphPad Prism software). Significance is represented in the figures (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at the website of this paper posted on Preprints.org. Figure S1: Antiviral activity of Retro-2.2 against hRSV infection of different cell lines.

Author Contributions: Conceptualization, J.B., D.G., M.K. and M.G.; methodology, A.L.-R., J.F.E., J.B., D.G., M.G.; validation, A.L.-R., M.G.; formal analysis, D.G., J.B., A.L.-R., and M.G.; investigation, A.L.-R., J.F., R.V., J.-C.C., M.G., J.B., S.K.-G., R.V., F.G.; writing—original draft preparation, D.G., and M.G.; writing—review and editing, J.B., D.G., and M.G.; supervision, D.G. and M.G.; project administration, D.G. and M.G.; funding acquisition, M.K., D.G., J.B. and M.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the joint ministerial program of R&D against CBRNE risks, CEA and under Contract ANR20-CE18-0016 (SMERSEC), ANR-11-IDEX-0003-02 (PFI n° 20LU1000-131 ReCoVer and OTP n° 20LU1000_138 PIMVir). A.L.-R. was funded by Université Paris-Saclay.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank Dr Marie-Anne Rameix-Welti for the plasmid of pmCherry-F. The present work has benefited from Imagerie-Gif core facility supported by l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-EQPX-0029/Morphoscope, ANR-10-INBS-04/FranceBioImaging; ANR-11-IDEX-0003-02/ Saclay Plant Sciences).

Conflicts of Interest: S.K.-G. and F.G. are employees and shareholders of NeoVirTech SAS. No other conflict of interest to declare.

References

- Shi, T.; McAllister, D. A.; O'Brien, K. L.; Simoes, E. A. F.; Madhi, S. A.; Gessner, B. D.; Polack, F. P.; Balsells, E.; Acacio, S.; Aguayo, C.; Alassani, I.; Ali, A.; Antonio, M.; Awasthi, S.; Awori, J. O.; Azziz-Baumgartner, E.; Baggett, H. C.; Baillie, V. L.; Balmaseda, A.; Barahona, A.; Basnet, S.; Bassat, Q.; Basualdo, W.; Bigogo, G.; Bont, L.; Breiman, R. F.; Brooks, W. A.; Broor, S.; Bruce, N.; Bruden, D.; Buchy, P.; Campbell, S.; Carosone-Link, P.; Chadha, M.; Chipeta, J.; Chou, M.; Clara, W.; Cohen, C.; de Cuellar, E.; Dang, D. A.; Dash-Yandag, B.; Deloria-Knoll, M.; Dherani, M.; Eap, T.; Ebruke, B. E.; Echavarria, M.; de Freitas Lazaro Emediato, C. C.; Fasce, R. A.; Feikin, D. R.; Feng, L.; Gentile, A.; Gordon, A.; Goswami, D.; Goyet, S.; Groome, M.; Halasa, N.; Hirve, S.; Homaira, N.; Howie, S. R. C.; Jara, J.; Jroundi, I.; Kartasasmita, C. B.; Khuri-Bulos, N.; Kotloff, K. L.; Krishnan, A.; Libster, R.; Lopez, O.; Lucero, M. G.; Lucion, F.; Lupisan, S. P.; Marcone, D. N.; McCracken, J. P.; Mejia, M.; Moisi, J. C.; Montgomery, J. M.; Moore, D. P.; Moraleta, C.; Moyes, J.; Munywoki, P.; Mutyara, K.; Nicol, M. P.; Nokes, D. J.; Nymadawa, P.; da Costa Oliveira, M. T.; Oshitani, H.; Pandey, N.; Paranhos-Baccala, G.; Phillips, L. N.; Picot, V. S.; Rahman, M.; Rakoto-Andrianarivelo, M.; Rasmussen, Z. A.; Rath, B. A.; Robinson, A.; Romero, C.; Russomando, G.; Salimi, V.; Sawatwong, P.; Scheltema, N.; Schweiger, B.; Scott, J. A. G.; Seidenberg, P.; Shen, K.; Singleton, R.; Sotomayor, V.; Strand, T. A.; Sutanto, A.; Sylla, M.; Tapia, M. D.; Thamthitawat, S.; Thomas, E. D.; Tokarz, R.; Turner, C.; Venter, M.; Waicharoen, S.; Wang, J.; Watthanaworawit, W.; Yoshida, L. M.; Yu, H.; Zar, H. J.; Campbell, H.; Nair, H.; Network, R. S. V. G. E., 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, (10098), 946-958.
2. Pneumonia Etiology Research for Child Health Study, G., 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, (10200), 757-779.
 3. Phillips, M.; Finelli, L.; Saiman, L.; Wang, C.; Choi, Y.; Patel, J., Respiratory Syncytial Virus-associated Acute Otitis Media in Infants and Children. *J Pediatric Infect Dis Soc* **2020**, 9, (5), 544-550.
 4. Shi, T.; Ooi, Y.; Zaw, E. M.; Utjesanovic, N.; Campbell, H.; Cunningham, S.; Bont, L.; Nair, H.; Investigators, R., Association Between Respiratory Syncytial Virus-Associated Acute Lower Respiratory Infection in Early Life and Recurrent Wheeze and Asthma in Later Childhood. *J Infect Dis* **2020**, 222, (Suppl 7), S628-S633.
 5. Busack, B.; Shorr, A. F., Going Viral-RSV as the Neglected Adult Respiratory Virus. *Pathogens* **2022**, 11, (11).
 6. Papi, A.; Ison, M. G.; Langley, J. M.; Lee, D. G.; Leroux-Roels, I.; Martinon-Torres, F.; Schwarz, T. F.; van Zyl-Smit, R. N.; Campora, L.; Dezutter, N.; de Schrevel, N.; Fissette, L.; David, M. P.; Van der Wielen, M.; Kostanyan, L.; Hulstrom, V.; Group, A. R.-S., Respiratory Syncytial Virus Prefusion F Protein Vaccine in Older Adults. *N Engl J Med* **2023**, 388, (7), 595-608.
 7. Walsh, E. E.; Perez Marc, G.; Zareba, A. M.; Falsey, A. R.; Jiang, Q.; Patton, M.; Polack, F. P.; Llapur, C.; Doreski, P. A.; Ilangovan, K.; Ramet, M.; Fukushima, Y.; Hussen, N.; Bont, L. J.; Cardona, J.; DeHaan, E.; Castillo Villa, G.; Ingilizova, M.; Eiras, D.; Mikati, T.; Shah, R. N.; Schneider, K.; Cooper, D.; Koury, K.; Lino, M. M.; Anderson, A. S.; Jansen, K. U.; Swanson, K. A.; Gurtman, A.; Gruber, W. C.; Schmoele-Thoma, B.; Group, R. C. T., Efficacy and Safety of a Bivalent RSV Prefusion F Vaccine in Older Adults. *N Engl J Med* **2023**, 388, (16), 1465-1477.
 8. Kampmann, B.; Madhi, S. A.; Munjal, I.; Simoes, E. A. F.; Pahud, B. A.; Llapur, C.; Baker, J.; Perez Marc, G.; Radley, D.; Shittu, E.; Glanternik, J.; Snaggs, H.; Baber, J.; Zachariah, P.; Barnabas, S. L.; Fausett, M.; Adam, T.; Perreras, N.; Van Houten, M. A.; Kantele, A.; Huang, L. M.; Bont, L. J.; Otsuki, T.; Vargas, S. L.; Gullam, J.; Tapiero, B.; Stein, R. T.; Polack, F. P.; Zar, H. J.; Staerke, N. B.; Duron Padilla, M.; Richmond, P. C.; Koury, K.; Schneider, K.; Kalinina, E. V.; Cooper, D.; Jansen, K. U.; Anderson, A. S.; Swanson, K. A.; Gruber, W. C.; Gurtman, A.; Group, M. S., Bivalent Prefusion F Vaccine in Pregnancy to Prevent RSV Illness in Infants. *N Engl J Med* **2023**, 388, (16), 1451-1464.
 9. Pinquier, D.; Crepey, P.; Tissieres, P.; Vabret, A.; Roze, J. C.; Dubos, F.; Cahn-Sellem, F.; Javouhey, E.; Cohen, R.; Weil-Olivier, C., Preventing Respiratory Syncytial Virus in Children in France: A Narrative Review of the Importance of a Reinforced Partnership Between Parents, Healthcare Professionals, and Public Health Authorities. *Infect Dis Ther* **2023**, 12, (2), 317-332.
 10. Griffin, M. P.; Yuan, Y.; Takas, T.; Domachowske, J. B.; Madhi, S. A.; Manzoni, P.; Simoes, E. A. F.; Esser, M. T.; Khan, A. A.; Dubovsky, F.; Villafana, T.; DeVincenzo, J. P.; Nirsevimab Study, G., Single-Dose Nirsevimab for Prevention of RSV in Preterm Infants. *N Engl J Med* **2020**, 383, (5), 415-425.
 11. Hammit, L. L.; Dagan, R.; Yuan, Y.; Baca-Cots, M.; Bosheva, M.; Madhi, S. A.; Muller, W. J.; Zar, H. J.; Brooks, D.; Grenham, A.; Wahlby-Hamren, U.; Mankad, V. S.; Ren, P.; Takas, T.; Abram, M. E.; Leach, A.; Griffin, M. P.; Villafana, T.; Group, M. S., Nirsevimab for Prevention of RSV in Healthy Late-Preterm and Term Infants. *N Engl J Med* **2022**, 386, (9), 837-846.
 12. Afonso, C. L.; Amarasinghe, G. K.; Banyai, K.; Bao, Y.; Basler, C. F.; Bavari, S.; Bejerman, N.; Blasdel, K. R.; Briand, F. X.; Briese, T.; Bukreyev, A.; Calisher, C. H.; Chandran, K.; Cheng, J.; Clawson, A. N.; Collins, P. L.; Dietzgen, R. G.; Dolnik, O.; Domier, L. L.; Durrwald, R.; Dye, J. M.; Easton, A. J.; Ebihara, H.; Farkas, S. L.; Freitas-Astua, J.; Formenty, P.; Fouchier, R. A.; Fu, Y.; Ghedin, E.; Goodin, M. M.; Hewson, R.; Horie, M.; Hyndman, T. H.; Jiang, D.; Kitajima, E. W.; Kobinger, G. P.; Kondo, H.; Kurath, G.; Lamb, R. A.; Lenardon, S.; Leroy, E. M.; Li, C. X.; Lin, X. D.; Liu, L.; Longdon, B.; Marton, S.; Maisner, A.; Muhlberger, E.; Netesov, S. V.; Nowotny, N.; Patterson, J. L.; Payne, S. L.; Paweska, J. T.; Randall, R. E.; Rima, B. K.; Rota, P.; Rubbenstroth, D.; Schwemmler, M.; Shi, M.; Smither, S. J.; Stenglein, M. D.; Stone, D. M.; Takada, A.; Terregino, C.; Tesh, R. B.; Tian, J. H.; Tomonaga, K.; Tordo, N.; Towner, J. S.; Vasilakis, N.; Verbeek, M.; Volchkov, V. E.; Wahl-Jensen, V.; Walsh, J. A.; Walker, P. J.; Wang, D.; Wang, L. F.; Wetzel, T.; Whitfield, A. E.; Xie, J. T.; Yuen, K. Y.; Zhang, Y. Z.; Kuhn, J. H., Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Arch Virol* **2016**, 161, (8), 2351-60.
 13. Srinivasakumar, N.; Ogra, P. L.; Flanagan, T. D., Characteristics of fusion of respiratory syncytial virus with HEp-2 cells as measured by R18 fluorescence dequenching assay. *J Virol* **1991**, 65, (8), 4063-9.
 14. Krzyzaniak, M. A.; Zumstein, M. T.; Gerez, J. A.; Picotti, P.; Helenius, A., Host cell entry of respiratory syncytial virus involves macropinocytosis followed by proteolytic activation of the F protein. *PLoS Pathog* **2013**, 9, (4), e1003309.
 15. Kahn, J. S.; Schnell, M. J.; Buonocore, L.; Rose, J. K., Recombinant vesicular stomatitis virus expressing respiratory syncytial virus (RSV) glycoproteins: RSV fusion protein can mediate infection and cell fusion. *Virology* **1999**, 254, (1), 81-91.

16. Pierangeli, A.; Scagnolari, C.; Antonelli, G., Respiratory syncytial virus. *Minerva Pediatr* **2018**, *70*, (6), 553-565.
17. 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* **1993**, *195*, (1), 243-7.
18. Rincheval, V.; Lelek, M.; Gault, E.; Bouillier, C.; Sitterlin, D.; Blouquit-Laye, S.; Galloux, M.; Zimmer, C.; Eleouet, J. F.; Rameix-Welti, M. A., Functional organization of cytoplasmic inclusion bodies in cells infected by respiratory syncytial virus. *Nat Commun* **2017**, *8*, (1), 563.
19. DeVincenzo, J. P.; Whitley, R. J.; Mackman, R. L.; Scaglioni-Weinlich, C.; Harrison, L.; Farrell, E.; McBride, S.; Lambkin-Williams, R.; Jordan, R.; Xin, Y.; Ramanathan, S.; O'Riordan, T.; Lewis, S. A.; Li, X.; Toback, S. L.; Lin, S. L.; Chien, J. W., Oral GS-5806 activity in a respiratory syncytial virus challenge study. *The New England journal of medicine* **2014**, *371*, (8), 711-22.
20. Detalle, L.; Stohr, T.; Palomo, C.; Piedra, P. A.; Gilbert, B. E.; Mas, V.; Millar, A.; Power, U. F.; Stortelers, C.; Allosery, K.; Melero, J. A.; Depla, E., Generation and Characterization of ALX-0171, a Potent Novel Therapeutic Nanobody for the Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection. *Antimicrob Agents Ch* **2015**, *60*, (1), 6-13.
21. Stevens, M.; Rusch, S.; DeVincenzo, J.; Kim, Y. I.; Harrison, L.; Meals, E. A.; Boyers, A.; Fok-Seang, J.; Huntjens, D.; Lounis, N.; Mari, N. K.; Remmerie, B.; Roymans, D.; Koul, A.; Verloes, R., Antiviral Activity of Oral JNJ-53718678 in Healthy Adult Volunteers Challenged With Respiratory Syncytial Virus: A Placebo-Controlled Study. *J Infect Dis* **2018**, *218*, (5), 748-756.
22. Cockerill, G. S., JNJ-5371678, Defining a Role for Fusion Inhibitors in the Treatment of Respiratory Syncytial Virus. *J Med Chem* **2020**, *63*, (15), 8043-8045.
23. Stechmann, B.; Bai, S. K.; Gobbo, E.; Lopez, R.; Merer, G.; Pinchard, S.; Panigai, L.; Tenza, D.; Raposo, G.; Beaumelle, B.; Sauvaire, D.; Gillet, D.; Johannes, L.; Barbier, J., Inhibition of retrograde transport protects mice from lethal ricin challenge. *Cell* **2010**, *141*, (2), 231-42.
24. Nelson, C. D.; Carney, D. W.; Derdowski, A.; Lipovsky, A.; Gee, G. V.; O'Hara, B.; Williard, P.; DiMaio, D.; Sello, J. K.; Atwood, W. J., A retrograde trafficking inhibitor of ricin and Shiga-like toxins inhibits infection of cells by human and monkey polyomaviruses. *mBio* **2013**, *4*, (6), e00729-13.
25. Maru, S.; Jin, G.; Desai, D.; Amin, S.; Shwetank; Lauver, M. D.; Lukacher, A. E., Inhibition of Retrograde Transport Limits Polyomavirus Infection In Vivo. *mSphere* **2017**, *2*, (6).
26. Treasure, T.; Nelson, C. D. S., Inhibition of JC polyomavirus infectivity by the retrograde transport inhibitor Retro-2.1. *Microbiol Immunol* **2020**, *64*, (12), 783-791.
27. Nonnenmacher, M. E.; Cintrat, J. C.; Gillet, D.; Weber, T., Syntaxin 5-dependent retrograde transport to the trans-Golgi network is required for adeno-associated virus transduction. *J Virol* **2015**, *89*, (3), 1673-87.
28. Sivan, G.; Weisberg, A. S.; Americo, J. L.; Moss, B., Retrograde Transport from Early Endosomes to the trans-Golgi Network Enables Membrane Wrapping and Egress of Vaccinia Virus Virions. *J Virol* **2016**, *90*, (19), 8891-905.
29. Harrison, K.; Haga, I. R.; Pechenick Jowers, T.; Jasim, S.; Cintrat, J. C.; Gillet, D.; Schmitt-John, T.; Digard, P.; Beard, P. M., Vaccinia Virus Uses Retromer-Independent Cellular Retrograde Transport Pathways To Facilitate the Wrapping of Intracellular Mature Virions during Virus Morphogenesis. *J Virol* **2016**, *90*, (22), 10120-10132.
30. Shtanko, O.; Sakurai, Y.; Reyes, A. N.; Noel, R.; Cintrat, J. C.; Gillet, D.; Barbier, J.; Davey, R. A., Retro-2 and its dihydroquinazolinone derivatives inhibit filovirus infection. *Antiviral Res* **2018**, *149*, 154-163.
31. Holwerda, M.; V'Kovski, P.; Wider, M.; Thiel, V.; Dijkman, R., Identification of an Antiviral Compound from the Pandemic Response Box that Efficiently Inhibits SARS-CoV-2 Infection In Vitro. *Microorganisms* **2020**, *8*, (12).
32. Rameix-Welti, M. A.; Le Goffic, R.; Herve, P. L.; Sourimant, J.; Remot, A.; Riffault, S.; Yu, Q.; Galloux, M.; Gault, E.; Eleouet, J. F., Visualizing the replication of respiratory syncytial virus in cells and in living mice. *Nature communications* **2014**, *5*, 5104.
33. Gaillard, V.; Galloux, M.; Garcin, D.; Eleouet, J. F.; Le Goffic, R.; Larcher, T.; Rameix-Welti, M. A.; Boukadiri, A.; Heritier, J.; Segura, J. M.; Baechler, E.; Arrell, M.; Mottet-Osman, G.; Nyanguile, O., A Short Double-Stapled Peptide Inhibits Respiratory Syncytial Virus Entry and Spreading. *Antimicrob Agents Chemother* **2017**, *61*, (4).
34. Galloux, M.; Gsponer, N.; Gaillard, V.; Fenner, B.; Larcher, T.; Vilotte, M.; Riviere, J.; Richard, C. A.; Eleouet, J. F.; Le Goffic, R.; Mettier, J.; Nyanguile, O., Targeting the Respiratory Syncytial Virus N-0-P Complex with Constrained alpha-Helical Peptides in Cells and Mice. *Antimicrob Agents Ch* **2020**, *64*, (10).
35. McLellan, J. S.; Ray, W. C.; Peeples, M. E., Structure and function of respiratory syncytial virus surface glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol* **2013**, *372*, 83-104.
36. Oh-Hashi, K.; Furuta, E.; Fujimura, K.; Hirata, Y., Application of a novel HiBiT peptide tag for monitoring ATF4 protein expression in Neuro2a cells. *Biochem Biophys Rep* **2017**, *12*, 40-45.

37. Hendricks, D. A.; Baradaran, K.; McIntosh, K.; Patterson, J. L., Appearance of a soluble form of the G protein of respiratory syncytial virus in fluids of infected cells. *J Gen Virol* **1987**, 68 (Pt 6), 1705-14.
38. Bukreyev, A.; Yang, L.; Fricke, J.; Cheng, L.; Ward, J. M.; Murphy, B. R.; Collins, P. L., The secreted form of respiratory syncytial virus G glycoprotein helps the virus evade antibody-mediated restriction of replication by acting as an antigen decoy and through effects on Fc receptor-bearing leukocytes. *J Virol* **2008**, 82, (24), 12191-204.
39. Karron, R. A.; Buonagurio, D. A.; Georgiu, A. F.; Whitehead, S. S.; Adamus, J. E.; Clements-Mann, M. L.; Harris, D. O.; Randolph, V. B.; Udem, S. A.; Murphy, B. R.; Sidhu, M. S., Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, 94, (25), 13961-6.
40. Forrester, A.; Rathjen, S. J.; Daniela Garcia-Castillo, M.; Bachert, C.; Couhert, A.; Tepshi, L.; Pichard, S.; Martinez, J.; Munier, M.; Sierocki, R.; Renard, H. F.; Augusto Valades-Cruz, C.; Dingli, F.; Loew, D.; Lamaze, C.; Cintrat, J. C.; Linstedt, A. D.; Gillet, D.; Barbier, J.; Johannes, L., Functional dissection of the retrograde Shiga toxin trafficking inhibitor Retro-2. *Nat Chem Biol* **2020**, 16, (3), 327-336.
41. Miyazaki, K.; Wakana, Y.; Noda, C.; Arasaki, K.; Furuno, A.; Tagaya, M., Contribution of the long form of syntaxin 5 to the organization of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* **2012**, 125, (Pt 23), 5658-66.
42. Gupta, N.; Noel, R.; Goudet, A.; Hinsinger, K.; Michau, A.; Pons, V.; Abdelkafi, H.; Secher, T.; Shima, A.; Shtanko, O.; Sakurai, Y.; Cojean, S.; Pomel, S.; Lievin-Le Moal, V.; Leignel, V.; Herweg, J. A.; Fischer, A.; Johannes, L.; Harrison, K.; Beard, P. M.; Clayette, P.; Le Grand, R.; Rayner, J. O.; Rudel, T.; Vacus, J.; Loiseau, P. M.; Davey, R. A.; Oswald, E.; Cintrat, J. C.; Barbier, J.; Gillet, D., Inhibitors of retrograde trafficking active against ricin and Shiga toxins also protect cells from several viruses, Leishmania and Chlamydiales. *Chem Biol Interact* **2017**, 267, 96-103.
43. Dai, W.; Wu, Y.; Bi, J.; Lu, X.; Hou, A.; Zhou, Y.; Sun, B.; Kong, W.; Barbier, J.; Cintrat, J. C.; Gao, F.; Gillet, D.; Su, W.; Jiang, C., Antiviral effects of Retro-2(cycl) and Retro-2.1 against Enterovirus 71 in vitro and in vivo. *Antiviral Res* **2017**, 144, 311-321.
44. Dai, W.; Wu, Y.; Bi, J.; Wang, J.; Wang, S.; Kong, W.; Barbier, J.; Cintrat, J. C.; Gao, F.; Jiang, Z.; Gillet, D.; Su, W.; Jiang, C., Antiviral Effect of Retro-2.1 against Herpes Simplex Virus Type 2 In Vitro. *J Microbiol Biotechnol* **2018**, 28, (6), 849-859.
45. Vinck, R.; Nguyen, L. A.; Munier, M.; Caramelle, L.; Karpman, D.; Barbier, J.; Pruvost, A.; Cintrat, J. C.; Gillet, D., In Vivo Sustained Release of the Retrograde Transport Inhibitor Retro-2.1 Formulated in a Thermosensitive Hydrogel. *Int J Mol Sci* **2022**, 23, (23).
46. Hotard, A. L.; Shaikh, F. Y.; Lee, S.; Yan, D.; Teng, M. N.; Plemper, R. K.; Crowe, J. E., Jr.; Moore, M. L., A stabilized respiratory syncytial virus reverse genetics system amenable to recombination-mediated mutagenesis. *Virology* **2012**, 434, (1), 129-36.
47. Galloux, M.; Tarus, B.; Blazevic, I.; Fix, J.; Duquerroy, S.; Eleouet, J. F., Characterization of a viral phosphoprotein binding site on the surface of the respiratory syncytial nucleoprotein. *Journal of virology* **2012**, 86, (16), 8375-87.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Supplemental Materials

A new derivative of Retro-2 displays antiviral activity against Respiratory Syncytial Virus

Adrien Le Rouzic ^{1,2}, Jenna Fix ¹, Robin Vinck ^{2,3}, Sandrine Kappler-Gratias ⁴, Romain Volmer ⁵, Franck Gallardo ⁴, Jean-François Eléouët ¹, Mathilde Keck ², Jean-Christophe Cintrat ³, Julien Barbier ², Daniel Gillet ^{2,*}, Marie Galloux ^{1,*}

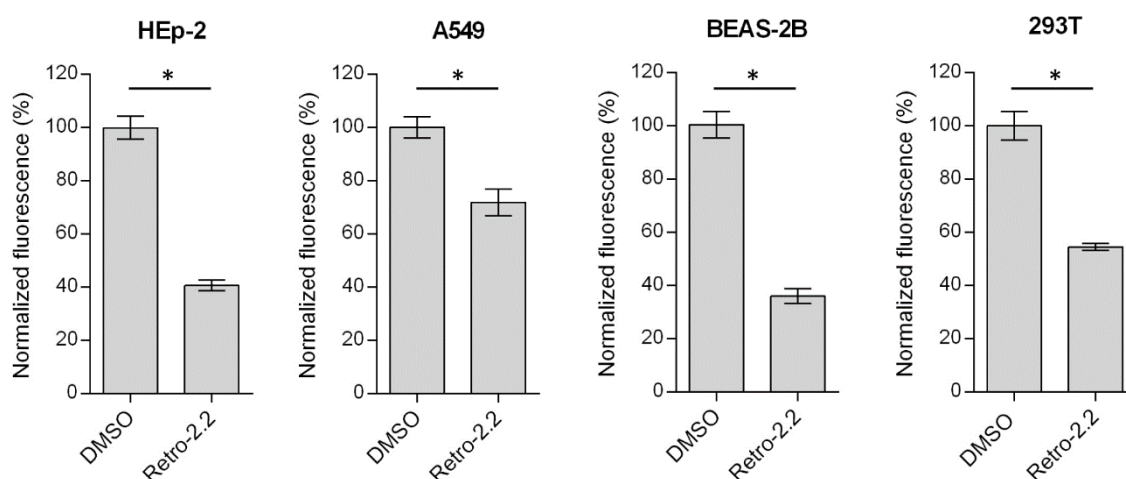


Figure S1: Antiviral activity of Retro-2.2 against hRSV infection on different cell lines. HEp-2, A549, BEAS-2B, and 293T cells were infected for 2 h with mCherry-rRSV at MOI 0.2. The medium was then changed to incubate cells in the absence (DMSO) or the presence of Retro-2.2 at 3 μ M for 48 h. The viral replication was quantified by measurement of the mCherry fluorescence. Data are means SEM from two independent experiments made in duplicates. *, $P < 0.05$.

3.3 UNE TECHNIQUE DE QUANTIFICATION DE LA TAILLE ET DU NOMBRE DE SYNCYTIA

Lors de l'observation au microscope des cultures cellulaires infectées et traitées par Retro-2.2, nous avons observé une forte perturbation de la formation des syncytia. En effet, Retro-2.2 provoque une diminution de la taille des syncytia formés au cours de l'infection par les cellules infectées par le VRS, et donc du nombre de cellules impliquées .

Dans le but d'apporter des informations supplémentaires sur l'activité de Retro-2.2, nous avons développé une méthode de quantification automatisée de la taille et du nombre de cellules infectées par le VRS. Cette méthode permet de mesurer la taille des syncytia, et de mettre en évidence un changement dans la dynamique de formation de ces syncytia.

3.3.1 Matériel et méthodes

Des cellules HEp-2, ont été infectées sur des plaques 96 puits en suivant le même protocole que celui décrit dans le chapitre 3.2 de ce manuscrit (voir matériels et méthodes) avec le virus recombinant VRS-mCherry présenté plus haut ([Figure 22](#)). Après 48 heures d'incubation, les cellules ont été rincées une fois au PBS, puis fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été rincées avec du PBS, et les noyaux des cellules marqués avec du Hoechst.

Sur chaque puits, six images ont été acquises à l'aide du lecteur Cytation 5 (BioTek) en mode imagerie, avec un objectif Olympus 4x, un filtre Texas Red de 590 nm pour le rouge (mCherry), et un filtre DAPI de 405 nm pour le bleu (noyaux) ([Figure 23](#)).

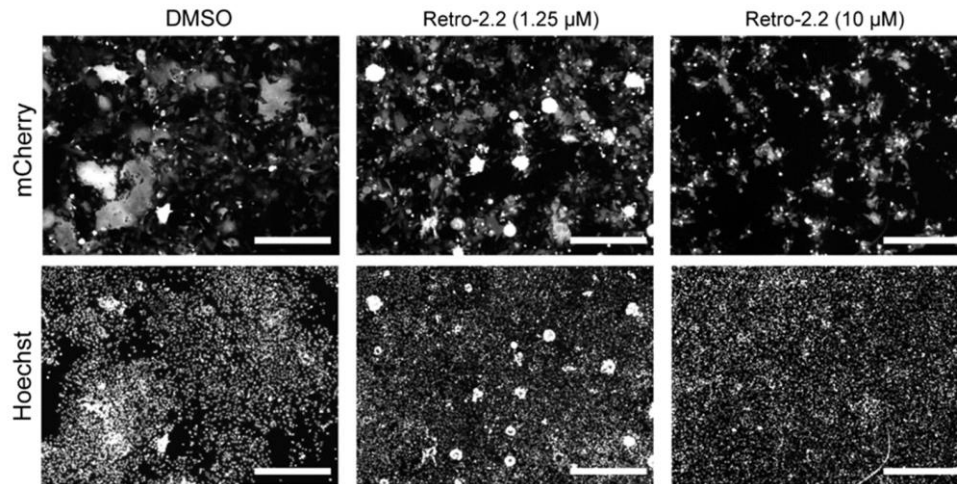


Figure 23 : Images des cellules infectées obtenues avec le Cytation 5. Des cellules HEp-2 ont été infectées pendant 2 heures avec le VRS-mCherry à une MOI de 0,2, puis le milieu est changé pour incuber les cellules avec différentes doses de Retro-2.2 ou du DMSO. Après 48 heures d'incubation, les cellules ont été fixées avec du PFA 4% et 6 images ont été prises dans chaque puits en utilisant un lecteur Cytation 5 en mode imagerie, à un grossissement de 4x. Barre d'échelle = 500 µm.

Compte-tenu du volume de données générées, il n'a pas été envisagé d'analyser manuellement chaque image. Pour répondre à cette problématique, nous avons automatisé cette étape en utilisant le logiciel CellProfiler (version 4.2.1 ; <https://cellprofiler.org>), un logiciel d'analyse d'image libre d'accès. Il permet notamment à travers l'application de différents filtres d'analyse de délimiter automatiquement des régions d'intérêt sur des images, ici les aires de fluorescence correspondant aux syncytia, et d'effectuer des mesures sur ces régions d'intérêt : quantification et numérotation, mesure de périmètre, de surface, etc... Le logiciel permet également d'effectuer des superpositions d'images.

Résumé simplement, la quantification repose sur les étapes suivantes :

I/ Chaque aire de fluorescence est isolée, son périmètre et sa surface sont mesurés (Cellprofiler, automatique).

II/ Le nombre de noyaux sous chaque aire de fluorescence est mesuré (Cellprofiler, automatique).

III/ les données numériques sont extraites du logiciel et importées dans Excel.

IV/ Les cellules individuelles ou en division sont éliminées des données (aires avec moins de 3 noyaux) (Excel, manuel)

V/ Les aires de fluorescence restantes (>3 noyaux) correspondent aux syncytia.

3.3.2 Résultats de la quantification

Grâce à ce protocole, nous avons pu visualiser les données en fonction de la dose de Retro-2.2, pour évaluer un effet du traitement sur la taille et le nombre de syncytia. L'infection peut induire la mort cellulaire, ce qui entraîne une diminution du nombre de noyaux sur les images, nous avons donc normalisé les données par le nombre de noyaux pour éliminer ce biais.

Nous observons une diminution significative de la taille des syncytia, reliée à la dose de Retro-2.2 (Figure 24). Cette diminution est dépendante de la dose, et l' EC_{50} lue graphiquement (6 μ M) est proche de l' EC_{50} calculée à partir de la courbe d'intensité de fluorescence des cellules fixées (4,8 μ M).

Il faut noter l'augmentation de l' EC_{50} mesurée grâce à cette nouvelle méthode de quantification par rapport à la mesure de fluorescence effectuée sur cellules (voir publication, chapitre 3.2 ; $EC_{50} = 1,6 \mu$ M). La quantification de la taille des syncytia permet de mesurer l'effet du traitement sur ce phénomène précis, mais ne prend pas en compte l'effet du traitement sur d'autres étapes du cycle viral qui peuvent être inhibés et induire une diminution du signal luminescent.

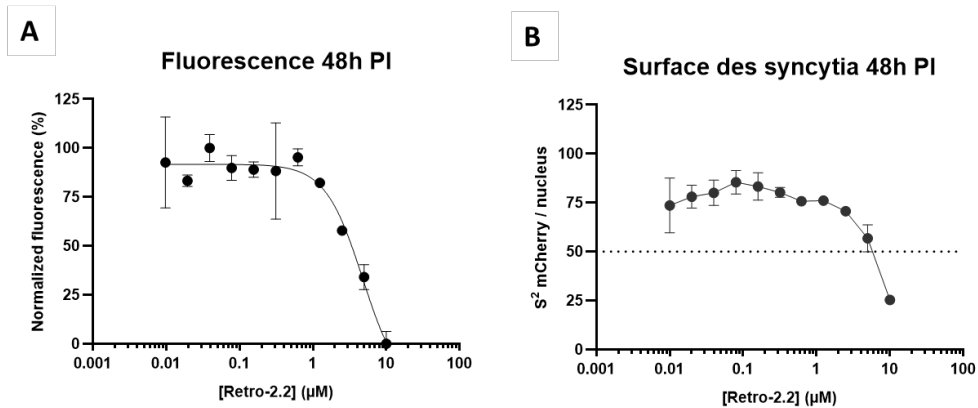


Figure 24 : Quantification de la surface des syncytia. **(A)** Quantification de la réplication virale, en fonction de la dose de Retro-2.2, par mesure de l'intensité de fluorescence de la mCherry. $EC_{50} = 4,8 \mu\text{M}$. **(B)** Quantification de la taille des syncytia en fonction de la dose de Retro-2.2. Par lecture graphique, $EC_{50} = 6 \mu\text{M}$. Les courbes **(A)** et **(B)** ont été obtenues à partir des mêmes puits de plaque 96 puits. Les données sont représentées sous la forme de moyenne \pm SD d'une expérience réalisée en dupliquas. Chaque répliqua de **(B)** correspond à la moyenne sur les 6 images du puits correspondant.

En résumé, cette nouvelle méthode de quantification pas apporté d'information supplémentaire sur l'activité de Retro-2.2 par rapport à la quantification de fluorescence, qui est plus simple à mettre en place. La spécificité de notre nouvelle méthode pour le mécanisme de formation des syncytia pourrait s'avérer utile dans de futures expériences d'inhibition portant sur cette étape du cycle viral en particulier.

3.4 DISCUSSION

En complément des vaccins récemment commercialisés, la recherche de molécules antivirales reste une nécessité pour traiter les infections par le VRS. Malgré les efforts conséquents de l'industrie pharmaceutique pour développer de nouveaux antiviraux, l'apparition de mutants d'échappement reste problématique. La mise en place de nouvelles stratégies de traitement, comme l'inhibition de processus cellulaires, sont une alternative intéressante aux molécules qui ciblent directement des protéines virales comme F ou L.

Retro-2.2 est un dérivé optimisé du composé Retro-2.1 et de la molécule initiale Retro-2. Ces composés présentent une activité contre les toxines bactériennes qui exploitent les voies de transport rétrograde (Stechmann *et al.*, 2010), et Retro-2.2, issu de l'optimisation de ces molécules présente une activité deux fois plus élevée que Retro-2.1 contre ces toxines (données non publiées). Dans notre étude, nous avons par conséquent évalué l'activité du composé Retro-2.2 contre l'infection au VRS *in vitro*.

La molécule Retro-2.2 inhibe l'infection par le VRS en culture cellulaire avec une EC_{50} de 1,6 μ M. Nous avons également observé un effet cytotoxique du composé à faible dose ($CC_{50} = 15 \mu$ M). L'indice de sélectivité (IS) de Retro-2.2 est donc d'environ 10, ce qui est inattendu car très inférieur à l'IS calculé pour Retro-2.1 lors d'études précédentes (Dai *et al.*, 2017 ; Dai *et al.*, 2018). L'IS d'une molécule est un indicateur très important lors du développement thérapeutique puisqu'un IS élevé permet d'envisager le développement d'un traitement efficace sans effet adverse. Il sera par conséquent nécessaire de caractériser l'origine de cette toxicité afin d'envisager l'amélioration de la molécule.

Nous n'avons pas observé d'effet direct de Retro-2.2 sur la particule virale, ou sur les étapes précoces de l'infection et la formation des corps d'inclusion cytoplasmiques. En revanche, nous avons pu montrer que le traitement par Retro-2.2 induit un défaut de formation des nouvelles particules virales, associé à un défaut de la formation de syncytia liés à l'infection. Ces données suggèrent une action du composé sur les étapes tardives de l'infection, principalement sur la fonction de la protéine F du virus qui médie la formation des syncytia en culture cellulaire.

Afin de caractériser cet effet, et en particulier l'impact de Retro-2.2 sur l'adressage de F, mais également de la protéine G à la membrane plasmique, nous avons choisi d'étudier l'impact du traitement sur l'expression de protéines chimériques

fluorescentes, associées au peptide luminescent HiBit, en fusion avec des séquences d'adressage des protéines F et G. Cette approche nous a permis de mettre en évidence un défaut dans la localisation de ces deux protéines sous l'action de Retro-2.2 (Figure 25).

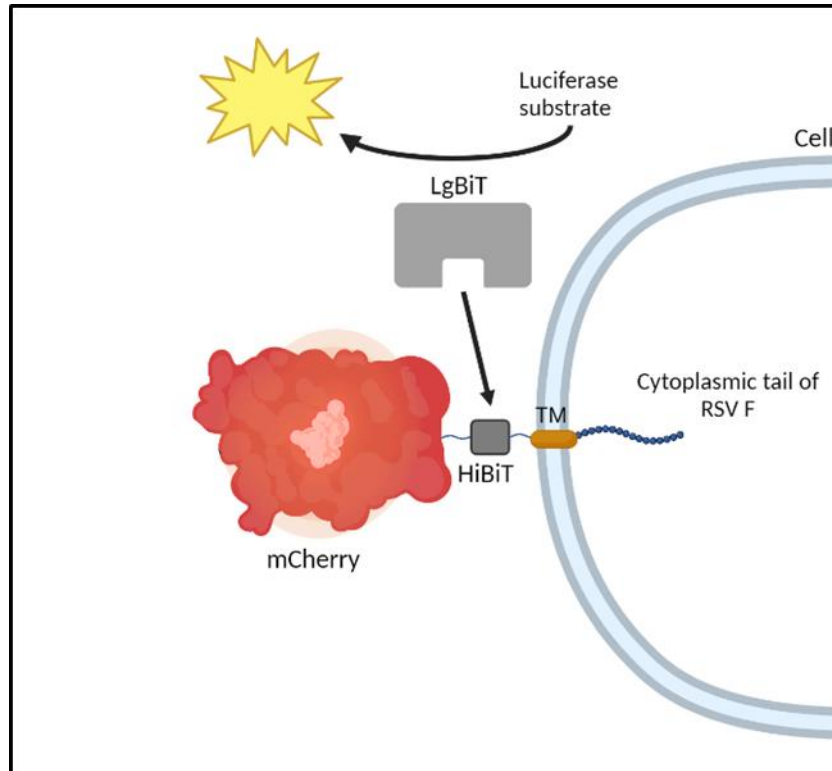


Figure 25 : Schéma simplifié de l'approche utilisant le peptide HiBit pour la quantification de l'expression de la protéine F à la membrane plasmique. La séquence du peptide HiBit (11 acides aminés correspondant au petit domaine de la split nano luciférase, encadré gris foncé) et celle de la protéine mCherry ont été exprimées en fusion entre la séquence N-terminale de F d'adressage à la membrane plasmique, et celle du domaine transmembranaire et C-terminal de F (voir publication, partie 3.2). La présence de cette protéine chimérique à la membrane plasmique a été quantifiée par ajout dans le milieu extracellulaire de la protéine LgBiT (grande sous-unité de la split nano-luciférase) et du substrat, suivi d'une mesure du signal luminescent.

Les tentatives d'identification du site de rétention intracellulaire de ces protéines, par des approches de co-marquages avec des protéines du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi ou des endosomes, n'ont toutefois pas permis d'identifier de site de relocalisation de F et G lors du traitement par Retro-2.2. En effet, si la protéine F du VRS est relocalisée sous l'action de Retro-2.2 et est moins présente à la membrane plasmique ([Figure 26A](#)), nos données montrent que F ne semble pas relocalisée dans l'appareil de Golgi ([Figure 26B](#)), le RE (marquage anti-Sec16A, anti-Protéine Disulfure Isomérase (PDI), données non présentées) ou les endosomes (marquage anti-EEA1, données non présentées) sous l'effet du traitement. D'autre part, nous ne pouvons pas exclure que ce défaut d'adressage ne soit pas également associé à un défaut de maturation des protéines F et G.

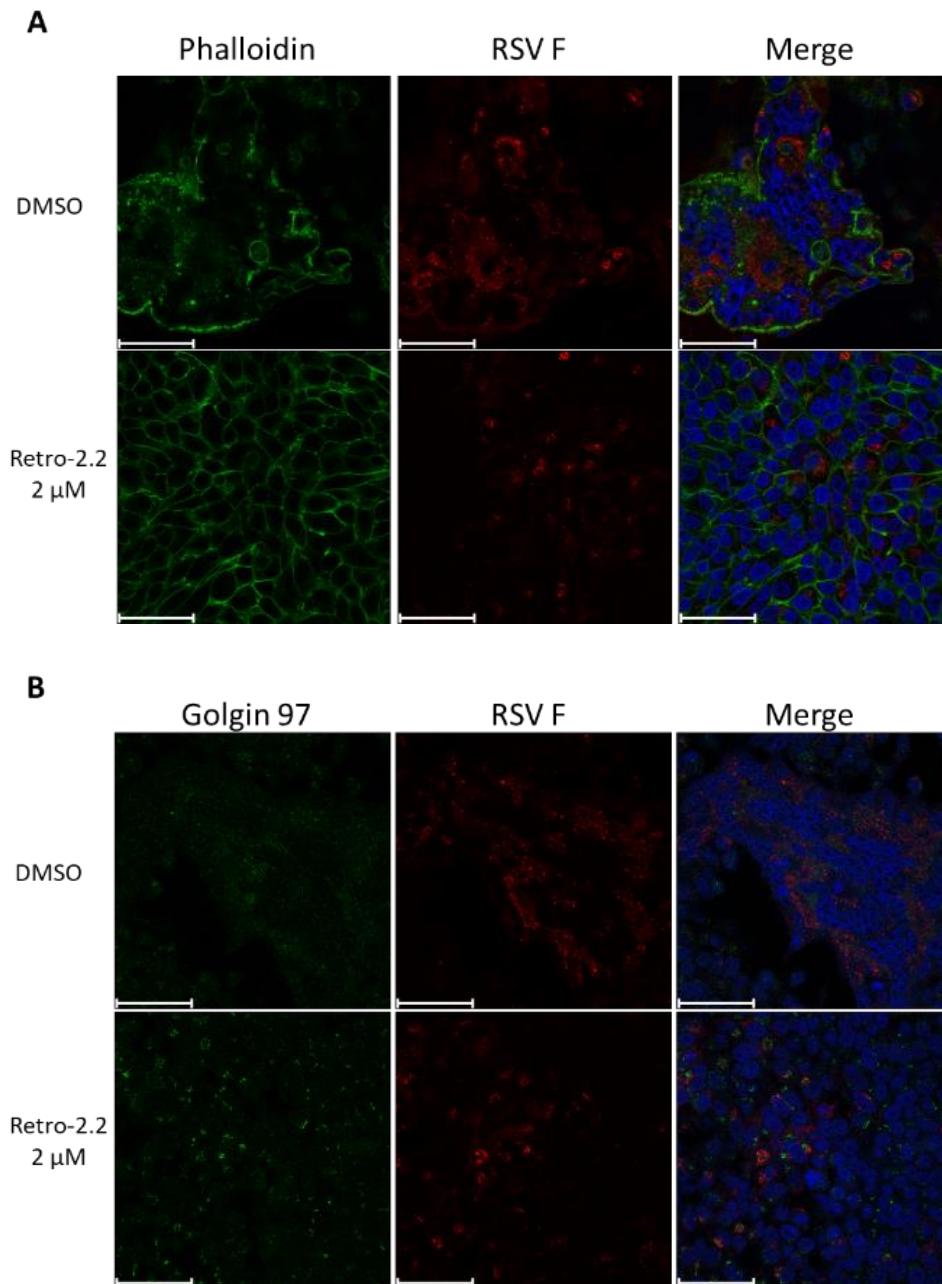


Figure 26 : Localisation de la protéine F du VRS dans les cellules infectées. Des cellules HEp-2 ont été infectées avec le rVRS-Luc pendant deux heures, puis le milieu a été changé pour incuber les cellules avec du DMSO ou le composé Retro-2.2 à une concentration de 2 μ M pendant 48 heures. Les cellules ont ensuite été fixées avec du PFA 4% et marquées avec différents anticorps . **(A)** Les cellules sont marquées avec un anticorps monoclonal anti-F (G.Taylor, rouge), de la phalloïdine (Abcam, vert) et du Hoeshcht (Invitrogen, bleu) **(B)** Les cellules sont marquées avec un anticorps monoclonal anti-F (G.Taylor, rouge), un anticorps anti-GM130 (Abcam, vert) et du Hoeshcht (Invitrogen, bleu). Barre d'échelle = 50 μ m.

En parallèle, j'ai pu montrer que la déplétion de l'expression des protéines Sec16a et Syn-5, cibles décrites du composé Retro-2, reproduit l'inhibition de l'infection et de formation des syncytia observées suite au traitement par Retro-2.2. Nous n'avons cependant pas réussi à valider par Western blot la déplétion de Sec16a (>250 kDa). Afin de valider l'efficacité du siRNA, une méthode de validation alternative serait de quantifier les ARNm codant pour Sec16a par RT-qPCR.

Toutefois, ces données suggèrent que le mécanisme à l'œuvre dans l'inhibition de l'infection au VRS par Retro-2.2 dépend de son activité directe sur la protéine Sec16a et/ou indirecte sur Syn-5. Ces observations suggèrent également une potentielle implication, non décrite à ce jour, de ces protéines cellulaires dans les étapes tardives du cycle du VRS. Afin de compléter ces données, l'étude de l'impact cumulé de la déplétion de Sec16a ou Syn-5 et du traitement par Retro-2.2 sur la réplication du VRS seraient nécessaires.

En conclusion, si nos données mettent en évidence une activité antivirale de Retro-2-2, caractérisée par un défaut d'adressage des protéines F et G à la membrane plasmique, des expériences complémentaires seront nécessaires pour consolider ces résultats. Plus spécifiquement, il serait nécessaire d'évaluer l'impact de traitement par Retro-2.2 sur l'adressage à la membrane plasmique de protéines cellulaires. Ces données devraient permettre de déterminer la spécificité d'action de cette molécule envers le VRS, et de potentiellement mieux comprendre la toxicité associée au traitement.

Dans la continuité de ces travaux, il serait important d'évaluer l'effet de Retro-2.2 contre l'infection au VRS sur des cultures primaires de cellules épithéliales. En effet, même si les cultures de cellules immortalisées constituent un modèle d'étude valable, l'utilisation de cultures primaires permettrait d'obtenir une vision plus représentative de l'effet physiologique du composé sur les cellules.

4 ACTIVITE ANTIVIRALE *IN VIVO*

Le développement pré-clinique d'un médicament rassemble l'ensemble des études visant à déterminer ses propriétés physiques, chimiques, pharmacodynamiques, pharmacocinétiques et toxicologiques. Ce processus commence en général par des expériences *in vitro*, en culture cellulaire, qui permettent d'évaluer l'activité du composé, son mécanisme, et également de mettre en évidence une éventuelle toxicité. Ces travaux ont été présentés dans la partie I des résultats.

En parallèle, des expériences *in vivo* sont réalisées afin de déterminer le devenir du médicament dans l'organisme. Plus spécifiquement, ces études visent à déterminer les paramètres d'ADME (Absorption, Distribution, Métabolisation et Excrétion) de la molécule dans l'organisme, ainsi que les potentiels métabolites dérivés, et la potentielle toxicité du composé. Ces études permettent de vérifier que la molécule est bien distribuée dans le ou les organe(s) où elle devra exercer son activité (les voies respiratoires pour le cas du VRS), et de déterminer la dose à administrer pour atteindre une concentration dans les organes permettant d'observer un effet inhibiteur, sans toxicité associée.

Au cours de ma thèse, ces expériences ont été réalisées par les équipes de Julien Barbier et de Mathilde Keck au CEA, dans un modèle d'administration de Retro-2.2 chez la souris Balb/c.

Dans les paragraphes suivants sont présentés les résultats obtenus pour le composé Retro-2.2, issus de la thèse de Lucie Caramelle (Caramelle, 2023) et de données non publiées que j'ai obtenues au court de ma thèse. Ces données permettent de justifier le protocole décrit dans le chapitre 4.4 de ce manuscrit.

4.1 PHARMACOCINETIQUE DE RETRO-2.2

Les composés de la famille Retro-2 sont très hydrophobes, restreignant les modes et voies d'administration lors des expériences chez l'animal.

Dans un premier temps il a par conséquent fallu déterminer la meilleure formulation pour l'administration du composé. La société Drugabilis a mesuré la solubilité du composé Retro-2.2 dans quatre huiles végétales différentes. La solubilité est plus élevée dans le lipiodol (1,7 mg/mL) et l'huile de ricin (1,9 mg/mL) que dans l'huile d'arachide ou de soja (Figure 27). Le lipiodol est une préparation d'huile d'œillette iodée utilisée comme produit de contraste et constituant une huile très fluide.

Type d'huile	Solubilité de Retro-2.2 (mg/mL)
Huile de ricin	1,9
Huile d'arachide	0,35
Huile de soja	0,40
Lipiodol	1,7

Figure 27 : Solubilité de Retro-2.2 dans différentes huiles. Valeurs mesurées après équilibration à 20°C pendant 24 heures (Drugabilis). Figure adaptée d'après Caramelle (2023).

A partir de ces résultats, trois formulations ont été évaluées. Une formulation de Lipiodol à 100%, qui présentait une viscosité très faible, empêchant la rétention du produit après injection sous-cutanée, a été abandonnée. Pour augmenter la viscosité de la formulation de manière à améliorer la rétention sous-cutanée de celle-ci après injection, une formulation à 30 % de Lipiodol et 70 % d'huile de ricin (formulation LR) a été testée, ainsi qu'une formulation à 3 % de DMSO, 29 % de Lipiodol et 68 % d'huile de ricin (formulation DLR). L'ajout de DMSO réduit fortement la formation de micro cristaux observée dans la formulation LR (Caramelle, 2023).

Partant de ces résultats, l'administration de Retro-2.2 par voie sous-cutanée (SC), a été testée chez la souris. A noter qu'une phase d'absorption a été prise en considération dans le calcul des paramètres pharmacocinétiques, normalement calculés à partir d'une administration par voie intraveineuse (IV) qui n'induit pas de phase d'absorption. En effet, l'injection IV d'une formulation huileuse n'est pas possible.

La quantification des composés dans le plasma a été réalisée par LC-MSMS (Caramelle, 2023). Les paramètres pharmacocinétiques ont été calculés à partir des mesures de concentration plasmatique au cours du temps grâce à l'extension d'Excel PKSolver.297. Une cinétique de distribution non-compartimentale extravasculaire, qui émet l'hypothèse que l'ensemble des tissus forme un seul groupe d'espace de distribution cinétiquement homogène, a été utilisée.

Une seconde série d'expériences a alors été réalisée afin de déterminer les paramètres pharmacocinétiques de Retro-2.2 administré par voie SC. La molécule a été administrée à 4 groupes de 9 souris Balb/c en une fois (Administration aigue) à une dose de 33 mg/kg dans différents volumes et formulation : 100 μ L dans DLR, 100 μ L dans LR, 50 μ L dans LR ou 200 μ L dans Lipiodol seul (Figure 28). Des prélèvements sanguins ont été effectués à T = 1h, 2h, 4h, 6h, 8h et 24h sur 3 souris différentes par groupe à chaque temps pendant 24 heures pour effectuer la mesure de la concentration plasmatique en Retro-2.2.

Les données obtenues ont mis en évidence que l'ajout de DMSO dans la formulation permet de doubler la concentration plasmatique maximale de Retro-2.2 (1,3 μ M contre 0,7 μ M) (Figure 28). Ce changement permet notamment d'atteindre une concentration plasmatique de Retro-2.2 équivalente à l'EC₅₀ contre le VRS en culture cellulaire.

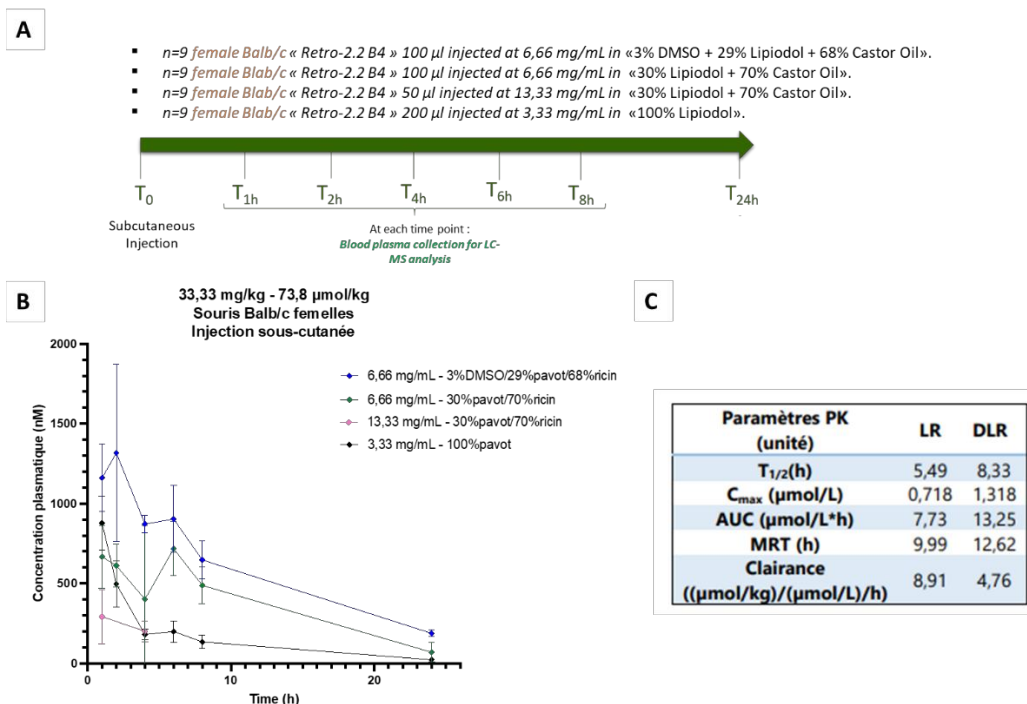


Figure 28 : Concentration plasmatique et paramètres pharmacocinétiques obtenus pour le composé Retro-2.2 administré en SC chez la souris selon différentes formulations. **(A)** Protocole d'administration de Retro-2.2. Le composé a été administré à des souris Balb/c femelles en une fois à une dose de 33,3 mg/kg (73,8 µmol/kg) par injection SC de différentes formulations de Retro-2.2. Des prélèvements sanguins ont été réalisés à t=1 ; 2 ; 4 ; 6 ; 8 et 24 heures sur 3 souris différentes à chaque temps. **(B)** Courbes des concentrations plasmatiques du composé Retro-2.2 en fonction de la formulation administrée. Les concentrations plasmatiques ont été obtenues par quantification par LC-MSMS après extraction des plasmas. Les analyses LC-MSMS ont été réalisées en duplicatas. **(C)** Paramètres pharmacocinétiques obtenus pour le composé Retro-2.2 dans les formulations LR et DLR à 6,66 mg/mL. Les paramètres pharmacocinétiques ont été calculés avec PKSolver. T_{1/2} : demi-vie, C_{max} : concentration plasmatique maximale, AUC : aire sous la courbe, MRT : temps de résidence moyen.

Ces paramètres pharmacocinétiques ont fait l'objet d'une modélisation, afin de simuler l'effet d'une administration répétée du composé sur la concentration plasmatique de Retro-2.2. Cette modélisation a été effectuée par Alain Pruvost au CEA. Cette simulation suggère que deux administrations de composé par jour, espacées de 6 heures, permettraient de maintenir une concentration plasmatique de composé suffisante pour exercer son activité (Figure 29).

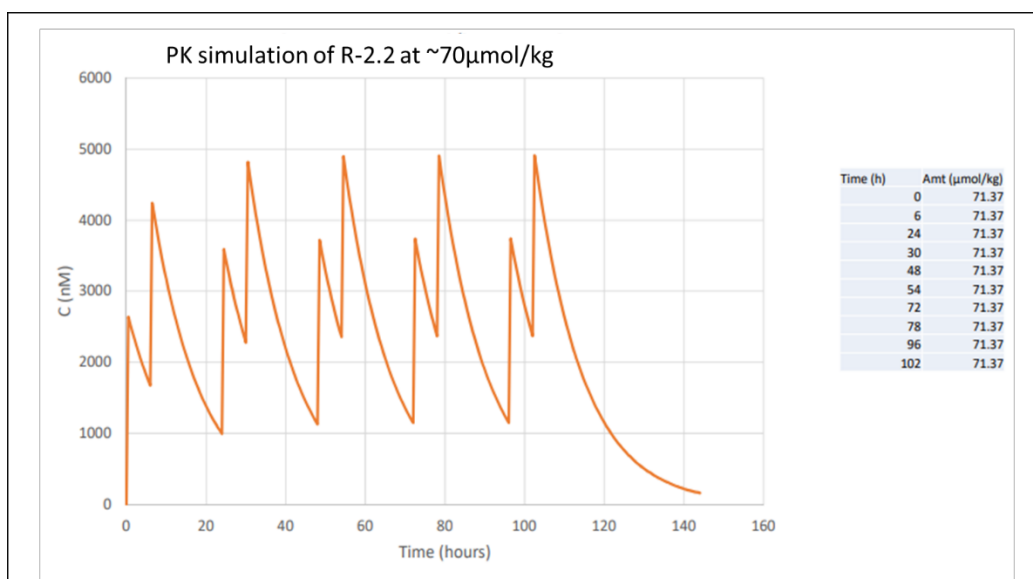


Figure 29 : Simulation d'administration répétée de Retro-2.2. Données modélisées à partir des résultats de PK obtenus sur Retro-2.2 à 6,66mg/mL de composé dans la formulation DLR (voir figure 27).

L'ensemble des données présentées dans ce chapitre ont permis de déterminer la formulation et la fréquence d'administration à utiliser pour la suite de l'étude. La Formulation DLR (DMSO 3 % ; Lipiodol 29 % ; huile de ricin 68 %) a été administrée à une fréquence de deux administrations par jour pour les expériences présentées dans les chapitres qui suivent.

4.2 ÉVALUATION DE LA TOXICITE DE RETRO-2.2 CHEZ LA SOURIS

Une première expérience a été conduite afin d'évaluer la potentielle toxicité du composé à différentes doses chez la souris, sur une durée de traitement de quatre jours, correspondant à la durée de traitements antiviraux réalisés en routine.

4.2.1.1 Matériel et méthode

Pour cette expérience, 4 groupes de 2 souris ont reçu soit le traitement soit le véhicule seul (la formulation sans la molécule active). Différentes doses ont été testées : 1 mg/kg, 3 mg/kg et 10 mg/kg (Figure 30).

L'administration SC du composé dans sa formulation DLR est délicate en raison de la viscosité importante de la solution. Pour faciliter l'administration, les souris ont été anesthésiées par isoflurane à chaque administration.

Chaque souris a reçu deux administrations par jour, espacées de 6 heures, pendant 4 jours par voie SC (Figure 30). Un suivi quotidien du poids des animaux a été réalisé, et les souris étaient observées après l'administration afin de rechercher de potentiels signes cliniques de douleur (poils hérissés, dos courbé, yeux plissés, ...). A J4, les souris ont été anesthésiées par injection intra-péritonéale de mélange kétamine/xylazine avant prélèvement de 200-400 µL de sang par voie rétro-orbitale en un seul geste. Au terme de l'expérience, les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale et différents organes (poumons, rate, foie et reins) ont été prélevés. L'ensemble de ces prélèvements avaient pour objectif de doser certains paramètres protéiques dans le sang des souris pour détecter une éventuelle toxicité du composé, et d'effectuer des analyses histologiques sur les organes prélevés en cas de toxicité détectée.

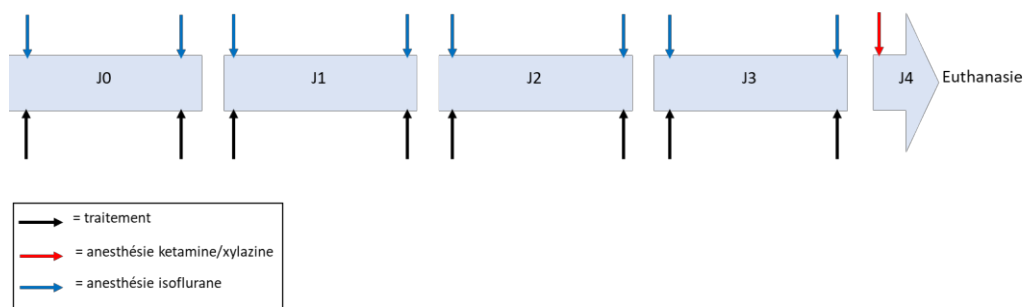


Figure 30 : Protocole d'expérimentation pour l'évaluation de la toxicité *in vivo* de Retro-2.2. Le composé a été administré par voie SC dans la formulation DLR, à raison de deux administrations/jour espacées de 6 heures. A chaque administration du composé, les souris ont été anesthésiées par isoflurane. A J4, les souris ont été anesthésiées par injection de kétamine/xylazine, suivi d'un prélèvement de sang en rétro-orbitaire, puis euthanasiées par dislocation cervicale afin de prélever différents organes.

4.2.1.2 Résultats

Lors de l'administration chronique du composé Retro-2.2, nous n'avons pas observé de signe clinique de douleur chez les souris. Le suivi du poids des animaux sur la durée du traitement a permis de montrer que les animaux ne perdent pas de poids suite au traitement quelle que soit la dose de composé administré (Figure 31).

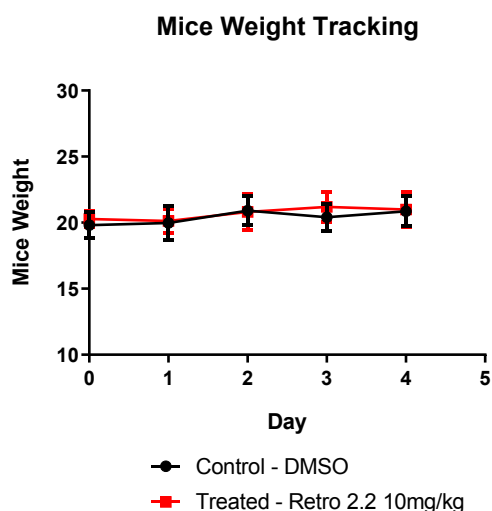


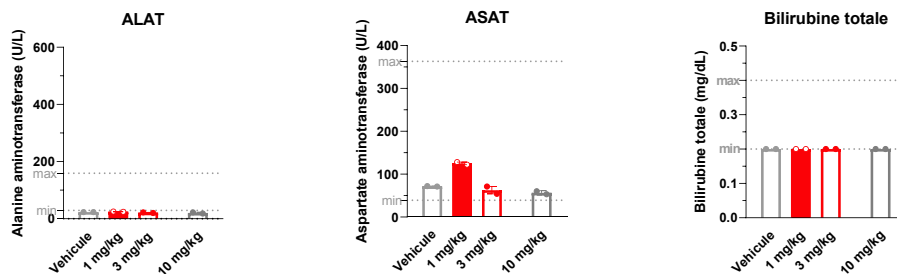
Figure 31 : L'administration répétée de Retro-2.2 ne provoque pas de perte de poids. Les souris ont reçu deux injections par jour de : véhicule seul, ou 1mg/kg, 3mg/kg et 10mg/kg de composé Retro-2.2 pendant 4 jours par voie SC dans la formulation DLR. Les données du groupe 1 mg/kg et 3 mg/kg ne sont pas représentées.

En fin d'expérience, les échantillons de sang prélevés ont été centrifugés et le plasma collecté (surnageant). 100 µL de plasma a été déposé sur un disque de type AmLyte 13 (Abaxis). Le dosage de différents paramètres biochimiques (calcium, potassium, sodium, créatine kinase, glucose, amylase, créatinine, albumine, azote uréique sanguin, bilirubine totale, aspartate aminotransférase (ASAT) et alanine aminotransférase (ALAT)) a été réalisé sur un Piccolo Xpress (Abaxis).

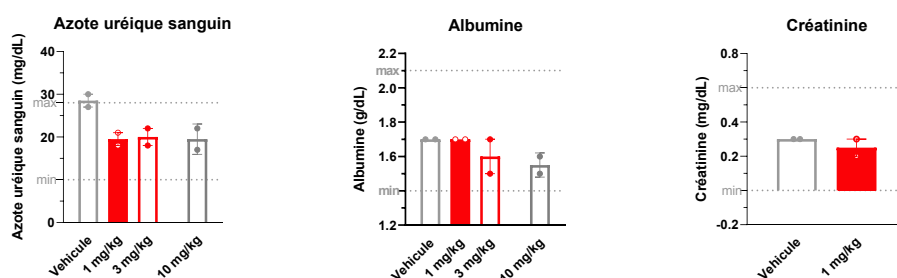
Les données obtenues n'ont pas mis en évidence de modifications significatives de la plupart des paramètres biochimiques sanguins après quatre jours de traitement, indiquant que le composé n'induit pas de toxicité majeure aux trois doses testées (1 mg/kg, 3 mg/kg et 10 mg/kg) (Figure 32). Nous avons cependant observé une diminution de l'azote uréique sanguin dans les trois conditions (de 30 à 20 mg /dL), une augmentation de l'ALAT et de la créatine kinase pour les souris du groupe 1 mg/kg, et une légère diminution du sodium et du potassium pour les groupes 3 et 10 mg/kg.

En résumé, le traitement des souris par Retro-2.2 pendant 4 jours ne provoque pas de toxicité détectable.

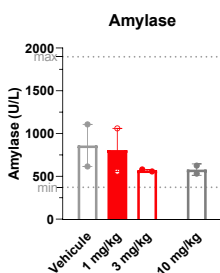
Paramètres hépatiques



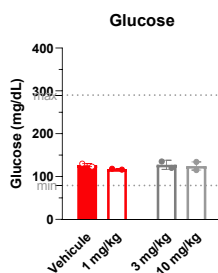
Paramètres rénaux



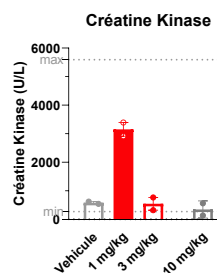
Paramètre pancréatique



Paramètre métabolique



Paramètre musculaire



Electrolytes

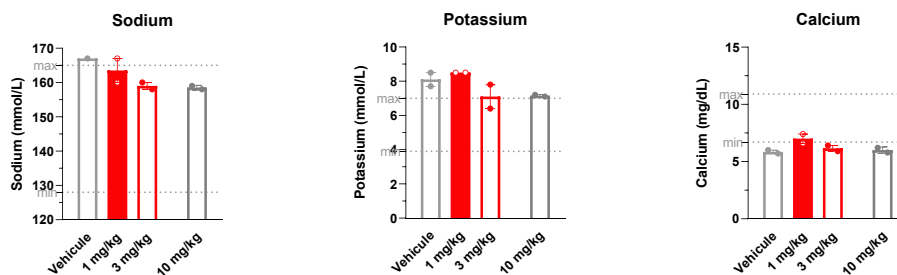


Figure 32 : L'administration chronique de Retro-2.2 ne provoque pas de changements majeurs des paramètres biochimiques sanguins. Les souris ont reçu deux injections par jour de : véhicule seul, 1mg/kg, 3mg/kg ou 10mg/kg de composé Retro-2.2 pendant 4 jours par voie SC dans la formulation DLR. Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne \pm SEM (n=2), Test de Kruskal-Wallis et test de Dunn, non significatif pour tous les paramètres.

4.3 TESTS D'ACTIVITE ANTIVIRALE DE RETRO-2.2 *IN VIVO* EN MODELE MURIN

4.3.1 Principe des expériences *in vivo* sur le VRS

Partant des données présentées ci-dessus, nous avons cherché à tester l'activité antivirale de Retro-2.2 contre le VRS *in vivo*, en modèle murin.

Le protocole expérimental suivi repose sur l'infection, par instillation intranasale, de souris femelles Balb/c de 8 semaines de vie avec un virus recombinant exprimant le gène rapporteur Luciférase (voir [Figure 22](#), chapitre 3.1).

En effet, l'infection par ce virus permet de suivre l'évolution quotidienne de l'infection chez un même animal, en utilisant un appareil d'imagerie corps entier IVIS (Xenogen Corp.). Notons que ce suivi journalier sur animal entier ne peut être réalisé que sur des animaux dont le pelage et la peau permettent la diffusion de la lumière, telles que des souris Balb/c. Brièvement, suivant le protocole publié (Rameix-Welti *et al.*, 2014), les souris sont anesthésiées et le substrat de la luciférase est instillé par voie intranasale (D-Luciferine, 50 μ L, Sigma). Après 5 minutes d'incubation, l'émission de photons est mesurée par imagerie, et les résultats sont visualisés et interprétés en utilisant un logiciel adapté (Living Image software, version 4.0, Caliper Life Sciences). Les photons sont comptés dans une région d'intérêt de l'image définie par l'utilisateur. Ici, la région d'intérêt correspond au museau (cavité nasale) et au tronc de la souris (bronches et poumons) ([Figure 33A](#)). La quantification de réplication du VRS par luminescence reflète les résultats obtenus par quantification de la réplication dans les poumons par RT-qPCR ([Figure 33C](#)).

Il est ici important de mentionner que l'infection par le VRS d'induit pas de symptômes chez la souris. D'autre part, en fonction du fond génétique des animaux, la cinétique d'infection varie. Dans le cas de de souris Balb/c, l'infection persiste 7 à 10 jours, avec un pic d'infection entre 3 et 5 jours post-infection ([Figure 33](#)).

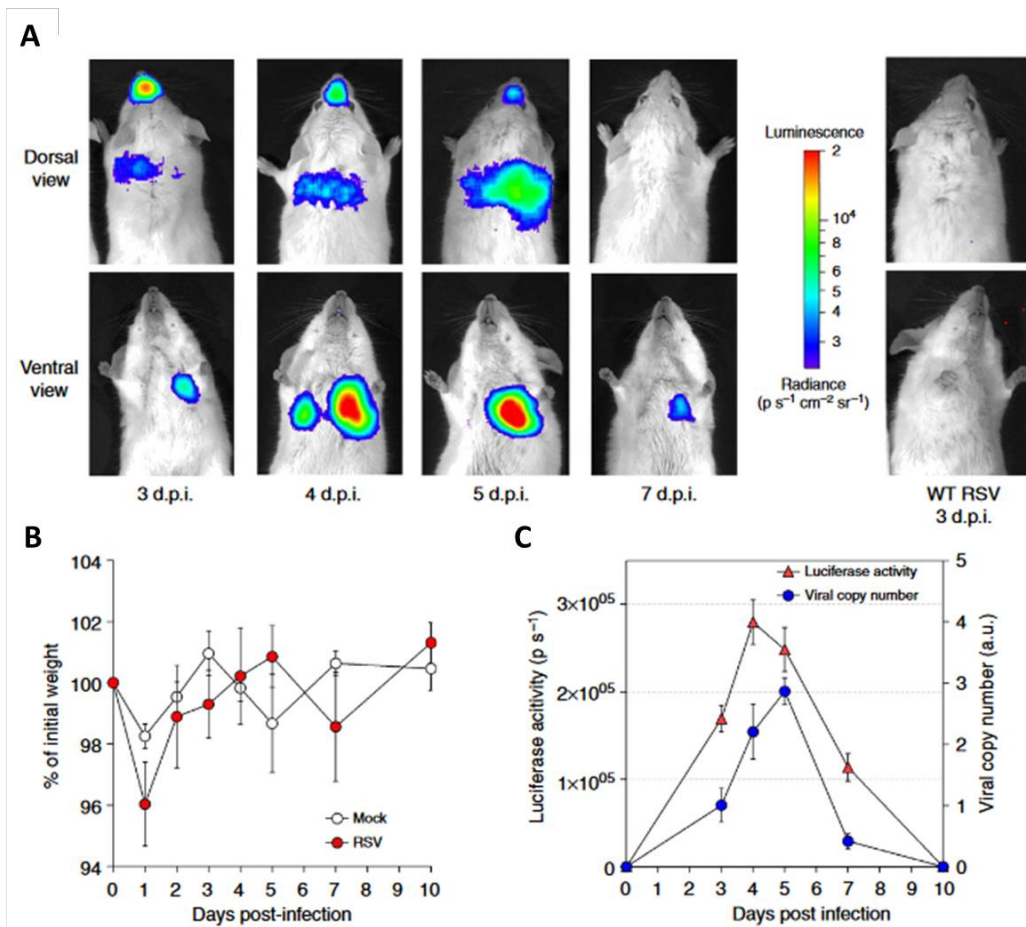


Figure 33 : Suivi de réplication du VRS par luminescence *in vivo* de souris infectées avec le VRS-Luc. **(A)** Images de souris infectées avec les virus VRS-Luc. Des souris Balb/c ont été infectées à J0 avec le VRSLuc ($5 \cdot 10^4$ plaque forming units (p.f.u) par souris). Les niveaux de bioluminescence ont été mesurés tous les jours en utilisant le système IVIS, après injection intranasale de 50 μ L de D-luciferin (200nM). L'échelle colorée indique les niveaux de radiance (somme des photons émis par seconde dans chaque pixel de la région d'intérêt ($\text{ps}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sr}^{-1}$)). La souris de droite a été infectée avec le VRS sauvage (wild-type, WT). **(B)** Suivi du poids des animaux au cours de l'infection. Les souris infectées avec le virus sauvage ou le VRS-Luc ont été pesées quotidiennement. **(C)** Comparaison du suivi de réplication du VRS *in vivo* chez la souris Balb/c, par quantification de luminescence ou par RT-qPCR sur lysats de poumons de souris infectées. Figure adaptée d'après (Rameix-Welti *et al.*, 2014).

4.3.2 Challenge *in vivo* contre le VRS

Suivant le protocole d'infection par le VRS *in vivo* chez la souris, présenté ci-dessus, et partant des données de formulation présentées, nous avons mis au point un protocole expérimental afin d'évaluer l'activité de Retro-2.2 contre l'infection par le VRS chez la souris (Figure 34). Deux groupes de huit souris femelles Balb/c de 8 semaines de vie ont été considérés : infectées et traitées avec la solution contrôle (formulation DLR sans le composé), ou infectées et traitées avec des doses de 10 mg/kg de Retro-2.2 dans la formulation DLR par injection. A J0, les souris ont été pesées, anesthésiées par injection intra-péritonéale de kétamine/xylazine, puis ont été traitées par injection SC avec une dose de 10 mg/kg de Retro-2.2, et infectées par instillation intranasale de 50 μ l de virus VRS-Luc (5.10^4 p.f.u) par souris. Six heures post-infection, les souris ont été anesthésiées par isoflurane et une seconde dose de composé a été administré en SC. Les souris ont été pesées quotidiennement et traitées deux fois par jour, à six heures d'intervalle.

Lors des mesures de luminescence à l'IVIS à J2 et J4 post-infection, les souris ont été anesthésiées avec de la kétamine/xylazine, le substrat de luminescence (50 μ l) a été instillé par voie intranasale, et la luminescence mesurée sur les animaux positionnés dans l'IVIS. Le traitement a été administré immédiatement après la sortie des animaux de l'IVIS.

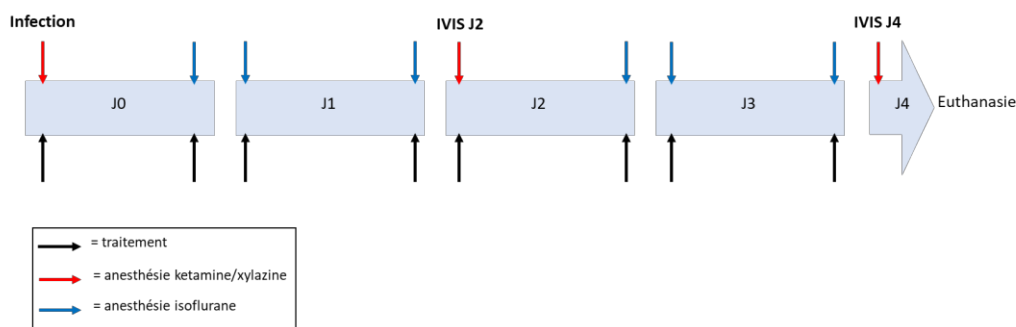


Figure 34 : Protocole expérimental visant à évaluer de l'activité antivirale *in vivo* de Retro-2.2 contre le VRS. Une dose de 10 mg/kg de composé a été administrée par voie SC dans la formulation DLR, à raison de deux administrations/jour espacées de 6 heures. A chaque administration du composé, les souris ont été anesthésiées par isoflurane, ou kétamine/xylazine si le traitement suivait la mesure de luminescence (J2 et J4).

Au cours de cette expérience, aucune souffrance ou perte de poids n'a été observée chez les animaux traités. Toutefois, dans les conditions testées, le composé Retro-2.2 n'a pas induit de diminution significative de réplication du VRS à deux jours post-infection (données non présentées) ou à quatre jours post-infection (Figure 35).

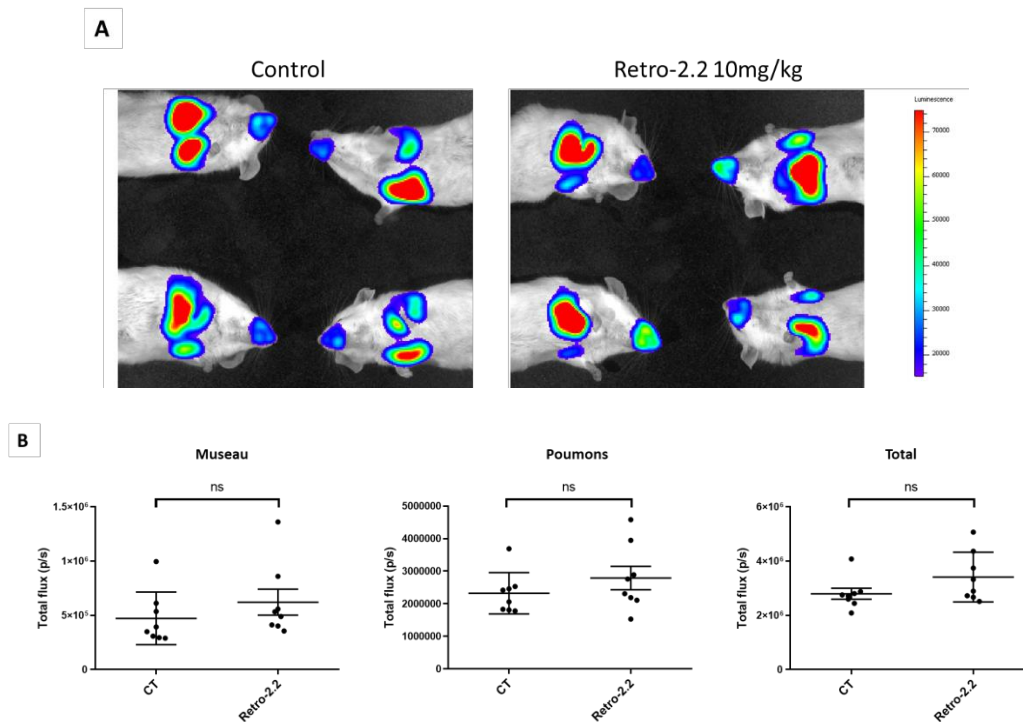


Figure 35 : Retro-2.2 ne protège pas les souris contre l'infection au VRS. Deux groupes de huit souris femelles Balb/c de 8 semaines de vie ont été infectées à J0 avec le VRS-Luc ($5 \cdot 10^4$ plaque forming units (p.f.u) par souris), puis traitées deux fois par jour par administration SC de DMSO ou de Retro-2.2 (10mg/kg). **(A)** Images des souris infectées par le VRS-Luc et traitées, 4 jours post-infection. Les niveaux de bioluminescence dans les museaux et les poumons ont été mesurés après administration intranasale de 50 μ L de D-luciférine (200nM). L'échelle colorée indique les niveaux de radiance (somme des photons émis par seconde dans chaque pixel de la région d'intérêt) ($\text{ps}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sr}^{-1}$). **(B)** Comparaison des niveaux de bioluminescence chez des souris infectées, traitées ou non avec le composé Retro-2.2. L'activité luciférase a été quantifiée dans le museau et les poumons en utilisant le logiciel Living Image, et est exprimée en photons par seconde ($\text{p} \cdot \text{s}^{-1}$). Test de Mann-Whitney non significatif pour tous les paramètres.

A la fin de l'expérience, les souris ont été euthanasiées et disséquées afin de récupérer des organes pour analyse histologique : poumons, reins, foie, rate. Ces analyses n'ont pas été conduites car les résultats de l'expérience ne le justifiaient pas. Cependant, lors de la dissection, nous avons observé une accumulation anormale de solution huileuse au niveau du site d'injection du composé.

4.4 DISCUSSION

Le développement pré-clinique d'une molécule est une étape critique du développement thérapeutique. En effet c'est lors de cette phase qu'une première évaluation de la toxicité *in vivo* est effectuée. De plus, la détermination de la formulation et la mesure des paramètres d'ADME de la molécule sont également effectués lors de cette étape.

Au cours de ma thèse, j'ai utilisé les connaissances acquises par les équipes du CEA sur les caractéristiques de Retro-2.2 pour élaborer un protocole d'évaluation de l'activité de ce composé contre le VRS *in vivo*, en modèle murin. Il a été déterminé qu'une formulation dans un mélange de DMSO (3 %), de lipiodol (29 %) et d'huile de ricin (68 %) présentait la meilleure pharmacocinétique de toutes les formulations testées. Cette formulation est administrée par voie sous-cutanée. La grande viscosité de la formulation impose une injection lente, les souris ont donc été anesthésiées lors de l'injection.

Une simulation d'administrations répétées a permis de déterminer que la meilleure fréquence d'injection est de deux fois par jours, espacées de six heures. Cette fréquence permet de maintenir une concentration plasmatique suffisante pour que le composé exerce son activité.

La première étape dans l'évaluation de l'activité de Retro-2.2 *in vivo* a été de caractériser sa toxicité sur le protocole prévu. Nous avons démontré que Retro-2.2 n'est pas toxique jusqu'à une dose de 10 mg/kg administrée deux fois par jour pendant quatre jours.

A partir du mécanisme antiviral *in vitro* que nous avons décrit, nous anticipons une efficacité du composé contre le VRS *in vivo*. En effet l'action du traitement sur la localisation de la protéine F du VRS inhibe l'infection en culture cellulaire.

Cette action n'est pas spécifique de F, Retro-2.2 inhibant l'adressage des protéines F et G à la membrane plasmique. La protéine G n'étant pas nécessaire pour la réplication du VRS *in vitro* (Karron *et al.*, 1997 ; Techaarpornkul *et al.*, 2001), mais favorisant l'infection *in vivo*, nous avons pour hypothèse que l'effet conjoint du traitement par Retro-2.2 sur F et G permettrait d'observer un effet antiviral *in vivo*, malgré une activité limitée en culture cellulaire. Cependant, lors du test de traitement par Retro-2.2 de souris infectées, aucune activité antivirale n'a pu être observée. Nous avons toutefois remarqué l'accumulation du composé au niveau du site d'injection, ce qui pourrait participer à l'absence d'efficacité antivirale du composé chez la souris.

Ce résultat, quoique décevant, n'apporte pas de conclusion définitive au sujet de l'efficacité du composé Retro-2.2 contre le VRS *in vivo*. Il serait nécessaire d'améliorer la molécule afin de pouvoir changer de formulation et obtenir de meilleurs paramètres de pharmacocinétique et de biodistribution, tout en supprimant l'effet négatif d'accumulation au site d'injection. Il faudra également s'assurer que le nouveau composé est bien distribué à une concentration suffisante au site de l'infection (voies respiratoires) pour exercer son activité.

De plus, dans les futures modifications de formulation et de voie d'administration, il sera très important de considérer qu'en fonction des populations ciblées, certaines voies d'administration peuvent être favorisées par l'industrie pharmaceutique. Par exemple, l'administration par voie orale, qui permet la prise du médicament en autonomie par le patient, sera préférée à la voie sous-cutanée qui impose un geste médical. La voie orale n'est cependant pas favorable à un traitement des jeunes enfants. Pour le VRS, l'infection ayant lieu dans les voies respiratoires, l'administration par voie intranasale pourrait être favorisée, pour optimiser la distribution de la molécule au site d'action. Il faut prendre en compte ces informations lors du développement pré-clinique d'une molécule thérapeutique afin de maximiser les chances de réussite du projet de développement jusqu'à l'AMM.

Discussion générale et perspectives

L'objectif de mon projet de thèse était d'évaluer l'activité antivirale du composé Retro-2.2 contre le VRS. Ce projet a été décomposé en plusieurs objectifs : (i) évaluation de l'activité et de la toxicité *in vitro* du composé, (ii) description du mécanisme d'action du composé contre le VRS et (iii) évaluation de l'activité et la toxicité *in vivo* du composé.

L'activité antivirale de Retro-2.2 a été évaluée en culture cellulaire infectée par des virus recombinants fluorescents ou luminescents (VRS-mCherry ou VRS-Luc). Nous avons démontré que le traitement inhibait l'infection avec une efficacité de l'ordre du micromolaire. Cependant, nous avons également observé une toxicité proche de l'EC₅₀ mesurée. Par conséquent, l'indice de sélectivité de Retro-2.2 *in vitro* contre le VRS est faible (environ 10). Si le développement des composés de la famille Retro-2 se poursuit pour le traitement de l'infection au VRS, les études futures devront tenter de comprendre l'origine du faible IS contre le VRS et de l'améliorer pour obtenir de nouveaux dérivés soit plus actifs, soit moins toxiques, soit les deux à la fois. Cette amélioration de l'IS *in vitro* permettrait d'accroître les chances d'observer une activité des composés contre l'infection *in vivo*.

Lors des expériences d'infection en culture cellulaire, les observations réalisées ont permis de comprendre le mécanisme d'action pour le composé Retro-2.2 contre le VRS, notamment par l'élimination de mécanismes potentiels et caractérisables. Premièrement, nous avons démontré qu'un traitement préventif avec le composé Retro-2.2 n'améliore pas l'efficacité inhibitrice par rapport à un traitement curatif sur les cultures cellulaires. Ainsi Retro-2.2 n'impacte pas les virions ou les étapes d'attachement, de fusion et de libération des protéines virales dans le cytosol des cellules infectées. Le traitement ne bloque pas non plus la formation des corps d'inclusion dans les cellules infectées. Nous avons donc démontré que Retro-2.2 n'empêche pas le VRS d'infecter les cellules ni de s'y répliquer.

J'ai effectué des expériences visant à caractériser plus précisément le mécanisme d'action de Retro-2.2 sur différentes étapes du cycle viral. Notamment, au début de ma thèse, j'ai évalué l'effet de Retro-2.2 sur l'activité du complexe polymérase, en utilisant un test fonctionnel minigénome (Gonnin *et al.*, 2023). Ce test repose sur la co-transfection de cellules avec les plasmides exprimant les protéines L, P, N et M2-1 du VRS, et un plasmide codant pour la luciférase, dont l'expression dépend de l'activité de la polymérase virale (plasmide minigénome). Les données obtenues suggéraient un effet amplificateur de Retro-2.2 sur l'activité du complexe polymérase, peu reproductibles. En conséquence, j'ai choisi de ne pas présenter ces données dans le cadre de ce manuscrit. De plus, les résultats obtenus

en parallèle de ces expériences orientaient nos hypothèses pour expliquer le mécanisme d'action de Retro-2.2 vers les étapes tardives du cycle viral.

En effet, nous avons observé l'inhibition, par le traitement, de la formation des syncytia de grandes tailles sur les cultures cellulaires infectées. Ce phénomène de fusion cellules-cellules constitue un mécanisme de dissémination du VRS. Nous avons quantifié l'efficacité de Retro-2.2 sur la formation des syncytia et démontré qu'elle reflétait l'efficacité mesurée contre l'infection de manière générale, de l'ordre du micromolaire. La formation des syncytia est dépendante de la présence à la membrane plasmique de la protéine de fusion du virus (F). Le changement drastique de phénotype entre les cellules non traitées (qui forment des syncytia de très grandes tailles, impliquant plusieurs dizaines de cellules) et traitées (nombre de noyaux par syncytia limité) est clairement observable par microscopie. En revanche, nous ne sommes pas parvenus à quantifier ce phénomène. D'autre part, nous avons observé un défaut de localisation de F à la membrane plasmique.

La nature transmembranaire de F impose son passage à travers le RE puis l'appareil de Golgi avant adressage à la membrane plasmique ou au site d'assemblage des nouveaux virions (Ke *et al.*, 2018 ; Roberts *et al.*, 1995 ; Vijayakrishnan *et al.*, 2022, bioRxiv preprint). Les protéines G et SH sont également transmembranaires et dépendent des mêmes voies d'expression intracellulaires. Retro-2.2 inhibant la voie de transport rétrograde dépendante de Sec16a et de Syn-5 entre les endosomes précoces, l'appareil de Golgi et le RE, l'hypothèse principale sur laquelle je me suis dès lors concentré était la perturbation par Retro-2.2 de l'expression, de la localisation ou de la fonction des protéines F, G et/ou SH du VRS au cours de l'infection. Cette hypothèse supposait que le composé agissait indirectement sur la protéine F, et potentiellement sur d'autres protéines virales, à travers son action sur le transport rétrograde.

Nous avons vérifié cette hypothèse en évaluant l'effet du traitement sur l'expression de protéines chimériques fluorescentes, associées au peptide luminescent HiBit, en fusion avec des séquences d'adressage des protéines F et G. Ces expériences ont permis de démontrer (i) que le composé ne perturbe pas l'expression des protéines virales transmembranaires, (ii) que le composé perturbe la localisation des protéines virales F et G à la membrane plasmique et enfin (iii) que l'effet du traitement par Retro-2.2 n'est pas restreint à une protéine virale en particulier. Au contraire, l'action du composé perturbe la localisation des protéines virales

transmembranaires F et G qui dépendent de la voie de sécrétion pour leur transport (Figure 36). Il importera, dans une étude future, de vérifier si le traitement perturbe la localisation de la protéine SH de manière similaire. De plus il faudra évaluer l'effet du traitement sur le transport vers la membrane plasmique des protéines endogènes, par exemple un récepteur cellulaire. Il est notamment important de souligner que l'activité toxique de Retro-2.2 pourrait être liée à son effet sur le trafic des protéines cellulaires.

Nous avons également étudié l'implication des cibles moléculaires Sec16a et Syn-5 décrites pour le composé Retro-2, dans l'infection par le VRS. Nous avons pu montrer que la déplétion de l'expression des protéines Sec16a et Syn-5 conduit à une inhibition de l'infection et de la formation des syncytia, reproduisant le phénotype obtenu lors du traitement par Retro-2.2. Nos données suggèrent ainsi l'implication des deux protéines, Sec16a et Syn-5, dans le cycle viral du VRS, notamment dans les étapes tardives du cycle (Figure 36). Plus spécifiquement, nos données suggèrent que Sec16a et Syn-5 seraient impliquées dans la régulation de la localisation de F, G et SH dans les cellules au cours de l'infection, et que le traitement par Retro-2.2 perturberait cette régulation par son action sur Sec16a et Syn-5. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour confirmer définitivement ces suppositions : (i) valider la déplétion de Sec16a, (ii) vérifier si les siRNA et le composé ont un effet additif et (iii) tester l'impact des siRNA sur le système d'expression de protéines chimériques associées à Hibit.

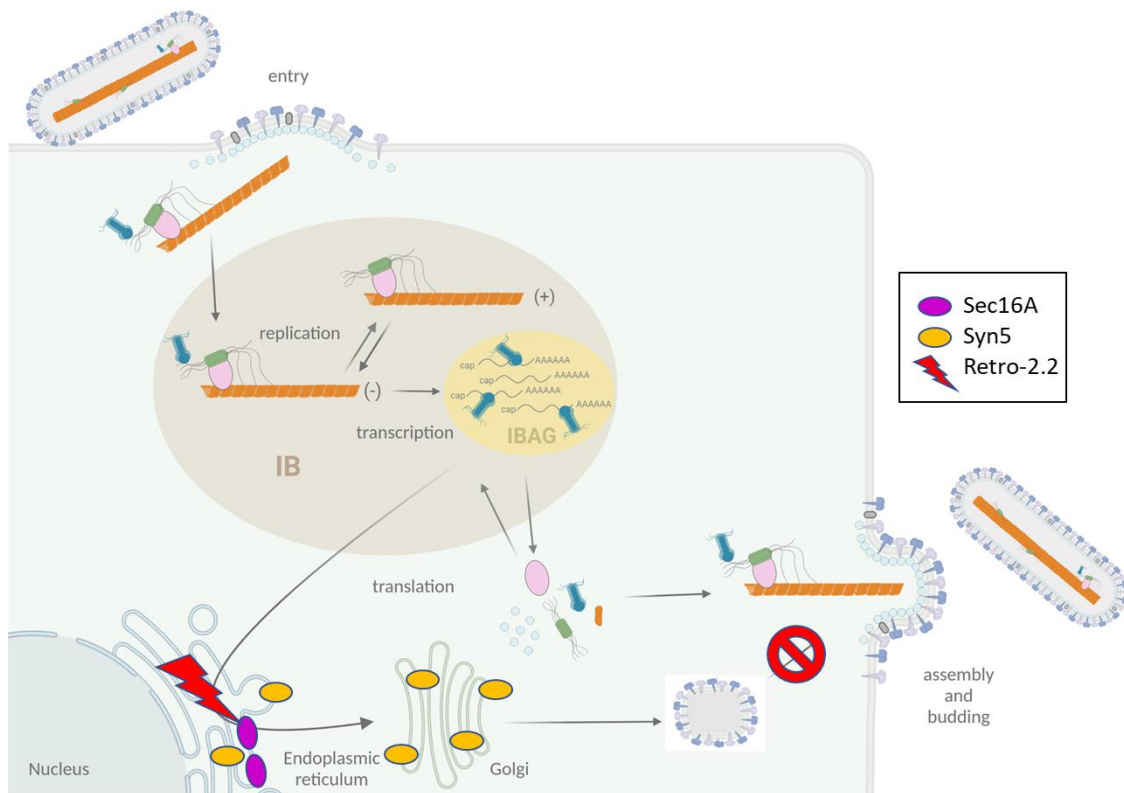


Figure 36 : Schéma du mécanisme moléculaire de Retro-2.2 sur le cycle viral du VRS. La molécule Retro-2.2 se fixe à Sec16A au niveau des sites de sorties du RE, provoquant la relocalisation de la protéine Syn-5 et le blocage du transport des protéines virales transmembranaires F et G vers la membrane plasmique. Figure adaptée de (Decool *et al.*, 2021). Les protéines virales sont représentées suivant le code couleur de la [figure 4](#). IB : *Inclusion Body* (corps d'inclusion cytoplasmique), IBAG : *Inclusion Body Associated Granule* (granule associée au corps d'inclusion).

Enfin, la dernière partie de mon projet de thèse portait sur l'évaluation *in vivo*, en modèle murin, de l'activité antivirale du composé Retro-2.2 contre le VRS. Malgré une mauvaise solubilité du composé, qui imposait une formulation huileuse, et des paramètres pharmacocinétiques sub-optimaux, nous espérons observer un effet inhibiteur contre l'infection. En effet l'action *in vitro* du traitement n'impacte que la protéine F, les protéines G et SH n'étant pas indispensables à la réplication du virus en culture cellulaire. En revanche, ces protéines sont essentielles à l'infection chez l'animal. Il nous a donc paru légitime de tester l'efficacité du composé Retro-2.2 contre l'infection *in vivo*. Nous n'avons toutefois pas observé d'inhibition de l'infection par le traitement. Ce résultat pourrait être attribué à une mauvaise biodistribution de la molécule dans l'organisme des animaux, ne permettant pas d'atteindre les concentrations inhibitrices déterminées *in vitro*. Nous ne pouvons donc pas conclure définitivement sur l'inefficacité du traitement *in vivo*. Ces expériences devront être répétées en utilisant une molécule optimisée pour améliorer sa solubilité et ses paramètres d'ADME.

En définitive, le composé Retro-2.2, dérivé de Retro-2, constitue une alternative intéressante aux stratégies antivirales actuellement développées contre le VRS. Ces stratégies se concentrent sur l'inhibition des étapes précoces du cycle viral (entrée ou réplication) en ciblant des protéines (F ou L) de manière spécifique, même si de rares stratégies alternatives existent. Par exemple, il a été démontré que des inhibiteurs de l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH) présentent des activités antivirales de spectre large (Tong *et al.*, 2018 ; Mei-Jiao *et al.*, 2019 ; Markland *et al.*, 2000). IMPDH est une enzyme clé du métabolisme cellulaire, qui participe à la régulation de la production de guanine (Hedstrom, 2009). Parmi les composés étudiés, certains présentent des activités contre le VRS (Markland *et al.*, 2000). Certaines molécules inhibitrices de IMPDH pourraient donc faire l'objet de projet de repositionnement thérapeutique. D'autres inhibiteurs sont susceptibles d'être repositionnés contre le VRS, notamment les inhibiteurs de HSP90. HSP90 est impliqué dans le cycle viral du VRS et son inhibition induit l'inhibition de l'infection (Munday *et al.*, 2015; Radhakrishnan *et al.*, 2010). Certains inhibiteurs de HSP90 ont déjà fait l'objet d'études cliniques, en particulier en tant qu'anti-cancéreux (Porter *et al.*, 2010 ; Li et Luo, 2023).

Outre le potentiel effet toxique de molécules ayant conduit à l'arrêt des essais cliniques, la plupart des molécules ciblant F ou L induisent et entraînent l'apparition de mutants d'échappement, ce qui décourage l'utilisation de telles stratégies

et pousse les entreprises pharmaceutiques à explorer de nouvelles stratégies comme celles évoquées plus haut.

Retro-2.2 agit de manière indirecte sur l'accès des protéines virales transmembranaires F, G (et/ou SH) à la surface cellulaire, en bloquant vraisemblablement leur transport. En n'agissant pas de manière spécifique sur les protéines virales, ce mécanisme pourrait permettre de réduire la pression de sélection appliquée sur le virus, diminuant de fait les risques d'apparition de mutants d'échappement. C'est une piste prometteuse en complément des stratégies en cours de développement, mais l'exploration de cette piste nécessitera d'importants efforts d'optimisation pour obtenir une molécule plus soluble, moins toxique et présentant des paramètres pharmacocinétiques favorables à une évaluation *in vivo*, en modèle souris.

Annexe

Activité in vivo de peptides ciblant F

Au cours de ma thèse, j'ai participé à une étude visant à évaluer l'efficacité de peptides inhibiteurs de l'étape de fusion du VRS, in vivo en modèle murin. L'ensemble des données fait actuellement l'objet de la rédaction d'une publication scientifique. Ainsi, dans le cadre présent, seules les données relatives aux expériences que j'ai pu mener seront présentées.

Plus spécifiquement, les peptides développés ont été obtenus à partir des séquences des domaines HRA et HRB de la protéine F du VRS, et fonctionnent comme inhibiteurs de fusion en se fixant à la protéine F pendant son changement de conformation de la forme pré-fusion vers la forme post-fusion (Lambert *et al.*, 1996). Ces peptides présentant une faible affinité pour leur cible, ceux-ci ont été optimisés par stabilisation sous forme d'hélices-alpha, grâce à la technologie des peptides agrafés (ou « stapled peptides »). Brièvement, cette approche repose sur l'insertion de résidus en position i , $i+3$; i , $i+4$ ou i , $i+7$ de résidus non naturels, capables de former les liaisons stables par l'intermédiaire des chaînes latérales, et de stabiliser ainsi une conformation en hélice alpha. Ces résidus sont par conséquent insérés sur la face opposée à celle impliquée dans l'interaction protéine-peptide. Il a pu être montré que de tels peptides présentent une meilleure affinité pour leur cible que la séquence native, sont moins sensibles à la dégradation par des protéases et par conséquent plus stables dans le temps, et présentent une capacité accrue à traverser les membranes (Bird *et al.*, 2010). Ces caractéristiques ont notamment conduit au développement de peptides agrafés ciblant

Une étude publiée en 2017, réalisée dans le cadre d'une collaboration entre le l'équipe BMP et le Pr O. Nyanguile (HES-SO, Sion, Suisse) avait permis d'identifier des peptides agrafés dérivés ciblant la protéine F et présentant une activité contre le VRS *in vitro* avec une EC_{50} de l'ordre du nM sur des cellules HEp-2 (Gaillard *et al.*, 2017). Il avait également pu être montré que le meilleur peptide, sélectionné sur la base de son efficacité et de son affinité pour la cible, inhibe l'infection *in vivo* chez la souris sur le protocole présenté plus haut (Gaillard *et al.*, 2017).

Dans la lignée de ces travaux, ces peptides ont été optimisés pour améliorer leur efficacité et leur affinité pour la cible. Les données d'inhibition du VRS en culture cellulaire mettent en évidence un gain d'activité proche de 10 comparé à l'activité du meilleur peptide de l'étude précédente (données non montrées, article en cours de rédaction). Dans le cadre de cette nouvelle étude, j'ai participé à l'évaluation *in vivo* de l'activité de 2 nouveaux peptides optimisés (peptides 253 et 254) contre l'infection par le VRS. Des études de pharmacocinétique des peptides administrés par voie intra-veineuse chez la souris montraient une meilleure stabilité du peptide 253 au cours du temps comparé au peptide 254.

Au cours de cette étude, 4 groupes de 10 souris ont été infectées et traitées avec le contrôle DMSO ou les peptides : 102 (précédemment montré actif *in vivo*, Gaillard *et al.*, 2017), 253 ou 254. Ces peptides ont été administrés par voie intranasale (IN) dans du DMSO (0,8 %) et du PBS. Le traitement a été administré aux souris une fois par jour pendant quatre jours (J0 à J3, voir protocole chapitre 4.3.1) à raison de 50 μ L à 200 μ M.

Un suivi quotidien des animaux a permis de montrer que le traitement n'induit pas de perte de poids ([Figure 37](#)) ni de signe extérieur de souffrance chez les animaux.

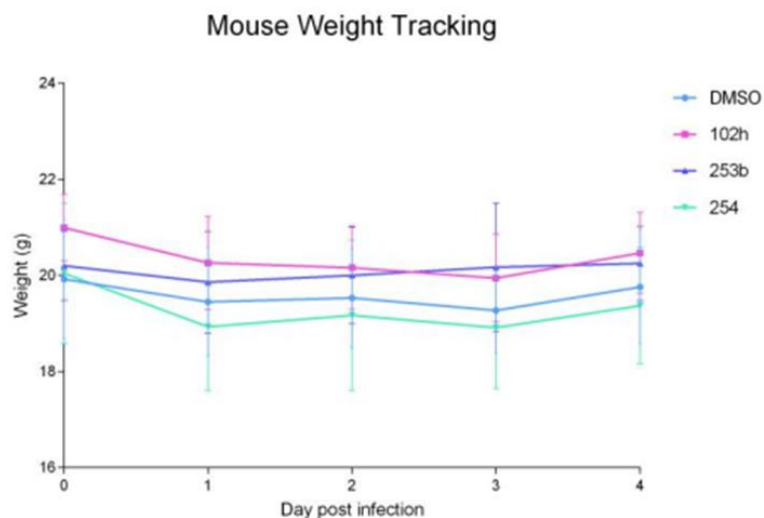


Figure 37 : L'administration répétée des peptides optimisés ne provoque pas de perte de poids. Les souris ont reçu une administration de 50 μ l par jour de : DMSO, ou de peptide 102, 253 ou 254 pendant 4 jours par voie IN à une concentration de 200 μ M.

La mesure de la luminescence a permis de mettre en évidence que les peptide 253 et 254 inhibent significativement l'infection au VRS en modèle souris à 200 μ M, à J4 post-infection (Figure 38). Dans ces conditions, le peptide 102 inhibe l'infection dans les voies respiratoires supérieures (voir « data nose », figure 38B) mais ne présente pas d'activité significative sur animal entier (voir « data total », figure 38B). Plus spécifiquement, le peptide 253 induit une meilleure protection au niveau des poumons comparé au peptide 254.

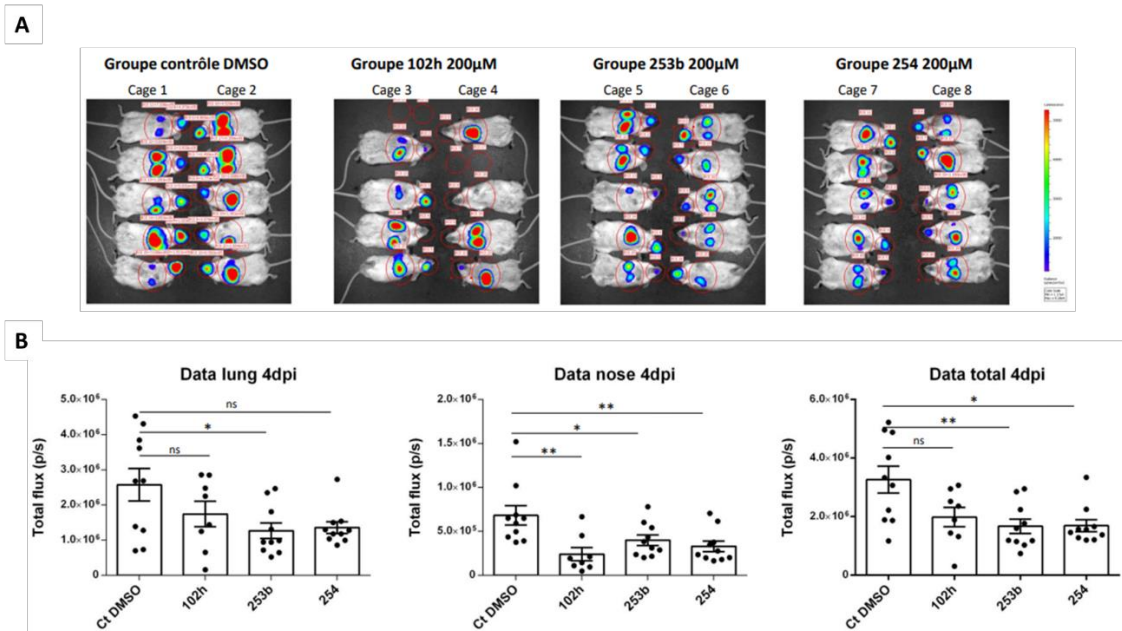


Figure 38 : Les peptides agrafés ciblant la F du VRS inhibent l'infection par le VRS *in vivo*. Quatre groupes de dix souris femelles Balb/c de 8 semaines de vie ont été infectées à J0 avec le VRS-Luc (5.10^4 plaque forming units (p.f.u) par souris), et ont reçu une administrations par jour de DMSO ou de différents peptides ($50 \mu\text{L}$ à $200 \mu\text{M}$). (A) Images des animaux infectés et traités, 4 jours post-infection. Les niveaux de bioluminescence dans les museaux et les poumons ont été mesurés après administration intranasale de $50 \mu\text{L}$ de D-luciférine (200nM). L'échelle colorée indique les niveaux de radiance (somme des photons émis par seconde dans chaque pixel de la région d'intérêt) ($\text{ps}^{-1}.\text{cm}^{-2}.\text{sr}^{-1}$). (B) Comparaison des niveaux de bioluminescence chez des souris infectées, traitées ou non avec les peptides. L'activité luciférase a été quantifiée dans le museau et les poumons en utilisant le logiciel Living Image, et est exprimée en photons par seconde (p.s^{-1}). Test de Mann-Whitney pour tous les paramètres.

En fin de protocole, les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale et les poumons des animaux ont été prélevés afin de procéder à l'analyse histologique. Cette analyse a permis de valider l'absence de signes de toxicité lié au traitement, associée à une diminution des signes cliniques liés à l'infection par les VRS (donnée non montrées).

En conclusion, cette étude a permis de valider le potentiel des peptides agrafés ciblant la protéine du VRS, comme potentiel nouveaux antiviraux. La perspective principale à ces travaux consistera à optimiser la formulation de ces peptides afin de favoriser leur effet et leur administration par voie intra-nasale, ceci en vue d'un potentiel développement thérapeutique.

Bibliographie

Aeberhard, L. *et al.* (2015) 'The Proteome of the Isolated *Chlamydia trachomatis* Containing Vacuole Reveals a Complex Trafficking Platform Enriched for Retromer Components', *PLoS pathogens*, 11(6), p. e1004883. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004883>.

Afonso, C.L. *et al.* (2016) 'Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016', *Archives of Virology*, 161(8), pp. 2351–2360. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2880-1>.

Ahmad, A. *et al.* (2022) 'EDP-938, a Respiratory Syncytial Virus Inhibitor, in a Human Virus Challenge', *The New England Journal of Medicine*, 386(7), pp. 655–666. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2108903>.

Alvarez, R. *et al.* (2009) 'RNA interference-mediated silencing of the respiratory syncytial virus nucleocapsid defines a potent antiviral strategy', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(9), pp. 3952–3962. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.00014-09>.

Anderson, C.S. *et al.* (2020) 'CX3CR1 as a respiratory syncytial virus receptor in pediatric human lung', *Pediatric Research*, 87(5), pp. 862–867. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41390-019-0677-0>.

Anderson, L.J., Bingham, P. and Hierholzer, J.C. (1988) 'Neutralization of respiratory syncytial virus by individual and mixtures of F and G protein monoclonal antibodies', *Journal of Virology*, 62(11), pp. 4232–4238. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.62.11.4232-4238.1988>.

Arnold, R. and Konig, W. (1996) 'ICAM-1 expression and low-molecular-weight G-protein activation of human bronchial epithelial cells (A549) infected with RSV', *Journal of Leukocyte Biology*, 60(6), pp. 766–771. Available at: <https://doi.org/10.1002/jlb.60.6.766>.

Bajorek, M. *et al.* (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), pp. e02217-20,

JVI.02217-20. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.02217-20>.

Baker, R.E. *et al.* (2020) 'The impact of COVID-19 nonpharmaceutical interventions on the future dynamics of endemic infections', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(48), pp. 30547–30553. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.2013182117>.

Bakker, S.E. *et al.* (2013) 'The respiratory syncytial virus nucleoprotein-RNA complex forms a left-handed helical nucleocapsid', *The Journal of General Virology*, 94(Pt 8), pp. 1734–1738. Available at: <https://doi.org/10.1099/vir.0.053025-0>.

Banhart, S. *et al.* (2018) 'Chlamydia trachomatis and its interaction with the cellular retromer', *International journal of medical microbiology: IJMM*, 308(1), pp. 197–205. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.10.006>.

Barik, S. (1992) 'Transcription of human respiratory syncytial virus genome RNA in vitro: requirement of cellular factor(s)', *Journal of Virology*, 66(11), pp. 6813–6818. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.66.11.6813-6818.1992>.

Barik, S. (1993) 'The structure of the 5' terminal cap of the respiratory syncytial virus mRNA', *The Journal of General Virology*, 74 (Pt 3), pp. 485–490. Available at: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-3-485>.

Barik, S., McLean, T. and Dupuy, L.C. (1995) 'Phosphorylation of Ser232 directly regulates the transcriptional activity of the P protein of human respiratory syncytial virus: phosphorylation of Ser237 may play an accessory role', *Virology*, 213(2), pp. 405–412. Available at: <https://doi.org/10.1006/viro.1995.0013>.

Battisti, A.J. *et al.* (2012) 'Structure and assembly of a paramyxovirus matrix protein', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(35), pp. 13996–14000. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1210275109>.

Battles, M.B. and McLellan, J.S. (2019) 'Respiratory syncytial virus entry and how to block it', *Nature Reviews. Microbiology*, 17(4), pp. 233–245. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0149-x>.

Beem, M. *et al.* (1960) 'Association of the chimpanzee coryza agent with acute respiratory disease in children', *The New England Journal of Medicine*, 263, pp. 523–530. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJM196009152631101>.

Behera, A.K. *et al.* (2001) 'Blocking intercellular adhesion molecule-1 on human epithelial cells decreases respiratory syncytial virus infection', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280(1), pp. 188–195. Available at: <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4093>.

Bermingham, A. and Collins, P.L. (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), pp. 11259–11264. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11259>.

Billard, M.-N. and Bont, L.J. (2023) 'The link between respiratory syncytial virus infection during infancy and asthma during childhood', *Lancet (London, England)*, 401(10389), pp. 1632–1633. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)00672-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)00672-4).

Bird, G.H. *et al.* (2010) 'Hydrocarbon double-stapling remedies the proteolytic instability of a lengthy peptide therapeutic', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(32), pp. 14093–14098. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1002713107>.

Bitko, V. and Barik, S. (2001) 'An endoplasmic reticulum-specific stress-activated caspase (caspase-12) is implicated in the apoptosis of A549 epithelial cells by respiratory syncytial virus', *Journal of Cellular Biochemistry*, 80(3), pp. 441–454. Available at: [https://doi.org/10.1002/1097-4644\(20010301\)80:3<441::aid-jcb170>3.0.co;2-c](https://doi.org/10.1002/1097-4644(20010301)80:3<441::aid-jcb170>3.0.co;2-c).

Blanchard, E.L. *et al.* (2020) 'Polymerase-tagged respiratory syncytial virus reveals a dynamic rearrangement of the ribonucleocapsid complex during infection', *PLoS pathogens*, 16(10), p. e1008987. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008987>.

Blondot, M.-L. *et al.* (2012) 'Structure and functional analysis of the RNA- and viral phosphoprotein-binding domain of respiratory syncytial virus M2-1 protein', *PLoS pathogens*, 8(5), p. e1002734. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002734>.

Blount, R.E., Morris, J.A. and Savage, R.E. (1956) 'Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza', *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine*

(New York, N.Y.), 92(3), pp. 544–549. Available at:
<https://doi.org/10.3181/00379727-92-22538>.

Bolt, G., Pedersen, L.O. and Birkeslund, H.H. (2000) 'Cleavage of the respiratory syncytial virus fusion protein is required for its surface expression: role of furin', *Virus Research*, 68(1), pp. 25–33. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(00\)00149-0](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(00)00149-0).

Boyapalle, S. *et al.* (2012) 'Respiratory syncytial virus NS1 protein colocalizes with mitochondrial antiviral signaling protein MAVS following infection', *PLoS One*, 7(2), p. e29386. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029386>.

Braun, M.R. *et al.* (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), p. e1009589. Available at:
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009589>.

Brock, S.C., Goldenring, J.R. and Crowe, J.E. (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), pp. 15143–15148. Available at:
<https://doi.org/10.1073/pnas.2434327100>.

Brunwasser, S.M. *et al.* (2020) 'Assessing the strength of evidence for a causal effect of respiratory syncytial virus lower respiratory tract infections on subsequent wheezing illness: a systematic review and meta-analysis', *The Lancet. Respiratory Medicine*, 8(8), pp. 795–806. Available at: [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30109-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30109-0).

Bs, H. *et al.* (2010) 'Protein expression redirects vesicular stomatitis virus RNA synthesis to cytoplasmic inclusions', *PLoS pathogens*, 6(6). Available at:
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000958>.

Bukreyev, A. *et al.* (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), pp. 8973–8982. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.71.12.8973-8982.1997>.

Bukreyev, A. *et al.* (2008) 'The secreted form of respiratory syncytial virus G glycoprotein helps the virus evade antibody-mediated restriction of replication by acting as an antigen decoy and through effects on Fc receptor-bearing leukocytes', *Journal of Virology*, 82(24), pp. 12191–12204. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.01604-08>.

Bukreyev, A., Yang, L. and Collins, P.L. (2012) 'The secreted G protein of human respiratory syncytial virus antagonizes antibody-mediated restriction of replication involving macrophages and complement', *Journal of Virology*, 86(19), pp. 10880–10884. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.01162-12>.

Caidi, H. *et al.* (2018) 'Anti-respiratory syncytial virus (RSV) G monoclonal antibodies reduce lung inflammation and viral lung titers when delivered therapeutically in a BALB/c mouse model', *Antiviral Research*, 154, pp. 149–157. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.04.014>.

Calain, P. and Roux, L. (1993) 'The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA', *Journal of Virology*, 67(8), pp. 4822–4830. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.67.8.4822-4830.1993>.

Canton, J. and Kima, P.E. (2012) 'Targeting host syntaxin-5 preferentially blocks Leishmania parasitophorous vacuole development in infected cells and limits experimental Leishmania infections', *The American Journal of Pathology*, 181(4), pp. 1348–1355. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.06.041>.

Caramelle, L. (2023) *Développement préclinique d'une contre-mesure médicale de spectre large contre les menaces biologiques*. These de doctorat. université Paris-Saclay. Available at: <https://theses.fr/2023UPASQ014> (Accessed: 20 September 2023).

Carlos, T.S. *et al.* (2009) 'Parainfluenza virus 5 genomes are located in viral cytoplasmic bodies whilst the virus dismantles the interferon-induced antiviral state of cells', *The Journal of General Virology*, 90(Pt 9), pp. 2147–2156. Available at: <https://doi.org/10.1099/vir.0.012047-0>.

Cartee, T.L. and Wertz, G.W. (2001) 'Respiratory syncytial virus M2-1 protein requires phosphorylation for efficient function and binds viral RNA during infection', *Journal of Virology*, 75(24), pp. 12188–12197. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.75.24.12188-12197.2001>.

Castagné, N. *et al.* (2004) 'Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus P-P and P-N protein complexes and localization of the P protein oligomerization domain', *The Journal of General Virology*, 85(Pt 6), pp. 1643–1653. Available at: <https://doi.org/10.1099/vir.0.79830-0>.

Chanock, R., Roizman, B. and Myers, R. (1957) 'Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization', *American Journal of Hygiene*, 66(3), pp. 281–290. Available at: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a119901>.

Chirkova, T. *et al.* (2013) 'Respiratory syncytial virus G protein CX3C motif impairs human airway epithelial and immune cell responses', *Journal of Virology*, 87(24), pp. 13466–13479. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.01741-13>.

Chirkova, T. *et al.* (2015) 'CX3CR1 is an important surface molecule for respiratory syncytial virus infection in human airway epithelial cells', *The Journal of General Virology*, 96(9), pp. 2543–2556. Available at: <https://doi.org/10.1099/vir.0.000218>.

Cifuentes-Muñoz, N. *et al.* (2017) 'Human Metapneumovirus Induces Formation of Inclusion Bodies for Efficient Genome Replication and Transcription', *Journal of Virology*, 91(24), pp. e01282-17. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.01282-17>.

Citron, M.P. *et al.* (2021) 'Transplacental Antibody Transfer of Respiratory Syncytial Virus Specific IgG in Non-Human Primate Mother-Infant Pairs', *Pathogens*, 10(11), p. 1441. Available at: <https://doi.org/10.3390/pathogens10111441>.

Collins, P.L. *et al.* (1996) 'Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(1), pp. 81–85. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.1.81>.

Collins, P.L. and Mottet, G. (1991) 'Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus', *The Journal of General Virology*, 72 (Pt 12), pp. 3095–3101. Available at: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-12-3095>.

Conley, M.J. *et al.* (2022) 'Helical ordering of envelope-associated proteins and glycoproteins in respiratory syncytial virus', *The EMBO journal*, 41(3), p. e109728.

Available at: <https://doi.org/10.15252/embj.2021109728>.

Craig, E. *et al.* (2017) 'Structurally optimized analogs of the retrograde trafficking inhibitor Retro-2cycl limit Leishmania infections', *PLoS neglected tropical diseases*, 11(5), p. e0005556. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005556>.

Cruz, L. *et al.* (2017) 'Potent Inhibition of Human Cytomegalovirus by Modulation of Cellular SNARE Syntaxin 5', *Journal of Virology*, 91(1), pp. e01637-16. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.01637-16>.

Cuesta, I. *et al.* (2000) 'Structural phosphoprotein M2-1 of the human respiratory syncytial virus is an RNA binding protein', *Journal of Virology*, 74(21), pp. 9858–9867. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.74.21.9858-9867.2000>.

Currier, M.G. *et al.* (2016) 'EGFR Interacts with the Fusion Protein of Respiratory Syncytial Virus Strain 2-20 and Mediates Infection and Mucin Expression', *PLoS pathogens*, 12(5), p. e1005622. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005622>.

Dai, W. *et al.* (2017) 'Antiviral effects of Retro-2cycl and Retro-2.1 against Enterovirus 71 in vitro and in vivo', *Antiviral Research*, 144, pp. 311–321. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.07.001>.

Dai, W. *et al.* (2018) 'Antiviral Effect of Retro-2.1 against Herpes Simplex Virus Type 2 In Vitro', *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(6), pp. 849–859. Available at: <https://doi.org/10.4014/jmb.1712.12052>.

Decool, H. *et al.* (2021) 'Interactions between the Nucleoprotein and the Phosphoprotein of Pneumoviruses: Structural Insight for Rational Design of Antivirals', *Viruses*, 13(12), p. 2449. Available at: <https://doi.org/10.3390/v13122449>.

Desai, D. *et al.* (2019) 'Inhibition of diverse opportunistic viruses by structurally optimized retrograde trafficking inhibitors', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 27(9), pp. 1795–1803. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.03.026>.

Dessen, A. *et al.* (2000) 'Crystal structure of the matrix protein VP40 from Ebola virus', *The EMBO journal*, 19(16), pp. 4228–4236. Available at: <https://doi.org/10.1093/emboj/19.16.4228>.

Deval, J. *et al.* (2015) 'Molecular Basis for the Selective Inhibition of Respiratory Syncytial Virus RNA Polymerase by 2'-Fluoro-4'-Chloromethyl-Cytidine Triphosphate', *PLoS pathogens*, 11(6), p. e1004995. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004995>.

Devarkar, S.C. *et al.* (2016) 'Structural basis for m7G recognition and 2'-O-methyl discrimination in capped RNAs by the innate immune receptor RIG-I', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(3), pp. 596–601. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1515152113>.

DeVincenzo, J. *et al.* (2020) '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', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(2), pp. e01884-19. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.01884-19>.

Di Veroli, G.Y. *et al.* (2016) 'Combenefit: an interactive platform for the analysis and visualization of drug combinations', *Bioinformatics (Oxford, England)*, 32(18), pp. 2866–2868. Available at: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw230>.

Dong, J. *et al.* (2022) 'Respiratory Syncytial Virus NS1 Protein Targets the Transactivator Binding Domain of MED25', *Journal of Molecular Biology*, 434(19), p. 167763. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2022.167763>.

Endo, Y. *et al.* (1987a) 'The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins.', *Journal of Biological Chemistry*, 262(12), pp. 5908–5912. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)45660-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)45660-8).

Endo, Y. *et al.* (1987b) 'The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins.', *Journal of Biological Chemistry*, 262(12), pp. 5908–5912. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)45660-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)45660-8).

Escribano-Romero, E. *et al.* (2004) 'The soluble form of human respiratory syncytial virus attachment protein differs from the membrane-bound form in its oligomeric state but is still capable of binding to cell surface proteoglycans', *Journal of Virology*, 78(7), pp. 3524–3532. Available at:

<https://doi.org/10.1128/jvi.78.7.3524-3532.2004>.

Esneau, C. *et al.* (2019) 'Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus N0-P complex in solution', *The Journal of Biological Chemistry*, 294(10), pp. 3647–3660. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006453>.

Falsey, A.R. *et al.* (2022) 'Comparative assessment of reported symptoms of influenza, respiratory syncytial virus, and human metapneumovirus infection during hospitalization and post-discharge assessed by Respiratory Intensity and Impact Questionnaire', *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 16(1), pp. 79–89. Available at: <https://doi.org/10.1111/irv.12903>.

Favaloro, V. *et al.* (2010) 'Asna1/TRC40-mediated membrane insertion of tail-anchored proteins', *Journal of Cell Science*, 123(Pt 9), pp. 1522–1530. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.055970>.

Fearns, R. and Collins, P.L. (1999) 'Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription', *Journal of Virology*, 73(7), pp. 5852–5864. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.73.7.5852-5864.1999>.

Feldman, S.A. *et al.* (2001) 'Human respiratory syncytial virus surface glycoproteins F, G and SH form an oligomeric complex', *Archives of Virology*, 146(12), pp. 2369–2383. Available at: <https://doi.org/10.1007/s007050170009>.

Feldman, S.A., Audet, S. and Beeler, J.A. (2000) 'The fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus facilitates virus attachment and infectivity via an interaction with cellular heparan sulfate', *Journal of Virology*, 74(14), pp. 6442–6447. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.74.14.6442-6447.2000>.

Fitzpatrick, T. *et al.* (2021) 'Palivizumab's real-world effectiveness: a population-based study in Ontario, Canada, 1993-2017', *Archives of Disease in Childhood*, 106(2), pp. 173–179. Available at: <https://doi.org/10.1136/archdischild-2020-319472>.

Forrester, A. *et al.* (2020) 'Functional dissection of the retrograde Shiga toxin trafficking inhibitor Retro-2', *Nature Chemical Biology*, 16(3), pp. 327–336. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0474-4>.

Förster, A. *et al.* (2015) 'Dimerization of matrix protein is required for budding of

respiratory syncytial virus', *Journal of Virology*, 89(8), pp. 4624–4635. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.03500-14>.

Fuentes, S. *et al.* (2007) 'Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein', *Journal of Virology*, 81(15), pp. 8361–8366. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.02717-06>.

Gaillard, V. *et al.* (2017) 'A Short Double-Stapled Peptide Inhibits Respiratory Syncytial Virus Entry and Spreading', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(4), pp. e02241-16. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.02241-16>.

Galloux, M. *et al.* (2012) 'Characterization of a viral phosphoprotein binding site on the surface of the respiratory syncytial nucleoprotein', *Journal of Virology*, 86(16), pp. 8375–8387. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.00058-12>.

Galloux, M. *et al.* (2015) 'Identification and characterization of the binding site of the respiratory syncytial virus phosphoprotein to RNA-free nucleoprotein', *Journal of Virology*, 89(7), pp. 3484–3496. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.03666-14>.

Galloux, M. *et al.* (2020) 'Minimal Elements Required for the Formation of Respiratory Syncytial Virus Cytoplasmic Inclusion Bodies In Vivo and In Vitro', *mBio*, 11(5), pp. e01202-20. Available at: <https://doi.org/10.1128/mBio.01202-20>.

Gao, Y. *et al.* (2020) 'Structure of the Human Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein in Complex with a Short Positive-Sense Gene-End RNA', *Structure (London, England: 1993)*, 28(9), pp. 979-990.e4. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.str.2020.07.001>.

García-Barreno, B., Delgado, T. and Melero, J.A. (1996) 'Identification of protein regions involved in the interaction of human respiratory syncytial virus phosphoprotein and nucleoprotein: significance for nucleocapsid assembly and formation of cytoplasmic inclusions', *Journal of Virology*, 70(2), pp. 801–808. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.70.2.801-808.1996>.

Garcia-Mauriño, C. *et al.* (2019) 'Viral Load Dynamics and Clinical Disease Severity in Infants With Respiratory Syncytial Virus Infection', *The Journal of Infectious Diseases*, 219(8), pp. 1207–1215. Available at: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy655>.

- Ghildyal, R. *et al.* (2002) 'Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells', *The Journal of General Virology*, 83(Pt 4), pp. 753–757. Available at: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-4-753>.
- Gilman, M.S.A. *et al.* (2019) 'Structure of the Respiratory Syncytial Virus Polymerase Complex', *Cell*, 179(1), pp. 193-204.e14. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.014>.
- Glezen, W.P. *et al.* (1986) 'Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus', *American Journal of Diseases of Children (1960)*, 140(6), pp. 543–546. Available at: <https://doi.org/10.1001/archpedi.1986.02140200053026>.
- Gonnin, L. *et al.* (2022) 'Importance of RNA length for in vitro encapsidation by the nucleoprotein of human respiratory syncytial virus', *The Journal of Biological Chemistry*, 298(9), p. 102337. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102337>.
- Gonnin, L. *et al.* (2023) 'Structural landscape of the respiratory syncytial virus nucleocapsids', *Nature Communications*, 14(1), p. 5732. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41439-8>.
- Gonzales, T. *et al.* (2023) 'Effectiveness and Safety of Palivizumab for the Prevention of Serious Lower Respiratory Tract Infection Caused by Respiratory Syncytial Virus: A Systematic Review', *American Journal of Perinatology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1055/a-1990-2633>.
- Gorman, J.J. *et al.* (1997) 'Determination of the disulfide bond arrangement of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry', *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 6(6), pp. 1308–1315. Available at: <https://doi.org/10.1002/pro.5560060619>.
- Green, G. *et al.* (2021) 'CX3CR1 Is a Receptor for Human Respiratory Syncytial Virus in Cotton Rats', *Journal of Virology*, 95(16), p. e0001021. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.00010-21>.
- Griffin, M.P. *et al.* (2020) 'Single-Dose Nirsevimab for Prevention of RSV in Preterm Infants', *The New England Journal of Medicine*, 383(5), pp. 415–425. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1913556>.

Groothuis, J.R. *et al.* (1993) 'Prophylactic administration of respiratory syncytial virus immune globulin to high-risk infants and young children. The Respiratory Syncytial Virus Immune Globulin Study Group', *The New England Journal of Medicine*, 329(21), pp. 1524–1530. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJM199311183292102>.

Groseth, A. *et al.* (2012) 'The Ebola virus glycoprotein contributes to but is not sufficient for virulence in vivo', *PLoS pathogens*, 8(8), p. e1002847. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002847>.

Gupta, N. *et al.* (2014) '(S)-N-Methyldihydroquinazolinones are the Active Enantiomers of Retro-2 Derived Compounds against Toxins', *ACS medicinal chemistry letters*, 5(1), pp. 94–97. Available at: <https://doi.org/10.1021/ml400457j>.

Gupta, N. *et al.* (2017a) 'Inhibitors of retrograde trafficking active against ricin and Shiga toxins also protect cells from several viruses, Leishmania and Chlamydiales', *Chemico-Biological Interactions*, 267, pp. 96–103. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.10.005>.

Gupta, N. *et al.* (2017b) 'Inhibitors of retrograde trafficking active against ricin and Shiga toxins also protect cells from several viruses, Leishmania and Chlamydiales', *Chemico-Biological Interactions*, 267, pp. 96–103. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.10.005>.

Hall, C.B. and Douglas, R.G. (1981) 'Modes of transmission of respiratory syncytial virus', *The Journal of Pediatrics*, 99(1), pp. 100–103. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(81\)80969-9](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(81)80969-9).

Hammitt, L.L. *et al.* (2022) 'Nirsevimab for Prevention of RSV in Healthy Late-Preterm and Term Infants', *The New England Journal of Medicine*, 386(9), pp. 837–846. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2110275>.

Hardy, R.W. and Wertz, G.W. (1998) 'The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription', *Journal of Virology*, 72(1), pp. 520–526. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.72.1.520-526.1998>.

Harrison, K. *et al.* (2016) 'Vaccinia Virus Uses Retromer-Independent Cellular Retrograde Transport Pathways To Facilitate the Wrapping of Intracellular Mature Virions during Virus Morphogenesis', *Journal of Virology*, 90(22), pp. 10120–

10132. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.01464-16>.

Harrison, M.S., Sakaguchi, T. and Schmitt, A.P. (2010) 'Paramyxovirus assembly and budding: Building particles that transmit infections', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(9), pp. 1416–1429. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.04.005>.

Hause, B.M. *et al.* (2016) 'Feral swine virome is dominated by single-stranded DNA viruses and contains a novel Orthopneumovirus which circulates both in feral and domestic swine', *The Journal of General Virology*, 97(9), pp. 2090–2095. Available at: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000554>.

Hedstrom, L. (2009) 'IMP dehydrogenase: structure, mechanism, and inhibition', *Chemical Reviews*, 109(7), pp. 2903–2928. Available at: <https://doi.org/10.1021/cr900021w>.

Hegele, R.G. (2012) 'Making sense of cell surface nucleolin: implications for respiratory syncytial virus prophylaxis and therapy', *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 11(1), pp. 1–2. Available at: <https://doi.org/10.4161/cc.11.1.18466>.

Heinrich, B.S. *et al.* (2010) 'Protein expression redirects vesicular stomatitis virus RNA synthesis to cytoplasmic inclusions', *PLoS pathogens*, 6(6), p. e1000958. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000958>.

Helenius, A. *et al.* (1980) 'On the entry of Semliki forest virus into BHK-21 cells', *The Journal of Cell Biology*, 84(2), pp. 404–420. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.84.2.404>.

Heminway, B.R. *et al.* (1994) 'Analysis of respiratory syncytial virus F, G, and SH proteins in cell fusion', *Virology*, 200(2), pp. 801–805. Available at: <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1245>.

Hendricks, D.A. *et al.* (1987) 'Appearance of a soluble form of the G protein of respiratory syncytial virus in fluids of infected cells', *The Journal of General Virology*, 68 (Pt 6), pp. 1705–1714. Available at: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-6-1705>.

Hendricks, D.A., McIntosh, K. and Patterson, J.L. (1988) 'Further characterization of the soluble form of the G glycoprotein of respiratory syncytial virus', *Journal of Virology*, 62(7), pp. 2228–2233. Available at:

<https://doi.org/10.1128/JVI.62.7.2228-2233.1988>.

Herweg, J.-A. *et al.* (2016) 'Proteomic analysis of the Simkania-containing vacuole: the central role of retrograde transport', *Molecular Microbiology*, 99(1), pp. 151–171. Available at: <https://doi.org/10.1111/mmi.13222>.

Heykers, A. *et al.* (2019) 'Differences in Susceptibility of Human and Mouse Macrophage Cell Lines to Respiratory Syncytial Virus Infection', *Intervirology*, 62(3–4), pp. 134–144. Available at: <https://doi.org/10.1159/000502674>.

Hoenen, T. *et al.* (2012) 'Inclusion bodies are a site of ebolavirus replication', *Journal of Virology*, 86(21), pp. 11779–11788. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.01525-12>.

Hornung, V. *et al.* (2006) '5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I', *Science (New York, N.Y.)*, 314(5801), pp. 994–997. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1132505>.

Imai, T. *et al.* (1997) 'Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion', *Cell*, 91(4), pp. 521–530. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80438-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80438-9).

Jácome, R. *et al.* (2015) 'Structural Analysis of Monomeric RNA-Dependent Polymerases: Evolutionary and Therapeutic Implications', *PloS One*, 10(9), p. e0139001. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139001>.

Jeffree, C.E. *et al.* (2007) 'Ultrastructural analysis of the interaction between F-actin and respiratory syncytial virus during virus assembly', *Virology*, 369(2), pp. 309–323. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.08.007>.

Jeong, K.-I. *et al.* (2015) 'CX3CR1 Is Expressed in Differentiated Human Ciliated Airway Cells and Co-Localizes with Respiratory Syncytial Virus on Cilia in a G Protein-Dependent Manner', *PloS One*, 10(6), p. e0130517. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130517>.

Jin, H. *et al.* (2000) 'Respiratory syncytial virus that lacks open reading frame 2 of the M2 gene (M2-2) has altered growth characteristics and is attenuated in rodents', *Journal of Virology*, 74(1), pp. 74–82. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.74.1.74-82.2000>.

Johnson, J.E. *et al.* (2007) 'The histopathology of fatal untreated human respiratory syncytial virus infection', *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 20(1), pp. 108–119. Available at: <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800725>.

Johnson, S. *et al.* (1997) 'Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus', *The Journal of Infectious Diseases*, 176(5), pp. 1215–1224. Available at: <https://doi.org/10.1086/514115>.

Kahn, J.S. *et al.* (1999) 'Recombinant vesicular stomatitis virus expressing respiratory syncytial virus (RSV) glycoproteins: RSV fusion protein can mediate infection and cell fusion', *Virology*, 254(1), pp. 81–91. Available at: <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9535>.

Kampmann, B. *et al.* (2023) 'Bivalent Prefusion F Vaccine in Pregnancy to Prevent RSV Illness in Infants', *The New England Journal of Medicine*, 388(16), pp. 1451–1464. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2216480>.

Karron, R.A. *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), pp. 13961–13966. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.13961>.

Ke, Z. *et al.* (2018) 'The Morphology and Assembly of Respiratory Syncytial Virus Revealed by Cryo-Electron Tomography', *Viruses*, 10(8), p. 446. Available at: <https://doi.org/10.3390/v10080446>.

Khattar, S.K. *et al.* (2001) 'Deletion and substitution analysis defines regions and residues within the phosphoprotein of bovine respiratory syncytial virus that affect transcription, RNA replication, and interaction with the nucleoprotein', *Virology*, 285(2), pp. 253–269. Available at: <https://doi.org/10.1006/viro.2001.0960>.

Killikelly, A.M., Kanekiyo, M. and Graham, B.S. (2016) 'Pre-fusion F is absent on the surface of formalin-inactivated respiratory syncytial virus', *Scientific Reports*, 6, p. 34108. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep34108>.

Kim, K.-W. *et al.* (2011) 'In vivo structure/function and expression analysis of the CX3C chemokine fractalkine', *Blood*, 118(22), pp. e156-167. Available at:

<https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-348946>.

Kiss, G. *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), pp. 7602–7617. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.00256-14>.

Kolesnikova, L. *et al.* (2000) 'Ultrastructural organization of recombinant Marburg virus nucleoprotein: comparison with Marburg virus inclusions', *Journal of Virology*, 74(8), pp. 3899–3904. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.74.8.3899-3904.2000>.

Krusat, T. and Streckert, H.J. (1997) 'Heparin-dependent attachment of respiratory syncytial virus (RSV) to host cells', *Archives of Virology*, 142(6), pp. 1247–1254. Available at: <https://doi.org/10.1007/s007050050156>.

Krzyzaniak, M.A. *et al.* (2013) 'Host cell entry of respiratory syncytial virus involves macropinocytosis followed by proteolytic activation of the F protein', *PLoS pathogens*, 9(4), p. e1003309. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003309>.

Kuo, L. *et al.* (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), pp. 6892–6901. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.70.10.6892-6901.1996>.

Lahaye, X. *et al.* (2009) 'Functional characterization of Negri bodies (NBs) in rabies virus-infected cells: Evidence that NBs are sites of viral transcription and replication', *Journal of Virology*, 83(16), pp. 7948–7958. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.00554-09>.

Lambert, D.M. *et al.* (1996) 'Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(5), pp. 2186–2191. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.5.2186>.

Langedijk, A.C. and Bont, L.J. (2023) 'Respiratory syncytial virus infection and novel interventions', *Nature Reviews. Microbiology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00919-w>.

Levene, R.E. *et al.* (no date) 'In Vivo Efficacy of EDP-323, A Novel L-Protein Inhibitor, for the Treatment of Respiratory Syncytial Virus'.

Levine, S., Klaiber-Franco, R. and Paradiso, P.R. (1987) 'Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus', *The Journal of General Virology*, 68 (Pt 9), pp. 2521–2524. Available at: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-9-2521>.

Leyrat, C. *et al.* (2014) 'Structural insights into the human metapneumovirus glycoprotein ectodomain', *Journal of Virology*, 88(19), pp. 11611–11616. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.01726-14>.

Li, Y. *et al.* (2022) 'Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in children younger than 5 years in 2019: a systematic analysis', *Lancet (London, England)*, 399(10340), pp. 2047–2064. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00478-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00478-0).

Li, Y.-Y. *et al.* (2023) 'Hepatitis B Virus Utilizes a Retrograde Trafficking Route via the Trans-Golgi Network to Avoid Lysosomal Degradation', *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 15(3), pp. 533–558. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2022.10.008>.

Li, Z.-N. and Luo, Y. (2023) 'HSP90 inhibitors and cancer: Prospects for use in targeted therapies (Review)', *Oncology Reports*, 49(1), p. 6. Available at: <https://doi.org/10.3892/or.2022.8443>.

Liang, B. *et al.* (2015) 'Structure of the L Protein of Vesicular Stomatitis Virus from Electron Cryomicroscopy', *Cell*, 162(2), pp. 314–327. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.018>.

Lifland, A.W. *et al.* (2012) 'Human respiratory syncytial virus nucleoprotein and inclusion bodies antagonize the innate immune response mediated by MDA5 and MAVS', *Journal of Virology*, 86(15), pp. 8245–8258. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.00215-12>.

Liljeroos, L. *et al.* (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), pp. 11133–11138. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1309070110>.

Ling, Z., Tran, K.C. and Teng, M.N. (2009) 'Human respiratory syncytial virus non-structural protein NS2 antagonizes the activation of beta interferon transcription by interacting with RIG-I', *Journal of Virology*, 83(8), pp. 3734–3742. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.02434-08>.

Liuzzi, M. *et al.* (2005a) 'Inhibitors of respiratory syncytial virus replication target cotranscriptional mRNA guanylation by viral RNA-dependent RNA polymerase', *Journal of Virology*, 79(20), pp. 13105–13115. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.20.13105-13115.2005>.

Liuzzi, M. *et al.* (2005b) 'Inhibitors of respiratory syncytial virus replication target cotranscriptional mRNA guanylation by viral RNA-dependent RNA polymerase', *Journal of Virology*, 79(20), pp. 13105–13115. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.20.13105-13115.2005>.

Llorente, M.T. *et al.* (2006) 'Structural analysis of the human respiratory syncytial virus phosphoprotein: characterization of an alpha-helical domain involved in oligomerization', *The Journal of General Virology*, 87(Pt 1), pp. 159–169. Available at: <https://doi.org/10.1099/vir.0.81430-0>.

Llorente, M.T. *et al.* (2008) 'Structural properties of the human respiratory syncytial virus P protein: evidence for an elongated homotetrameric molecule that is the smallest orthologue within the family of paramyxovirus polymerase cofactors', *Proteins*, 72(3), pp. 946–958. Available at: <https://doi.org/10.1002/prot.21988>.

Lord, M.J. *et al.* (2003) 'Ricin. Mechanisms of cytotoxicity', *Toxicological Reviews*, 22(1), pp. 53–64. Available at: <https://doi.org/10.2165/00139709-200322010-00006>.

Löwensteyn, Y.N. and Bont, L.J. (2020) 'Clinical Development of Respiratory Syncytial Virus Antivirals-What We Can Learn From Oseltamivir', *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 71(11), pp. 2796–2798. Available at: <https://doi.org/10.1093/cid/ciz1169>.

Ltd, S.A.B.C. (2022) *ArkBio Announces Positive Results of Phase 3 Study with Ziresovir in Infants and Children Hospitalized with Respiratory Syncytial Virus Infection*, *GlobeNewswire News Room*. Available at: <https://www.globenewswire.com/news-release/2022/04/07/2418164/0/en/ArkBio-Announces-Positive-Results-of-Phase-3-Study-with-Ziresovir-in-Infants-and-Children-Hospitalized->

with-Respiratory-Syncytial-Virus-Infection.html (Accessed: 19 September 2023).

Lu, B. *et al.* (2002) 'The major phosphorylation sites of the respiratory syncytial virus phosphoprotein are dispensable for virus replication in vitro', *Journal of Virology*, 76(21), pp. 10776–10784. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.76.21.10776-10784.2002>.

Lukens, M.V. *et al.* (2010) 'A systemic neutrophil response precedes robust CD8(+) T-cell activation during natural respiratory syncytial virus infection in infants', *Journal of Virology*, 84(5), pp. 2374–2383. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.01807-09>.

Madhi, S.A. *et al.* (2020) 'Respiratory Syncytial Virus Vaccination during Pregnancy and Effects in Infants', *The New England Journal of Medicine*, 383(5), pp. 426–439. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1908380>.

Mallipeddi, S.K., Lupiani, B. and Samal, S.K. (1996) 'Mapping the domains on the phosphoprotein of bovine respiratory syncytial virus required for N-P interaction using a two-hybrid system', *The Journal of General Virology*, 77 (Pt 5), pp. 1019–1023. Available at: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-5-1019>.

Mallipeddi, S.K. and Samal, S.K. (1993) 'Analysis of the ovine respiratory syncytial virus (RSV) G glycoprotein gene defines a subgroup of ungulate RSV', *The Journal of General Virology*, 74 (Pt 12), pp. 2787–2791. Available at: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-12-2787>.

Markland, W. *et al.* (2000) 'Broad-spectrum antiviral activity of the IMP dehydrogenase inhibitor VX-497: a comparison with ribavirin and demonstration of antiviral additivity with alpha interferon', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(4), pp. 859–866. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.44.4.859-866.2000>.

Marsh, M., Bolzau, E. and Helenius, A. (1983) 'Penetration of Semliki Forest virus from acidic prelysosomal vacuoles', *Cell*, 32(3), pp. 931–940. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90078-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90078-8).

Marsh, M. and Helenius, A. (1980) 'Adsorptive endocytosis of Semliki Forest virus', *Journal of Molecular Biology*, 142(3), pp. 439–454. Available at: [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(80\)90281-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(80)90281-8).

Marty, A. *et al.* (2004) 'Association of matrix protein of respiratory syncytial virus

with the host cell membrane of infected cells', *Archives of Virology*, 149(1), pp. 199–210. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0183-9>.

Mason, S.W. *et al.* (2003) 'Interaction between human respiratory syncytial virus (RSV) M2-1 and P proteins is required for reconstitution of M2-1-dependent RSV minigenome activity', *Journal of Virology*, 77(19), pp. 10670–10676. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.77.19.10670-10676.2003>.

Mastrangelo, P. *et al.* (2021) 'Identification of RSV Fusion Protein Interaction Domains on the Virus Receptor, Nucleolin', *Viruses*, 13(2), p. 261. Available at: <https://doi.org/10.3390/v13020261>.

Matlin, K.S. *et al.* (1981) 'Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line', *The Journal of Cell Biology*, 91(3 Pt 1), pp. 601–613. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.91.3.601>.

McLellan, J.S. *et al.* (2013) 'Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody', *Science (New York, N.Y.)*, 340(6136), pp. 1113–1117. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1234914>.

McLellan, J.S., Ray, W.C. and Peeples, M.E. (2013) 'Structure and function of respiratory syncytial virus surface glycoproteins', *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 372, pp. 83–104. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-642-38919-1_4.

Mei-Jiao, G. *et al.* (2019) 'Antiviral effects of selected IMPDH and DHODH inhibitors against foot and mouth disease virus', *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 118, p. 109305. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109305>.

Meissner, H.C., Long, S.S., and American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases and Committee on Fetus and Newborn (2003) 'Revised indications for the use of palivizumab and respiratory syncytial virus immune globulin intravenous for the prevention of respiratory syncytial virus infections', *Pediatrics*, 112(6 Pt 1), pp. 1447–1452. Available at: <https://doi.org/10.1542/peds.112.6.1447>.

Meshram, C.D. *et al.* (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), pp. 10612–

10628. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.01193-16>.

Midgley, C.M. *et al.* (2017) 'Determining the Seasonality of Respiratory Syncytial Virus in the United States: The Impact of Increased Molecular Testing', *The Journal of Infectious Diseases*, 216(3), pp. 345–355. Available at: <https://doi.org/10.1093/infdis/jix275>.

Mink, M.A., Stec, D.S. and Collins, P.L. (1991) 'Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA', *Virology*, 185(2), pp. 615–624. Available at: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90532-g](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90532-g).

Money, V.A. *et al.* (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), pp. 4441–4446. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0805740106>.

Morgens, D.W. *et al.* (2019) 'Retro-2 protects cells from ricin toxicity by inhibiting ASNA1-mediated ER targeting and insertion of tail-anchored proteins', *eLife*, 8, p. e48434. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.48434>.

Moyer, S.A. *et al.* (1991) 'Assembly and transcription of synthetic vesicular stomatitis virus nucleocapsids', *Journal of Virology*, 65(5), pp. 2170–2178. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.65.5.2170-2178.1991>.

Mufson, M.A. *et al.* (1985) 'Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus', *The Journal of General Virology*, 66 (Pt 10), pp. 2111–2124. Available at: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-66-10-2111>.

Mulherkar, N. *et al.* (2011) 'The Ebola virus glycoprotein mediates entry via a non-classical dynamin-dependent macropinocytic pathway', *Virology*, 419(2), pp. 72–83. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.08.009>.

Munday, D.C. *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), pp. 917–930. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.01783-14>.

Murphy, L.B. *et al.* (2003) 'Investigations into the amino-terminal domain of the respiratory syncytial virus nucleocapsid protein reveal elements important for

nucleocapsid formation and interaction with the phosphoprotein', *Virology*, 307(1), pp. 143–153. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(02\)00063-6](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(02)00063-6).

Navarro, J., López-Otín, C. and Villanueva, N. (1991) 'Location of phosphorylated residues in human respiratory syncytial virus phosphoprotein', *The Journal of General Virology*, 72 (Pt 6), pp. 1455–1459. Available at: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-6-1455>.

Nawrocki, J. *et al.* (2021) 'The Effects of Social Distancing Policies on Non-SARS-CoV-2 Respiratory Pathogens', *Open Forum Infectious Diseases*, 8(7), p. ofab133. Available at: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab133>.

Neumann, P. *et al.* (2009) 'Crystal structure of the Borna disease virus matrix protein (BDV-M) reveals ssRNA binding properties', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(10), pp. 3710–3715. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0808101106>.

Nilsson-Payant, B.E. *et al.* (2021) 'Reduced Nucleoprotein Availability Impairs Negative-Sense RNA Virus Replication and Promotes Host Recognition', *Journal of Virology*, 95(9), pp. e02274-20. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.02274-20>.

Nirsevimab significantly protected infants against RSV disease in Phase III MEL-ODY trial (2022). Available at: <https://www.astrazeneca.com/media-centre/press-releases/2022/nirsevimab-significantly-protected-infants-against-rsv-disease-in-phase-iii-melody-trial.html> (Accessed: 19 September 2023).

Noel, R. *et al.* (2013) 'N-methyldihydroquinazolinone derivatives of Retro-2 with enhanced efficacy against Shiga toxin', *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(8), pp. 3404–3413. Available at: <https://doi.org/10.1021/jm4002346>.

Nonnenmacher, M.E. *et al.* (2015) 'Syntaxin 5-dependent retrograde transport to the trans-Golgi network is required for adeno-associated virus transduction', *Journal of Virology*, 89(3), pp. 1673–1687. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.02520-14>.

Norlin, S. *et al.* (2016) 'Asn1/TRC40 Controls β -Cell Function and Endoplasmic Reticulum Homeostasis by Ensuring Retrograde Transport', *Diabetes*, 65(1), pp. 110–119. Available at: <https://doi.org/10.2337/db15-0699>.

Norrby, E., Marusyk, H. and Orvell, C. (1970) 'Morphogenesis of respiratory syncytial virus in a green monkey kidney cell line (Vero)', *Journal of Virology*, 6(2), pp. 237–242. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.6.2.237-242.1970>.

Noval, M.G. *et al.* (2016) 'Intrinsic Disorder to Order Transitions in the Scaffold Phosphoprotein P from the Respiratory Syncytial Virus RNA Polymerase Complex', *Biochemistry*, 55(10), pp. 1441–1454. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01332>.

Novavax Announces Topline Results from Phase 3 Prepare™ Trial of ResVax™ for Prevention of RSV Disease in Infants via Maternal Immunization - Feb 28, 2019 (no date). Available at: <https://ir.novavax.com/press-releases/2019-02-28-Novavax-Announces-Topline-Results-from-Phase-3-Prepare™-Trial-of-ResVax™-for-Prevention-of-RSV-Disease-in-Infants-via-Maternal-Immunization> (Accessed: 16 September 2023).

Openshaw, P. (2020) 'Global disease burden estimates of respiratory syncytial virus associated with acute respiratory infections in older adults in 015: a systemic review and meta-analysis', *S583* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz059>.

Openshaw, P.J.M. *et al.* (2017) 'Protective and Harmful Immunity to RSV Infection', *Annual Review of Immunology*, 35, pp. 501–532. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052206>.

Openshaw, P.J.M. and Tregoning, J.S. (2005) 'Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection', *Clinical Microbiology Reviews*, 18(3), pp. 541–555. Available at: <https://doi.org/10.1128/CMR.18.3.541-555.2005>.

Quizougun-Oubari, M. *et al.* (2015) 'A Druggable Pocket at the Nucleocapsid/Phosphoprotein Interaction Site of Human Respiratory Syncytial Virus', *Journal of Virology*, 89(21), pp. 11129–11143. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.01612-15>.

Paynter, S. (2015) 'Humidity and respiratory virus transmission in tropical and temperate settings', *Epidemiology and Infection*, 143(6), pp. 1110–1118. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0950268814002702>.

Peotter, J. *et al.* (2019) 'COPII-mediated trafficking at the ER/ERGIC interface',

Traffic (Copenhagen, Denmark), 20(7), pp. 491–503. Available at: <https://doi.org/10.1111/tra.12654>.

Pereira, N. *et al.* (2017) 'New Insights into Structural Disorder in Human Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein and Implications for Binding of Protein Partners', *The Journal of Biological Chemistry*, 292(6), pp. 2120–2131. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.765958>.

Perez, M. *et al.* (1997) 'Membrane permeability changes induced in *Escherichia coli* by the SH protein of human respiratory syncytial virus', *Virology*, 235(2), pp. 342–351. Available at: <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8696>.

Piedra, P.A. *et al.* (2003) 'Correlates of immunity to respiratory syncytial virus (RSV) associated-hospitalization: establishment of minimum protective threshold levels of serum neutralizing antibodies', *Vaccine*, 21(24), pp. 3479–3482. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(03\)00355-4](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(03)00355-4).

Pinquier, D. *et al.* (2023) 'Preventing Respiratory Syncytial Virus in Children in France: A Narrative Review of the Importance of a Reinforced Partnership Between Parents, Healthcare Professionals, and Public Health Authorities', *Infectious Diseases and Therapy*, 12(2), pp. 317–332. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40121-022-00737-2>.

Pneumonia Etiology Research for Child Health (PERCH) Study Group (2019) 'Causes of severe pneumonia requiring hospital admission in children without HIV infection from Africa and Asia: the PERCH multi-country case-control study', *Lancet (London, England)*, 394(10200), pp. 757–779. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30721-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30721-4).

Poch, O. *et al.* (1989) 'Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements', *The EMBO journal*, 8(12), pp. 3867–3874. Available at: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08565.x>.

Porter, J.R., Fritz, C.C. and Depew, K.M. (2010) 'Discovery and development of Hsp90 inhibitors: a promising pathway for cancer therapy', *Current Opinion in Chemical Biology*, 14(3), pp. 412–420. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.03.019>.

Radhakrishnan, A. *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), pp. 1829–1848. Available at: <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.001651>.

Rameix-Welti, M.-A. *et al.* (2014) 'Visualizing the replication of respiratory syncytial virus in cells and in living mice', *Nature Communications*, 5, p. 5104. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms6104>.

Renner, M. *et al.* (2016) 'Nucleocapsid assembly in pneumoviruses is regulated by conformational switching of the N protein', *eLife*, 5, p. e12627. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.12627>.

Richard, C.-A. *et al.* (2018) 'RSV hijacks cellular protein phosphatase 1 to regulate M2-1 phosphorylation and viral transcription', *PLoS pathogens*, 14(3), p. e1006920. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006920>.

Rincheval, V. *et al.* (2017) 'Functional organization of cytoplasmic inclusion bodies in cells infected by respiratory syncytial virus', *Nature Communications*, 8(1), p. 563. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00655-9>.

Ringel, M. *et al.* (2019) 'Nipah virus induces two inclusion body populations: Identification of novel inclusions at the plasma membrane', *PLoS pathogens*, 15(4), p. e1007733. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007733>.

Risso-Ballester, J. *et al.* (2021) 'A condensate-hardening drug blocks RSV replication in vivo', *Nature*, 595(7868), pp. 596–599. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03703-z>.

Rixon, H.W.M. *et al.* (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), pp. 1153–1165. Available at: <https://doi.org/10.1099/vir.0.19769-0>.

Roberts, S.R. *et al.* (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), pp. 4538–4546. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.68.7.4538-4546.1994>.

Roberts, S.R., Compans, R.W. and Wertz, G.W. (1995) 'Respiratory syncytial virus matures at the apical surfaces of polarized epithelial cells', *Journal of Virology*,

69(4), pp. 2667–2673. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.69.4.2667-2673.1995>.

RSV Vaccine and mAb Snapshot (no date). Available at: <https://www.path.org/resources/rsv-vaccine-and-mab-snapshot/> (Accessed: 16 September 2023).

Russell, C.D. *et al.* (2017) 'The Human Immune Response to Respiratory Syncytial Virus Infection', *Clinical Microbiology Reviews*, 30(2), pp. 481–502. Available at: <https://doi.org/10.1128/CMR.00090-16>.

Saeed, M.F. *et al.* (2010) 'Cellular entry of ebola virus involves uptake by a macropinocytosis-like mechanism and subsequent trafficking through early and late endosomes', *PLoS pathogens*, 6(9), p. e1001110. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001110>.

Sánchez-Seco, M.P. *et al.* (1995) 'C-terminal phosphorylation of human respiratory syncytial virus P protein occurs mainly at serine residue 232', *The Journal of General Virology*, 76 (Pt 2), pp. 425–430. Available at: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-2-425>.

San-Juan-Vergara, H. *et al.* (2012) 'Cholesterol-rich microdomains as docking platforms for respiratory syncytial virus in normal human bronchial epithelial cells', *Journal of Virology*, 86(3), pp. 1832–1843. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.06274-11>.

Sartorius, R. *et al.* (2021) 'Exploiting viral sensing mediated by Toll-like receptors to design innovative vaccines', *NPJ vaccines*, 6(1), p. 127. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00391-8>.

Satake, M. *et al.* (1985) 'Respiratory syncytial virus envelope glycoprotein (G) has a novel structure', *Nucleic Acids Research*, 13(21), pp. 7795–7812. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/13.21.7795>.

Selvaraj, M. *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), pp. e01554-18. Available at: <https://doi.org/10.1128/mBio.01554-18>.

Shahabi, A. *et al.* (2018) 'Assessing Variation in the Cost of Palivizumab for Respiratory Syncytial Virus Prevention in Preterm Infants', *PharmacoEconomics* -

Open, 2(1), pp. 53–61. Available at: <https://doi.org/10.1007/s41669-017-0042-3>.

Shaikh, F.Y. *et al.* (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), pp. e00270-11. Available at: <https://doi.org/10.1128/mBio.00270-11>.

Shi, T. *et al.* (2020) 'Global Disease Burden Estimates of Respiratory Syncytial Virus-Associated Acute Respiratory Infection in Older Adults in 2015: A Systematic Review and Meta-Analysis', *The Journal of Infectious Diseases*, 222(Suppl 7), pp. S577–S583. Available at: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz059>.

Shtanko, O. *et al.* (2018) 'Retro-2 and its dihydroquinazolinone derivatives inhibit filovirus infection', *Antiviral Research*, 149, pp. 154–163. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.11.016>.

Sigurs, N. *et al.* (2010) 'Asthma and allergy patterns over 18 years after severe RSV bronchiolitis in the first year of life', *Thorax*, 65(12), pp. 1045–1052. Available at: <https://doi.org/10.1136/thx.2009.121582>.

Simabuco, F.M. *et al.* (2011) 'Structural analysis of human respiratory syncytial virus p protein: identification of intrinsically disordered domains', *Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 42(1), pp. 340–345. Available at: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000100043>.

Simons, K., Garoff, H. and Helenius, A. (1982) 'How an animal virus gets into and out of its host cell', *Scientific American*, 246(2), pp. 58–66. Available at: <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0282-58>.

Sivan, G. *et al.* (2013) 'Human genome-wide RNAi screen reveals a role for nuclear pore proteins in poxvirus morphogenesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(9), pp. 3519–3524. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1300708110>.

Slack, M.S. and Easton, A.J. (1998) 'Characterization of the interaction of the human respiratory syncytial virus phosphoprotein and nucleocapsid protein using the two-hybrid system', *Virus Research*, 55(2), pp. 167–176. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(98\)00042-2](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(98)00042-2).

- Sone, S. *et al.* (1997) 'Enhanced cytokine production by milk macrophages following infection with respiratory syncytial virus', *Journal of Leukocyte Biology*, 61(5), pp. 630–636. Available at: <https://doi.org/10.1002/jlb.61.5.630>.
- Song, X. *et al.* (2021) 'An emerging orthopneumovirus detected from dogs with canine infectious respiratory disease in China', *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(6), pp. 3217–3221. Available at: <https://doi.org/10.1111/tbed.14291>.
- Sourimant, J. *et al.* (2015) 'Fine mapping and characterization of the L-polymerase-binding domain of the respiratory syncytial virus phosphoprotein', *Journal of Virology*, 89(8), pp. 4421–4433. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.03619-14>.
- Spann, K.M., Tran, K.C. and Collins, P.L. (2005) 'Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and proinflammatory cytokines', *Journal of Virology*, 79(9), pp. 5353–5362. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.9.5353-5362.2005>.
- Srinivasakumar, N., Ogra, P.L. and Flanagan, T.D. (1991a) 'Characteristics of fusion of respiratory syncytial virus with HEp-2 cells as measured by R18 fluorescence dequenching assay', *Journal of Virology*, 65(8), pp. 4063–4069. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.65.8.4063-4069.1991>.
- Srinivasakumar, N., Ogra, P.L. and Flanagan, T.D. (1991b) 'Characteristics of fusion of respiratory syncytial virus with HEp-2 cells as measured by R18 fluorescence dequenching assay', *Journal of Virology*, 65(8), pp. 4063–4069. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.65.8.4063-4069.1991>.
- Stark, J.M. *et al.* (1996) 'Respiratory syncytial virus infection enhances neutrophil and eosinophil adhesion to cultured respiratory epithelial cells. Roles of CD18 and intercellular adhesion molecule-1', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 156(12), pp. 4774–4782.
- Stechmann, B. *et al.* (2010) 'Inhibition of Retrograde Transport Protects Mice from Lethal Ricin Challenge', *Cell*, 141(2), pp. 231–242. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.043>.
- Sugawara, M. *et al.* (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), pp.

271–282. Available at: <https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.2002.21027.x>.

Surface features of a Mononegavirales matrix protein indicate sites of membrane interaction (no date). Available at:

<https://www.pnas.org/doi/epdf/10.1073/pnas.0805740106> (Accessed: 12 September 2023).

Sutherland, K.A., Collins, P.L. and Peeples, M.E. (2001) 'Synergistic effects of gene-end signal mutations and the M2-1 protein on transcription termination by respiratory syncytial virus', *Virology*, 288(2), pp. 295–307. Available at: <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1105>.

Swedan, S. *et al.* (2011) 'Multiple functional domains and complexes of the two nonstructural proteins of human respiratory syncytial virus contribute to interferon suppression and cellular location', *Journal of Virology*, 85(19), pp. 10090–10100. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.00413-11>.

Tanner, S.J. *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*, 111(4), pp. 1580–1585. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1317262111>.

Tawar, R.G. *et al.* (2009) 'Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus', *Science (New York, N.Y.)*, 326(5957), pp. 1279–1283. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1177634>.

Taylor, N.P. (2021) *GSK culls phase 2 RSV vaccine in kids, as feladilimab flops again in lung cancer*, *Fierce Biotech*. Available at: <https://www.fiercebiotech.com/biotech/gsk-drops-phase-2-viral-vector-rsv-vaccine-pediatric-ages> (Accessed: 16 September 2023).

Tayyari, F. *et al.* (2011) 'Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus', *Nature Medicine*, 17(9), pp. 1132–1135. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.2444>.

Techarpornkul, S., Barretto, N. and Peeples, M.E. (2001) 'Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene', *Journal of Virology*, 75(15), pp. 6825–6834. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.75.15.6825-6834.2001>.

- Teng, M.N. *et al.* (2000) 'Recombinant respiratory syncytial virus that does not express the NS1 or M2-2 protein is highly attenuated and immunogenic in chimpanzees', *Journal of Virology*, 74(19), pp. 9317–9321. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.74.19.9317-9321.2000>.
- Teng, M.N. and Collins, P.L. (1999) 'Altered growth characteristics of recombinant respiratory syncytial viruses which do not produce NS2 protein', *Journal of Virology*, 73(1), pp. 466–473. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.73.1.466-473.1999>.
- Tong, X. *et al.* (2018) 'Merimepodib, an IMPDH inhibitor, suppresses replication of Zika virus and other emerging viral pathogens', *Antiviral Research*, 149, pp. 34–40. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.11.004>.
- Tran, T.-L. *et al.* (2007) 'The nine C-terminal amino acids of the respiratory syncytial virus protein P are necessary and sufficient for binding to ribonucleoprotein complexes in which six ribonucleotides are contacted per N protein promoter', *The Journal of General Virology*, 88(Pt 1), pp. 196–206. Available at: <https://doi.org/10.1099/vir.0.82282-0>.
- Tran, T.-L. *et al.* (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), pp. 6363–6374. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.00335-09>.
- Treasure, T. and Nelson, C.D.S. (2020) 'Inhibition of JC polyomavirus infectivity by the retrograde transport inhibitor Retro-2.1', *Microbiology and Immunology*, 64(12), pp. 783–791. Available at: <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12851>.
- Tremaglio, C.Z. *et al.* (2013) 'Respiratory syncytial virus polymerase can initiate transcription from position 3 of the leader promoter', *Journal of Virology*, 87(6), pp. 3196–3207. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.02862-12>.
- Triantafyllou, K. *et al.* (2013) 'Human respiratory syncytial virus viroporin SH: a viral recognition pathway used by the host to signal inflammasome activation', *Thorax*, 68(1), pp. 66–75. Available at: <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2012-202182>.
- Tripp, R.A. *et al.* (2001) 'CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein', *Nature Immunology*, 2(8), pp. 732–738. Available at: <https://doi.org/10.1038/90675>.

Turner, T.L. *et al.* (2014) 'Respiratory syncytial virus: current and emerging treatment options', *ClinicoEconomics and outcomes research: CEOR*, 6, pp. 217–225. Available at: <https://doi.org/10.2147/CEOR.S60710>.

Vanover, D. *et al.* (2017) 'RSV glycoprotein and genomic RNA dynamics reveal filament assembly prior to the plasma membrane', *Nature Communications*, 8(1), p. 667. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00732-z>.

Vidal Valero, M. (2023) "'A good day": FDA approves world's first RSV vaccine', *Nature*, 617(7960), pp. 234–235. Available at: <https://doi.org/10.1038/d41586-023-01529-5>.

Vijayakrishnan, S. *et al.* (2022) 'Ultrastructural characterization of a viral RNA and G-protein containing, membranous organelle formed in respiratory syncytial virus infected cells'. bioRxiv, p. 2022.11.28.517999. Available at: <https://doi.org/10.1101/2022.11.28.517999>.

Villanueva, N. *et al.* (2000) 'The bulk of the phosphorylation of human respiratory syncytial virus phosphoprotein is not essential but modulates viral RNA transcription and replication', *The Journal of General Virology*, 81(Pt 1), pp. 129–133. Available at: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-1-129>.

Vinck, R. (2016) *Formulation nanométrique de la molécule anti-pathogènes intracellulaires Retro-2.1*. These en préparation. Paris, Muséum national d'histoire naturelle. Available at: <https://theses.fr/s218626> (Accessed: 20 September 2023).

Walsh, E.E. *et al.* (2023) 'Efficacy and Safety of a Bivalent RSV Prefusion F Vaccine in Older Adults', *The New England Journal of Medicine*, 388(16), pp. 1465–1477. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2213836>.

Walsh, E.E. and Hruska, J. (1983) 'Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein', *Journal of Virology*, 47(1), pp. 171–177. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.47.1.171-177.1983>.

Wang, S.Z. *et al.* (2000) 'Adhesion molecule expression on epithelial cells infected with respiratory syncytial virus', *The European Respiratory Journal*, 15(2), pp. 358–366. Available at: <https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.2000.15b23.x>.

Wasserman, R.L., Greener, B.N. and Mond, J. (2017) 'RI-002, an intravenous im-

munoglobulin containing high titer neutralizing antibody to RSV and other respiratory viruses for use in primary immunodeficiency disease and other immune compromised populations', *Expert Review of Clinical Immunology*, 13(12), pp. 1107–1119. Available at: <https://doi.org/10.1080/1744666X.2017.1389647>.

Weber, E. *et al.* (1995) 'Nonstructural protein 2 (NS2) of respiratory syncytial virus (RSV) detected by an antipeptide serum', *Respiration; International Review of Thoracic Diseases*, 62(1), pp. 27–33. Available at: <https://doi.org/10.1159/000196385>.

Wertz, G.W. *et al.* (1985) 'Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(12), pp. 4075–4079. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.82.12.4075>.

White, J.M. and Whittaker, G.R. (2016) 'Fusion of Enveloped Viruses in Endosomes', *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 17(6), pp. 593–614. Available at: <https://doi.org/10.1111/tra.12389>.

Wilkins, D. *et al.* (2023) 'Nirsevimab binding-site conservation in respiratory syncytial virus fusion glycoprotein worldwide between 1956 and 2021: an analysis of observational study sequencing data', *The Lancet. Infectious Diseases*, 23(7), pp. 856–866. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00062-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00062-2).

Wu, Y. *et al.* (2017) 'ABMA, a small molecule that inhibits intracellular toxins and pathogens by interfering with late endosomal compartments', *Scientific Reports*, 7(1), p. 15567. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15466-7>.

Yin, H.-S. *et al.* (2005) 'Structure of the uncleaved ectodomain of the paramyxovirus (hPIV3) fusion protein', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26), pp. 9288–9293. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0503989102>.

Yin, H.-S. *et al.* (2006) 'Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation', *Nature*, 439(7072), pp. 38–44. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature04322>.

Young, J. and Kima, P.E. (2019) 'The Leishmania Parasitophorous Vacuole Membrane at the Parasite-Host Interface', *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 92(3), pp. 511–521.

Zhivaki, D. *et al.* (2017) 'Respiratory Syncytial Virus Infects Regulatory B Cells in Human Neonates via Chemokine Receptor CX3CR1 and Promotes Lung Disease Severity', *Immunity*, 46(2), pp. 301–314. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.01.010>.

Zhou, Y. *et al.* (2019) 'Measles Virus Forms Inclusion Bodies with Properties of Liquid Organelles', *Journal of Virology*, 93(21), pp. e00948-19. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.00948-19>.

Zimmer, G., Budz, L. and Herrler, G. (2001) 'Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences', *The Journal of Biological Chemistry*, 276(34), pp. 31642–31650. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M102633200>.

Züst, R. *et al.* (2011) 'Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5', *Nature Immunology*, 12(2), pp. 137–143. Available at: <https://doi.org/10.1038/ni.1979>.