



La glycoprotéine de fusion F des paramyxovirus : étude structure-fonction et ingénierie de F en vue du développement d'applications thérapeutiques

Jean-Christophe Le Bayon

► To cite this version:

Jean-Christophe Le Bayon. La glycoprotéine de fusion F des paramyxovirus : étude structure-fonction et ingénierie de F en vue du développement d'applications thérapeutiques. Virologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10335 . tel-01147420

HAL Id: tel-01147420

<https://theses.hal.science/tel-01147420>

Submitted on 30 Apr 2015

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

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



THÈSE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD – LYON I

ECOLE DOCTORALE ED340 Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 18 Octobre 2013

par

Jean-Christophe Le Bayon

La glycoprotéine de fusion F des paramyxovirus

**Etude Structure-Fonction et ingénierie de F en vue du développement
d'applications thérapeutiques**

Directeur de thèse : Dr. Manuel Rosa-Calatrava

Laboratoire VirPath EA 4610 UCBL-HCL, Lyon

Composition du Jury

Pr. Astrid Vabret

Dr. Frédéric Tangy

Dr. Guy Boivin

Pr. Bruno Lina

Dr. Manuel Rosa-Calatrava

Membre rapporteur

Membre rapporteur

Membre

Président du jury

Membre

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Directeur : M. N. SIAUVE

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : Mme S. FLECK

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

Directeur : M. C. COLLIGNON

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. P. FOURNIER

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. C. VITON

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Administrateur provisoire : M. N. LEBOISNE

RESUME

Les paramyxovirus respiratoires humains sont des virus responsables d'infections chez les jeunes enfants, les personnes âgées et les patients immunodéprimés. Ces virus possèdent deux glycoprotéines à la surface de leur enveloppe, jouant un rôle dans l'entrée du virus dans la cellule cible. La glycoprotéine d'attachement (HN, G ou H) permet l'attachement du virus à son récepteur cellulaire et, dans le cas de HN, celle-ci est suspectée d'activer la seconde glycoprotéine, la protéine de fusion (F). Cette dernière réalise la fusion entre l'enveloppe du virus et la membrane cellulaire. Le mécanisme par lequel la protéine HN "active" la protéine F reste mal caractérisé, malgré la détermination récente de leurs structures en cristallographie. Plusieurs modèles sont actuellement proposés.

Ce travail de thèse s'est focalisé principalement sur les glycoprotéines d'enveloppe des virus parainfluenza humain de type 2 (hPIV-2) et parainfluenza de type 5 (PIV-5), ainsi que sur la glycoprotéine de fusion du métapneumovirus humain (hMPV).

La première partie de ce projet a consisté à caractériser une mutation retrouvée sur la protéine F de souches circulantes hPIV-2. Cette étude a notamment souligné l'importance de la sous-unité F2 dans la régulation de la fusion membranaire. Puis, dans un second temps, l'une des étapes du mécanisme d'entrée du métapneumovirus a été étudiée : la fusion membranaire induite par la glycoprotéine F. Il a été démontré qu'il était possible dans une certaine mesure, et par une approche de mutagenèse combinatoire, de dissocier les caractéristiques de F hMPV et ainsi de pouvoir mieux les étudier. Ce travail d'ingénierie de la glycoprotéine F hMPV s'est également inscrit dans un objectif de recherche appliquée afin de contribuer au développement de nouveaux outils prophylactiques et thérapeutiques.

Cette perspective thérapeutique de F PIV-5 a été évaluée dans le cadre d'un vecteur oncolytique basé sur l'adénovirus de type 5 (AdV-5). L'expression de cette glycoprotéine hyperfusogène a ainsi contribué à un effet cytotoxique amplifié des vecteurs armés *in vitro* ainsi qu'en modèle animal immunocompétent.

ABSTRACT

Human respiratory paramyxoviruses are responsible for infectious diseases and hospitalisations among infants, children, elderly and the immunocompromised. These viruses harbour two glycoproteins implicated in virus entry into the cell. The attachment glycoprotein (HN, G or H) is implicated the virus attachment on a target cell receptor, and HN is also suspected to activate the second glycoprotein, the fusion protein (F). This latter glycoprotein can perform the fusion between the cellular membrane and the viral envelope. The mechanism of activation of the F protein, is not well-defined, even with the structural characterisation for some viruses studied in this thesis.

This thesis work is focussed on the viral glycoprotein of parainfluenza virus type 2 (hPIV-2), parainfluenza virus type 5 (PIV-5), and the fusion glycoprotein of human Metapneumovirus (hMPV).

The first part of this project was the characterization of a mutation observed in the F protein natural variants of hPIV-2. This work highlights the importance of the F2 subunit of F in the fusion regulation. A second part of the project consisted of the study of the mechanism of F hMPV entry into the cell, induced by F glycoprotein. This work showed that it was possible to dissociate the characteristics of the F glycoprotein, in order to allow a better understanding of these characteristics. This engineering work on the F protein was used to understand the basic science but could also be used in the development of therapeutic tools.

The therapeutic use of F PIV-5 was also evaluated in an oncolytic vector based on adenovirus type 5 (AdV-5). Its expression in tumours showed a highly cytotoxic activity for the target cells *in vivo*, but also *in vitro* on immunocompetent rodents.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail, le Pr Astrid Vabret, le Dr. Frédéric Tangy, le Dr Guy Boivin, le Dr. Manuel Rosa-Calatrava et le Pr. Bruno Lina.

Je tiens à remercier le Dr Manuel Rosa-Calatrava de m'avoir accueilli dans son équipe dès mon Master 2 et d'avoir accepté de diriger cette thèse. Je lui suis très reconnaissant de m'avoir fait confiance et de m'avoir laissé une certaine autonomie grâce à laquelle j'ai le sentiment d'avoir beaucoup appris. Je dois beaucoup au Dr Olivier Terrier pour m'avoir formé lors de mon master et aussi pour son support tout au long de ma thèse, je lui dois beaucoup et cette thèse n'existerait sûrement pas sans lui. J'ai une grosse pensée pour France Feuillet qui avait débuté le projet hMPV et qui a dû malheureusement arrêter sa thèse. Merci à toute l'équipe VirPath pour son support et les échanges scientifiques ou non durant cette thèse, notamment Gaëlle Cartet, Matthieu Yver, Boris Essere, Vincent Moulès, Coralie Carron, Thomas Julien, France Feuillet, Nisrine Falah, Naoual Adissa...

Merci au Dr. Guy Boivin pour son chaleureux et sympathique accueil à Québec. J'y ai beaucoup appris en l'espace d'un an et demi et j'ai beaucoup progressé sous sa supervision. Son point de vue de médecin m'a permis de voir les problèmes d'une autre façon. Merci à Laetitia Aerts, Marie-Hélène Cavanagh, Daniel Beaulieu et Marie-Eve Hamelin de l'équipe hMPV, et bien sûr à l'ensemble de l'équipe qui m'a accompagné et aidé quand je suis arrivé à Québec, plus particulièrement Andrès Pizzorno et Rafik Menasria.

Et je remercie finalement Isabel M Vincent pour son support lors de la rédaction de cette thèse et pour m'avoir permis de supporter l'hiver québécois.

TABLE DES MATIERES

Résumé	d
Abstract	f
Remerciements	h
Table des illustrations	p
Liste des tableaux	r
Abréviations	t
Introduction Bibliographique	2
1 Historique des paramyxovirus respiratoires	6
2 Description des virus	10
2.1 Classification et caractéristiques	10
2.2 Le cycle viral et l'équipement protéique des virus	13
2.3 L'entrée cellulaire des virus	15
2.3.1 Les récepteurs cellulaires	15
2.3.2 Les voies d'infection de la cellule	16
2.3.3 Les glycoprotéines HN et G	20
2.3.4 Les glycoprotéines de fusion F	21
2.3.4.1 Généralités	21
2.3.4.2 Le site de clivage	22
2.3.4.3 Domaines fonctionnels et dynamique conformationnelle des GP F	23
2.3.5 Les hypothèses de promotion et de régulation de la protéine F par HN/G	26
2.3.6 Les autres GP virales de fusion	30
2.4 Epidémiologie	32
3 Traitements thérapeutiques	36
3.1 Une molécule antivirale : la ribavirine	36
3.2 Les inhibiteurs d'attachement et de fusion	36
3.2.1 Stratégie d'inhibition de l'entrée virale	37
3.2.1.1 Inhibition de l'attachement	38
3.2.1.2 Antagonistes des corécepteurs	38
3.2.1.3 Inhibition de la glycoprotéine de fusion membranaire	39

3.2.1.3.1	Inhibition du repliement de la GP de fusion par un peptide	39
3.2.1.3.2	Inhibition des GP par des immunoglobulines	39
3.2.1.3.3	Inhibition de la protéine de fusion par des molécules chimiques	40
3.3	Perspectives	41
4	Vaccins	42
4.1	Vaccins inactivés	42
4.2	Vaccins vivants atténués	43
4.2.1	Vaccins viraux non-recombinants.	44
4.3	Vaccins sous-unitaires	46
4.4	Limitations actuelles et prospectives	46
4.5	Vaccins viraux recombinants	47
4.5.1	Ingénierie des génomes des paramyxovirus	47
4.5.2	Vecteurs dérivés de paramyxovirus	48
4.5.3	Vaccins hMPV recombinants	49
4.6	Autres stratégies vaccinales	51
4.7	Considérations et perspectives sur le développement des vaccins paramyxovirus	51
5	Utilisation des protéines F dans les vecteurs oncolytiques	54
Résultats et Discussion		58
1	Introduction	60
2	Article 1 : Caractérisation d'un résidu clé pour le phénotype hyperfusogène de la glycoprotéine de fusion du virus parainfluenza humain de type 2.	64
2.1	Introduction	64
2.2	Article	66
2.2.1	Characterization of a key residue for hyperfusogenic phenotype in human parainfluenza type 2 (hPIV-2) fusion glycoprotein	66
2.2.2	Supplementary data	72
2.2.3	Analyse des résultats	74
2.3	Discussion et perspectives	75
3	Article 2 : Evaluation de mutations hyperfusogènes sur la protéine F de hMPV	80
3.1	Introduction	80
3.2	Article en préparation	82
3.2.1	Hydrophobic mutations in Heptad-Repeat domains of the human metapneumovirus F glycoprotein improve its hyperfusogenic activity	82

3.2.2	Summary	83
3.2.3	Introduction	84
3.2.4	Material & Methods	86
3.2.4.1	Cell lines, virus strains and plasmids	86
3.2.4.2	hMPV F gene extraction, cloning and site-directed mutagenesis	86
3.2.4.3	Syncytia assay	87
3.2.4.4	Quantitative Fusion assay	87
3.2.4.5	Flow cytometry	87
3.2.4.6	Recovery of recombinant virus	88
3.2.5	Results	89
3.2.5.1	Mutation design	89
3.2.5.2	Syncytium assays	89
3.2.5.3	Quantitative cell-cell fusion assay.	90
3.2.6	Discussion	92
3.2.6.1	Perspectives of this work.	92
3.2.7	Acknowledgments	93
3.2.8	Figures	94
3.2.9	Supplementary data	99
3.3	Discussion et perspectives	100

4 Article 3 : Des vecteurs adénoviraux réplicatifs exprimant une protéine fusion optimisée de parainfluenza de type 5 (PIV-5) permettant une suppression efficace de cellules tumorales 104

4.1	Introduction	104
4.2	Article soumis pour publication	105
4.2.1	Enhanced tumor cell killing through replication-competent adenoviral vectors expressing engineered Parainfluenza type 5 fusion membrane glycoproteins	105
4.2.2	Abstract	106
4.2.3	Introduction	107
4.2.4	Results	109
4.2.4.1	Construction and production of replication-competent fusogenic adenoviruses	109
4.2.4.2	Fusogenic vectors induce fusion of tumor cells	109
4.2.4.3	rAd.Fus vectors show enhanced cytolytic potency in vitro	111
4.2.4.4	rAd.Fus10.2 exhibits enhanced antitumoral efficacy following intratumoral administration in vivo	111

4.2.4.5	rAd.Fus10.2 exhibits enhanced antitumoral efficacy following intratumoral administration in vivo in a immunocompetent model	112
4.2.5	Discussion	114
4.2.6	Materials and methods	117
4.2.6.1	Cell lines	117
4.2.6.2	Generation of replication-competent and hyperfusogenic adenoviruses	117
4.2.6.3	Syncytia assay and confocal microscopy	118
4.2.6.4	Quantitative fusion assays	118
4.2.6.5	Cytotoxicity assays	118
4.2.6.6	In vivo efficacy studies	119
4.2.6.7	Intratumoral adenovirus and syncytia detection	119
4.2.7	References	120
4.2.8	Figures	124
4.3	Discussion et perspectives	135
5	Technique : utilisation de nanoparticules fluorescentes pour quantifier la fusion intercellulaire	138
5.1	Introduction	138
5.2	Matériel et méthodes	140
5.2.1	Nanoparticules	140
5.2.2	Intégration des nanoparticules dans les cellules	140
5.2.3	Test de cytotoxicité	140
5.2.4	Infection par hPIV-2	140
5.2.5	Observation en microscopie confocale	141
5.3	Résultats	142
5.3.1	Test de viabilité cellulaire	142
5.3.2	Conservation des nanoparticules nano-NX2-Cy5 dans les cellules	143
5.3.3	Nanoparticules nano-NX2-Cy5 et nano-NX2-FICI dans les cellules LLC-MK2	145
5.4	Exploitation automatisée des résultats	147
5.5	Conclusion	148
6	Revue : les développements récents des vaccins recombinants paramyxovirus atténués	150
6.1	Introduction	150
6.2	Article de revue	150
	Bilan et Perspectives Générales	172

<i>Conclusion générale</i>	176
<i>Bibliographie</i>	180

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Arbre phylogénique des membres représentatifs de la famille des <i>Paramyxoviridae</i> ...	10
Figure 2 : représentation schématique d'un virion de paramyxovirus.	11
Figure 3 : Représentation schématique de l'organisation génomique de certains paramyxovirus	12
Figure 4 : Cycle de réplication des paramyxovirus.	14
Figure 5 : Les différentes voies d'entrée des virus enveloppés.....	17
Figure 6 : Représentation schématique de la protéine de fusion F des paramyxovirus.	21
Figure 7 : Les différentes formes de la protéine F, pré et post-fusion.	23
Figure 8 : Représentation des changements de conformation des GP-I et GP-II menant à la fusion membranaire.....	24
Figure 9 : Les différents modèles d'activation par HN	29
Figure 10 : Comparaison des structures des différentes GP de fusion.....	30
Figure 11 : Étapes d'entrée dans la cellule pouvant potentiellement être ciblées par des antiviraux	37
Figure 12 : Représentation schématique de la protéine de fusion F des paramyxovirus et d'un système de génétique inverse	48
Figure 13 : Adaptation de la figure supplémentaire de l'article 1	72
Figure 14 : Vue détaillée des interactions avec le résidu F103 de la chaîne B de F PIV-5.	76
Figure 15 : Alignement des régions HR de F de virus représentatifs des paramyxovirus	101
Figure 16 :Déficiência de la réplication du virus hMPV CAN98-75 GFP mutant F-HR.	102
Figure 17 : Viabilité cellulaire après l'intégration de nanoparticules dans des cellules A549. ...	142
Figure 18 : Formation de syncytiums après l'intégration de nano-NX2-Cy5Cl de cellules LLC-MK2 infectées par hPIV-2	144
Figure 19 : Conservation des nanoparticules au sein des cellules.....	145
Figure 20 : Observation de syncytiums de cellules LLC-MK2 portant des nanoparticules après infection par hPIV-2.....	146
Figure 21 : Schéma de la quantification de la fusion sur une image.....	147

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques de virus enveloppés pathogènes et récepteurs cellulaires nécessaire à leur entrée	19
--	----

ABREVIATIONS

6HB,	faisceau de six hélices	L,	grande polymérase
ADN,	acide désoxyribonucléique	LRT,	tractus respiratoire inférieur
aMPV,	métapneumovirus aviaire	M,	protéine de matrice
ARN,	acide ribonucléique	M2-1,	protéine M2-1
<i>att</i> ,	atténué	M2-2,	protéine M2-2
bPIV-3,	parainfluenza bovin de type 3	MeV,	virus de la rougeole
bRSV,	virus respiratoire syncytial	MuV,	virus des oreillons
	bovin	N,	protéine de la nucléocapside
C,	protéine C	NCT,	Identifiant d'essai clinique
CDV,	virus de la maladie de Carré		ClinicalTrials.gov
CDC,	Center for Disease Control and Prevention	NDV,	virus de la maladie de Newcastle
F,	glycoprotéine de fusion	NiV,	virus Nipah
FDA,	food and drug administration; agence fédérale étasunienne	NS1,	protéine non-structurale 1
FI-hRSV,	hRSV inactivé par la formoline et précipité par l'alun.	NS2,	protéine non-structurale 2
PF,	peptide fusion	P,	phosphoprotéine
G, H, HN	glycoprotéines d'attachement	PIV-5,	parainfluenza de type 5
GP,	glycoprotéine	PS,	peptide signal
HeV,	virus Hendra	RC,	rat des cotonniers
hMPV,	métapneumovirus humain	RdRp,	polymérase à ARN dépendante de l'ARN
hPIV,	virus parainfluenza humain	RIG-1,	protéine « rétinolique acid-inducible gene 1 »
hPIV-1,	virus parainfluenza humain de type 1	RPV,	virus de la peste bovine (Rinderpest Virus)
hPIV-2,	virus parainfluenza humain de type 2	SC,	site de clivage
hPIV-3,	virus parainfluenza humain de type 3	SeV,	virus Sendai
hPIV-4,	virus parainfluenza humain de type 4	SH,	petite glycoprotéine hydrophobe
HRA,	domaine heptad repeat A	SR,	singe rhésus
HRB,	domaine heptad repeat B	SVA,	Singe vert Africain
hRSV,	virus respiratoire syncytial	TM,	domaine transmembranaire
ICTV,	Comité International chargé de la Taxonomie des Virus	URT,	tractus respiratoire supérieur
		VLP,	virus-like particle, ou pseudo-particule virale
		WT,	sauvage

Nota : pour plus de cohérence par rapport aux sources et aux nomenclatures de l'ICTV (Viruses 2011), certaines abréviations utilisées, notamment pour les noms des virus, sont dérivées du nom anglais.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Les infections virales respiratoires constituent actuellement l'une des premières causes de mortalité au niveau mondial. L'Organisation Mondiale de la santé (OMS) estime que les infections des voies respiratoires inférieures sont la troisième cause de mortalité dans les pays en voie de développement ou sous-développés, et la cinquième cause la plus fréquente parmi les pays développés (2009). Plusieurs facteurs sont responsables de ces infections respiratoires, et les agents étiologiques les plus communément impliqués sont les bactéries et les virus.

Les virus sont des parasites intracellulaires. Afin de se répliquer, ils doivent investir une cellule hôte et en détourner à leur profit les machineries moléculaires fondamentales. A l'exception notable de certains virus non enveloppés comme les adénovirus, les rhinovirus et le virus BK, la plupart des infections respiratoires sont causées par des virus enveloppés. Ceux-ci sont retrouvés dans un grand nombre de familles virales, tels que les *Baculoviridae* et les *Herpesviridae*, qui possèdent un génome à ADN, ou les *Flaviviridae*, les *Orthomyxoviridae* et les *Retroviridae*, qui possèdent un génome à ARN (voir *tableau 1*, page 19). Comme leurs noms l'indiquent, ces virus possèdent une enveloppe, ou *peplos*, qui est composée d'une bicouche lipidique provenant d'une membrane de cellule infectée, d'où le virus a bourgeonné. Cette enveloppe, qui peut être d'origine plasmique ou endocellulaire en fonction de l'espèce virale, est associée à des protéines transmembranaires (TM) virales et cellulaires de l'hôte. Malgré leur grande diversité, les virus enveloppés ont mis en place au cours de l'évolution, des stratégies similaires d'entrée dans leurs cellules hôtes respectives.

Parmi ces virus, les pathogènes respiratoires les plus connus sont les virus influenza. Ce sont des virus à ARN simple brin de la famille des *Orthomyxoviridae*. Il existe cependant une très grande variété d'autres virus respiratoires pathogènes, pouvant causer de graves infections respiratoires chez l'homme. Leur impact économique s'avère parfois important, notamment en termes d'hospitalisation.

Certaines infections virales, considérées comme émergentes, font la « une » des médias. C'est le cas du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS), causé par un virus de la famille des Coronavirus inconnu jusqu'alors, le SARS-CoV (Fouchier *et al.* 2003, Lee *et al.* 2003). Celui-ci a émergé en Chine en 2002 causant 774 décès, pour 8098 personnes infectées selon le CDC (CDC 2005). Cette épidémie avait été contenue grâce à une action rapide de l'OMS. Cette année 2013, un nouveau Coronavirus, jamais identifié auparavant, le MERS-Co, cause une épidémie. Ce virus se transmet plus difficilement à l'homme, mais la mortalité des sujets infectés est très élevée. Ce virus touche principalement la péninsule arabique, surtout l'Arabie Saoudite où il a

causé une quarantaine de décès depuis 2012, ainsi que l'Europe dans une moindre mesure (CDC 2013, OMS 2013).

Par ailleurs, une autre famille virale appartenant à l'ordre des *Mononegavirales*, les *Paramyxoviridae*, comprend plusieurs membres qui sont responsables de très nombreux cas d'hospitalisation pour des affections des voies respiratoires, notamment chez les enfants. Il s'agit des virus parainfluenza humains de type 1, 2, 3, 4a et 4b (hPIV-1, hPIV2, hPIV-3, hPIV-4a et hPIV-4b), du virus de la rougeole (MeV), du virus respiratoire syncytial humain (VRS, qui sera décrit dans ce manuscrit sous son abréviation anglophone hRSV) et du métapneumovirus humain. Ce dernier virus ayant été découvert en 2001 (van den Hoogen *et al.* 2001, Boivin *et al.* 2003), il n'est pas exclu que d'autres membres de cette famille soient découverts dans les années à venir. Dans le cadre de mon travail de thèse, nous nous sommes intéressé plus particulièrement aux virus hPIV-2 et hMPV, et donc plus globalement aux virus parainfluenza et au genre *Pneumoviridae*.

Comme nous le verrons ci-après, peu de traitements prophylactiques sont disponibles pour répondre aux infections causées par ces virus, et aucun traitement curatif spécifique n'existe actuellement. Le seul vaccin disponible commercialement contre ce type d'infection virale est le vaccin contre la rougeole (MeV). Il existe aussi un anticorps recombinant qui peut être utilisé de façon prophylactique contre les infections hRSV. Il est donc essentiel de développer de nouveaux traitements pouvant prévenir et/ou traiter les infections causées par les paramyxovirus respiratoires. C'est dans cette perspective de développement que j'ai mené mon travail doctoral.

1 Historique des paramyxovirus respiratoires

La culture des virus s'est développée lorsque la culture *in vitro* de cellules animales a été mise au point ; auparavant seuls les virus s'amplifiant sur œufs embryonnés de poule, pouvaient être produit. C'est donc à partir des années 50 que l'isolement de nouvelles souches virales et notamment de virus respiratoires, a été possible.

Le virus respiratoire syncytial humain (hRSV) a été initialement isolé par un groupe de recherche de l'armée américaine en 1956 à partir de colonies de chimpanzés souffrant de coryza, sous le nom de Chimpanzee Coryza Agent (Morris *et al.* 1956). Il a été très vite démontré que ce virus pouvait être isolé à partir d'écouvillonnage du tractus respiratoire de nourrissons atteint de maladie respiratoire, sur des lignées de cellules KB issues de carcinome humain (Chanock and Finberg 1957, Chanock *et al.* 1957, Chanock *et al.* 1958). Le Chimpanzee Coryza Agent changera dès lors de nom et sera par la suite nommé RSV (Rowe and Michaels 1960). Tout d'abord suspecté de n'infecter que les jeunes enfants, le virus hRSV, se révélera être une des causes majeures d'hospitalisation pour les infections respiratoires, y compris chez les adultes. Par la suite, la découverte d'anticorps neutralisants contre hRSV dans des sérums bovins (Doggett *et al.* 1968) a conduit à la découverte d'un virus respiratoire syncytial chez les bovins (bRSV) (Inaba *et al.* 1970, Paccaud and Jacquier 1970).

A partir de cette époque, de nombreux autres virus ont ainsi été découverts, et il s'est posé la question de leur classification. Celle-ci se basait alors sur des critères de pathogénicité, de morphologie et de certaines caractéristiques physiques, biologiques et/ou biochimiques. Le virus RSV a été initialement classifié dans le groupe des *Myxovirus*. Ce groupe réunit les virus semblables aux virus Influenza (Andrewes *et al.* 1955) tels que les virus CA (*Croup-Associated*) (Chanock 1956), et HA1/HA2 (Chanock *et al.* 1958). Ces virus étaient notamment remarquables pour leur faculté d'hémagglutination à faible température, c'est-à-dire d'agglutination des globules rouges humains et de poulet à 4°C, en formant un réseau de globules. De plus, ces virus étaient capables de se détacher des globules rouges à 37°C, et donc de détruire le réseau, ce qui les différencie des virus Influenza.

En 1959, l'équipe qui avait proposé le groupe *Myxovirus* propose de différencier définitivement ces derniers virus des virus influenza. Le sous-groupe Parainfluenza a ainsi été créé, et les virus HA-2, CA et HA-1 ont été renommés hPIV-1, 2 et 3, respectivement. Le virus murin de Sendai (SeV) (Kuroya and Ishida 1953, Kuroya *et al.* 1953), dans un premier temps

confondu avec hPIV-1 pour ses caractéristiques sérologiques proches, a lui aussi été classé dans ce groupe. La caractérisation de ce virus a été sujette à controverse. L'équipe l'ayant isolé avait inoculé des souris avec un échantillon humain provenant d'un enfant avec une infection respiratoire. Elle l'avait tout d'abord nommé le virus de la pneumonie du nouveau-né, type Sendai. Il s'agissait en fait d'un virus murin, cependant très proche du virus humain, provenant d'une infection préexistante chez la souris. La controverse a duré plusieurs années car les souris infectées avec SeV produisent également des anticorps capable de neutraliser le virus hPIV-1.

Les virus des oreillons (MuV) et de la maladie de Newcastle (NDV), furent eux aussi par la suite associés au sous-groupe des virus Parainfluenza (Karron and Collins 2007). Le virus parainfluenza de type 4 (hPIV-4), découvert un an plus tard par le groupe de Chanock (Johnson *et al.* 1960), fut également inclus dans ce groupe. Les virus parainfluenza de type 5 (PIV-5) et parainfluenza bovin de type 3 (bPIV-3) sont quant à eux des virus infectant les animaux, particulièrement les chiens (*kennel cough*), porcs, chats, hamsters et cochon d'Inde. Le virus PIV5 est aussi un contaminant fréquent des cellules de singes, d'où son nom d'origine SV5 (Simian Virus 5). Ce n'est que récemment que l'emploi du nom PIV-5 a été adopté (Chatziandreou *et al.* 2004), du fait de sa proximité génétique avec le virus hPIV-2. Avec l'évolution de la technologie et la capacité de séquençage haut débit, le sous-groupe Parainfluenza a aujourd'hui disparu. Ce nom ne représente plus que certains Paramyxovirus des genres *Rubulavirus* et *Respirovirus*. La classification des *Paramyxovirus* sera présentée dans le chapitre suivant.

Le virus hMPV est le virus le plus récemment découvert. Ce virus a été isolé et identifié en 2001 par l'équipe d'Ab Osterhaus aux Pays-Bas, à partir d'échantillons collectés sur 28 enfants avec des infections respiratoires supérieures conduisant à des bronchiolites ou des pneumonies (van den Hoogen *et al.* 2001). Ce virus a été découvert grâce à l'utilisation d'une technique de biologie moléculaire, la RAP-PCR (*RNA Arbitrarily Primed PCR*), permettant d'identifier des virus inconnus en culture cellulaire. Cependant, des sérums datant des années 50 ont été rétrospectivement testés positivement pour le virus hMPV (van den Hoogen *et al.* 2001). Ceci démontre que ce virus circulait dans la population humaine depuis bien plus longtemps. Cette caractérisation tardive du virus hMPV est peut-être due au fait qu'il ne se réplique pas aisément en culture cellulaire ; les effets cytopathiques n'apparaissent généralement qu'après 17 jours de culture à partir d'aspiration nasopharyngées. De plus, très peu de lignée cellulaires sont permissives à l'infection hMPV ; la lignée LLC-MK2 permettant la réplication du virus *in vitro*, est relativement peu utilisée en diagnostic viral (Boivin *et al.*

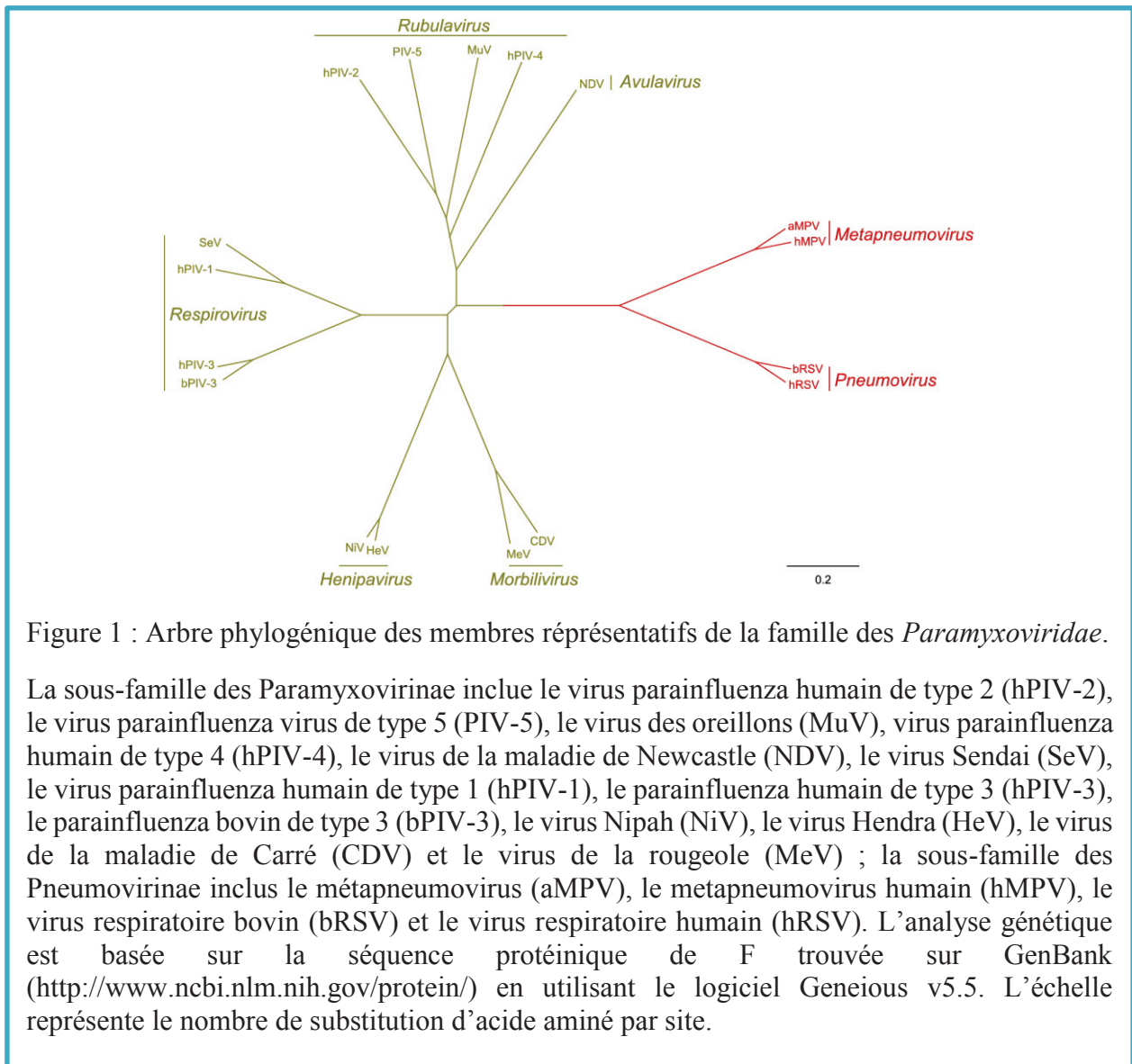
2002, Peret *et al.* 2002). Les analyses génétiques, basées sur la similarité entre les gènes ou les génomes, ont permis de classer sans ambiguïté ce virus parmi les *Paramyxovirus*, dans la sous-famille *Pneumovirus* à laquelle appartient le virus hRSV. Cependant, il forme un nouveau groupe nommé *Métapneumovirus*, avec le métapneumovirus aviaire (AMPV). Cela est notamment lié à l'absence des gènes NS1 et NS2, spécifiques au *Pneumovirus*.

L'analyse de plusieurs isolats de hMPV démontre que les souches peuvent être classées selon deux génotypes distincts (A et B), tout comme hRSV (van den Hoogen *et al.* 2001, Boivin *et al.* 2002, Peret *et al.* 2002, Bastien *et al.* 2003, Biacchesi *et al.* 2003). L'alignement complet des génomes indique que les deux groupes sont identiques à 80 % en nucléotides et à 90 % en acides aminés (Tableau 1) (Biacchesi *et al.* 2003). La variabilité entre ces derniers se retrouve principalement dans les gènes SH et G (van den Hoogen *et al.* 2002, Biacchesi *et al.* 2003, Ishiguro *et al.* 2004, Peret *et al.* 2004, van den Hoogen *et al.* 2004), alors que les gènes N, P, M et F sont beaucoup plus conservés (Bastien *et al.* 2003, Biacchesi *et al.* 2003). Effectivement, les protéines SH et G des deux génotypes ne sont similaires qu'à 59 et 37 %, respectivement, alors que les autres gènes ont des similitudes de séquence de 94.1 à 97.6 %. Le hRSV présente aussi une très grande variabilité au niveau des protéines SH et G (72 et 55% d'identité en acides aminés entre les deux groupes) (Johnson *et al.* 1987, Teng *et al.* 2001). Chez ce dernier virus, les génotypes A et B correspondent aussi à deux groupes antigéniques différents (Coates *et al.* 1966). Une étude effectuée chez le hMPV a révélé que les deux génotypes pourraient correspondre aussi à deux groupes antigéniques distincts. Des essais de neutralisation à partir de sérums de furets montrent en effet une différence de neutralisation entre les deux génotypes (van den Hoogen *et al.* 2004). Cependant, suite à un essai de neutralisation et d'infection chez le hamster, un autre groupe de recherche a affirmé le contraire et postule qu'il y aurait seulement un groupe antigénique (Skiadopoulos *et al.* 2004). Finalement, il s'avère que des études complémentaires sont nécessaires afin de confirmer si les deux génotypes du hMPV correspondent aussi à deux groupes antigéniques.

2 Description des virus

2.1 Classification et caractéristiques

Au sein de l'ordre des *Mononegavirales*, la famille des *Paramyxoviridae* comprend un grand nombre de virus pathogènes, pour les humains et les animaux, ayant un impact très important sur la santé publique et l'économie. Dans cette famille, de nombreux virus sont responsables de maladies respiratoires chez les humains, allant jusqu'à des infections aigües des voies respiratoires inférieures. Le plus souvent ce sont de jeunes enfants, des personnes âgées et des patients immunodéprimés qui en sont victimes (Collins and Crowe 2007, Karron and Collins 2007, Lamb and Parks 2007).



Les analyses phylogénétiques permettent de mettre en évidence deux sous-familles virales chez les *Paramyxoviridae* (Figure 1). La sous-famille *Pneumovirinae* inclut le virus respiratoire humain (hRSV) et le métapneumovirus humain (hMPV), eux-mêmes classés dans le genre *Pneumovirus* pour le premier et *Metapneumovirus* pour le second. La sous-famille des *Paramyxovirinae* comporte beaucoup plus de membres, dont de nombreux virus non-respiratoires. On y retrouve également les virus parainfluenza (hPIV) qui sont responsables de maladies respiratoires majeures. Les hPIV types 1 et 3 appartiennent au genre *Respirovirus*, alors que les hPIV-2 et hPIV-4 se classent dans le genre des *Rubulavirus*. Mon travail de thèse a porté principalement sur le virus hPIV-2 et le virus hMPV.

Comme tous les virus de cet ordre, ce sont des virus enveloppés avec un génome ARN simple brin non segmenté de polarité négative qui se répliquent entièrement dans le cytoplasme. La taille de leurs génomes varie de 15 Kb à 19 Kb et code pour l'expression de huit (hPIV-1, -2 et -4) et douze (SeV) protéines virales. Il n'y a que six protéines qui sont communes à tous les paramyxovirus, incluant deux glycoprotéines impliquées dans l'entrée cellulaire du virus :

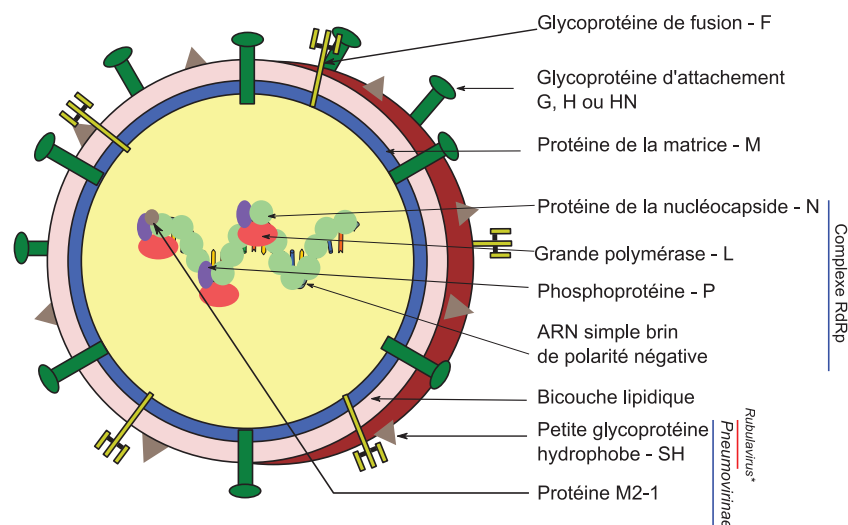


Figure 2 : représentation schématique d'un virion de paramyxovirus.

Le complexe de l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) est composé de l'ARN simple brin recouvert par la nucléocapside (N) et de complexes polymérases comprenant la grande polymérase (L), la phosphoprotéine (P), et la protéine M2-1 pour les Pneumovirinae.

* La protéine SH est présente chez tous les Pneumovirinae et quelques Rubulaviruses (comme PIV-5 et MuV).

La figure n'est pas à l'échelle.

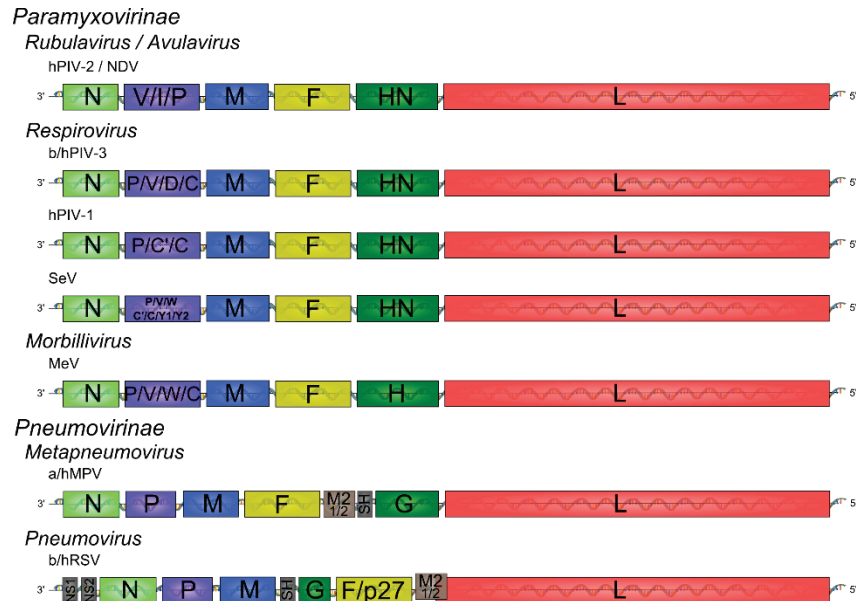


Figure 3 : Représentation schématique de l'organisation génomique de certains paramyxovirus

Chez les Paramyxovirinae, les protéines accessoires V, I, D, C, C', W, Y1 ou Y2 sont transcrites à partir du cadre ouvert de lecture du gène P et subissent une édition de l'ARNm. Certaines protéines sont spécifiques des membres de la sous-famille Pneumovirinae, comme M2-1 et M2-2, et plus spécifiquement aux Pneumovirus pour les protéines non-structurale 1 et 2 (NS1 et NS2)

La figure n'est pas à l'échelle.

la glycoprotéine d'attachement appelée HN, H ou G selon les espèces virales, et la protéine de fusion (F). La protéine de la matrice (M) recouvre la face interne de l'enveloppe virale et joue un rôle important dans l'assemblage et le bourgeonnement du virus. Trois protéines sont associées avec l'ARN monocaténaire génomique, et formeraient un complexe hélicoïdal (Seol *et al.* 2007). Ces protéines sont la nucléocapside (N), la phosphoprotéine (P) et la polymérase (L). Ce complexe associé à la protéine M2 pour les *Pneumovirinae*, est appelée ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) (Figure 2) (Lamb and Parks 2007).

Il existe des protéines spécifiques à certains représentants des paramyxovirus. En plus des deux glycoprotéines déjà décrites ci-dessus, la petite protéine transmembranaire hydrophobique SH (comme *Small Hydrophobic protein*) se retrouve à la surface des virus hMPV et hRSV. C'est également le cas de quelques membres du genre *Rubulavirus*, comme le virus parainfluenza de type 5 (PIV-5) et le virus des oreillons (MuV). Le rôle de cette protéine n'est pas très bien connu et sa délétion n'affecte que très peu la réplication virale *in vitro* et *in vivo* (Bukreyev *et al.* 1997, He *et al.* 1998, Whitehead *et al.* 1999, Feuillet *et al.* 2011). Certaines

études pointent cependant un rôle de SH dans la réplication, avec une stimulation des voies apoptotiques cellulaires lorsque cette protéine n'est pas exprimée lors d'une infection PIV-5 ou MuV (Lin *et al.* 2003, Wilson *et al.* 2006).

2.2 Le cycle viral et l'équipement protéique des virus

L'entrée des paramyxovirus dans la cellule s'effectue en deux étapes principales : suite à l'attachement du virion à la surface de la cellule, l'enveloppe virale fusionne avec la membrane cellulaire. Ce sont les glycoprotéines de surfaces qui sont la clé de l'entrée du virus dans les cellules, et plus particulièrement la protéine F en provoquant la fusion membranaire. Les paramyxovirus expriment une seconde glycoprotéine à leur surface, appelée glycoprotéine d'attachement (HN, H ou G), capable de se fixer à un récepteur de la cellule cible chez la plupart des *paramyxovirus*. Le mode d'entrée des virus enveloppés, ainsi que les glycoprotéines de surface, seront abordés plus en détail dans un paragraphe spécifique (2.3, page 15).

Après la fusion des membranes virale et cellulaire, le génome est injecté dans le cytoplasme où l'ARN de polarité négative sera directement transcrit par le complexe viral RdRp embarqué (Figure 4). La transcription commence de manière linéaire à partir d'un seul site à l'extrémité 3' de l'ARN génomique. Puis il stoppe à la fin de chaque gène pour induire la polyadénylation de l'ARNm nouvellement synthétisé. Le processus appelé transcription '*stop-start*' est dépendant de certains gènes de régulation qui modulent son efficacité. Ainsi, il y a un gradient décroissant de la transcription des gènes à partir de l'extrémité 3'. La réinitialisation du complexe RdRp ne se faisant pas systématiquement entre deux gènes, les gènes proches de l'extrémité 3' de l'ARN génomique sont les plus abondamment transcrits (Easton *et al.* 2004).

Le gène M2 des *Pneumovirinae* code pour deux cadres de lectures chevauchant. M2-1 est un facteur d'élongation transcriptionnelle qui est essentiel au cycle viral (Fearn and Collins 1999). L'accumulation du produit M2-2 semble avoir un rôle dans la balance entre la transcription et la réplication de génome viral (Bermingham and Collins 1999, Schickli *et al.* 2008). Bien qu'un antigénome d'ARN de polarité positive semble être produit très tôt dans le processus de réplication, il est probable qu'un signal permette le basculement de l'activité du complexe de la réplication vers la synthèse d'antigénome. Ce signal pourrait être constitué par l'accumulation de la protéine N dans le cytoplasme, mais également par M2-2 pour les *Pneumovirinae*, qui jouerait ainsi le rôle d'un interrupteur sur le complexe RdRp. Des études complémentaires restent nécessaires pour une meilleure compréhension des mécanismes

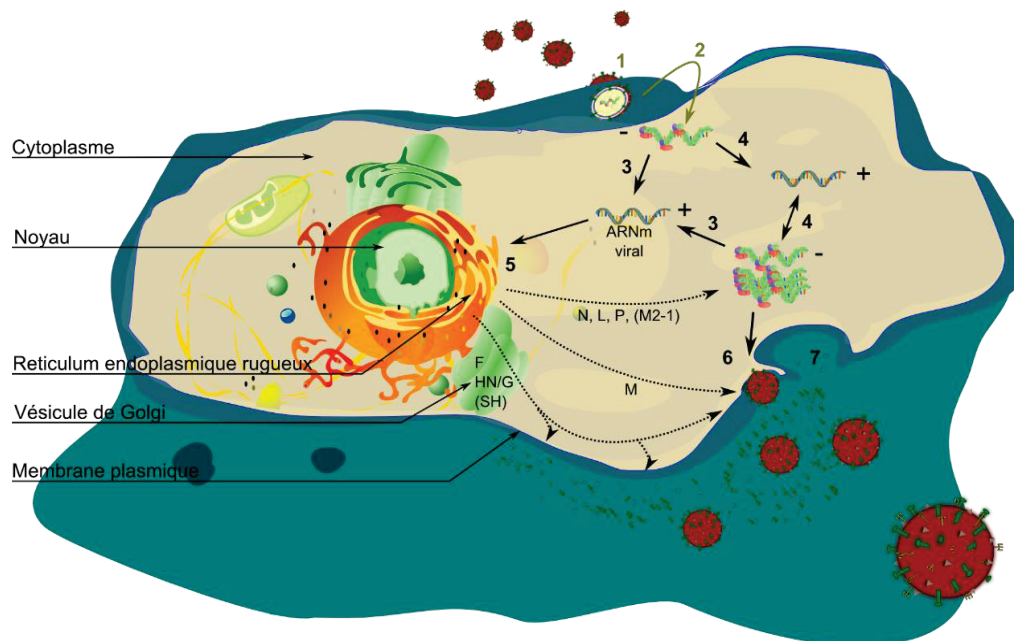


Figure 4 : Cycle de réplication des paramyxovirus.

Après la liaison des glycoprotéines aux récepteurs cellulaires (1), la protéine F provoque la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de la cellule hôte, relarguant ainsi la nucléocapside génomique virale (ARN négatif simple brin) dans le cytoplasme (2). La transcription en ARNm de polarité positive est assurée par le complexe RdRp (incluant M2-1 pour les *Pneumovirinae*) (3). La réplication du génome, par la création d'un antigénome ARN simple brin de polarité positive, est aussi assurée par le complexe RdRp (4). Après la traduction dans le reticulum endoplasmique rugueux (5), les glycoprotéines de surface (incluant SH pour les *Pneumovirinae* et quelques *Rubulavirus*) transitent par l'appareil de Golgi pour être exprimés sur la membrane à la surface de la cellule. La nucléocapside nouvellement formée ainsi que la protéine M sont assemblés à l'intérieur de la membrane cellulaire (6) avant le bourgeonnement de la progéniture virale (7).

Schéma adapté de **Le Bayon et al. 2013**

moléculaires régissant la réplication et la transcription virales. La dernière étape cellulaire du cycle consiste en l'assemblage des génomes nouvellement synthétisés avec les protéines virales : ce processus se déroule au niveau de la face interne de la membrane cellulaire, à partir de laquelle les particules virales vont bourgeonner (Karron and Collins 2007, Lamb and Parks 2007, Feuillet *et al.* 2011).

La protéine C est retrouvée chez les *Respirovirus* uniquement, comme hPIV-1 et hPIV-3. La plupart des études concernant son rôle fonctionnel ont été rapportées lors de l'infection de souris par le virus murin SeV. Cette protéine jouerait un rôle lors de l'évasion du virus vis-à-vis de la réponse immunitaire cellulaire, en inhibant la réponse interféron de l'hôte, ainsi que la

réponse apoptotique. Elle pourrait également empêcher la production d'ARN double brin (ARNdb) lors du cycle viral (Takeuchi *et al.* 2008, Irie *et al.* 2010). Son rôle semble essentiel lors de l'infection *in vivo*. En effet, bien que la protéine C ne soit pas essentielle *in vitro*, sa présence est requise pour une réplication virale efficace chez les primates non-humains (Bartlett *et al.* 2008).

Certains *Paramyxovirinae* codent également pour la protéine V, grâce à un gène chevauchant la séquence du gène P. La protéine V de *Rubulavirus* est une protéine non-structurale qui bloque l'induction de la voie de signalisation de réponse interféron ; la protéine V des *Respirovirus* est beaucoup moins abondante lors de l'infection et non structurale. Les produits I (*Rubulavirus*) et D (hPIV-3) sont issus de l'édition de l'ARNm et des protéines non structurales partageant le domaine N-terminal de P.

Les protéines NS1 et NS2 sont des protéines non-structurales présentes uniquement chez les Pneumovirus. Elles semblent moduler la réponse immune cellulaire contre l'infection. En effet NS1 et NS2 ont été décrites comme des suppresseurs de l'induction de réponse interféron de type I et III (Bossert *et al.* 2003, Spann *et al.* 2004) ainsi que de la réponse des cellules T cytotoxiques (Kotelkin *et al.* 2006).

2.3 L'entrée cellulaire des virus

2.3.1 Les récepteurs cellulaires

L'entrée dans la cellule de tous les virus enveloppés partage des similarités et peut être décomposée en deux étapes essentielles. Dans un premier temps, le virus s'attache à la surface d'une cellule. Cette étape essentielle nécessite des GP virales, dite d'attachement. Elles permettent non seulement aux virus de s'attacher à la surface des cellules hôte (*voir* Figure 5, page 17 *et* Tableau 1, page 19), mais définissent également leur tropisme cellulaire, de par leur affinité à un récepteur membranaire particulier. Ces récepteurs sont variés au sein des paramyxovirus. Dans le cas du virus Hendra (HeV) par exemple, un paramyxovirus qui provoque des encéphalites fatales, sa glycoprotéine G reconnaît l'éphrine-B2 comme récepteur cellulaire. Elle lui confère un tropisme pour les cellules endothéliales et les neurones qui expriment spécifiquement cette protéine TM (Negrete *et al.* 2005).

Pour d'autres virus enveloppés appartenant à d'autres familles virales, un corécepteur cellulaire est également impliqué dans le mécanisme d'entrée virale. C'est le cas notamment du

virus HIV-1, qui interagit avec l'immunoglobuline CD4 (récepteur) et un corécepteur (CCR-5 ou CXCR-4) (Tableau 1). Cela ne semble pas être le cas pour les paramyxovirus. Cependant, les récepteurs utilisés par ces virus sont encore relativement méconnus, en particulier pour les *Pneumovirinae*, et la présence d'un corécepteur ne peut être exclue. Dans cette hypothèse, il est à noter que la protéine G pourrait ne pas être impliquée dans l'attachement cellulaire du virus à un récepteur, la protéine F étant suspectée d'en être responsable (Biacchesi *et al.* 2004, Biacchesi *et al.* 2005). Par ailleurs, il est également envisageable que plusieurs récepteurs distincts soient engagés, bien qu'aucune observation actuelle ne puisse confirmer cette hypothèse. Les *Pneumovirinae*, dont les protéines F et G semblent se lier à des récepteurs différents (Techaarpornkul *et al.* 2002, Thammawat *et al.* 2008, Chang *et al.* 2012), pourraient nécessiter ce double engagement.

Les récepteurs cellulaires de hMPV et hRSV ne sont pas encore totalement caractérisés. Des glycosaminoglycanes (GAG), comme les héparane-sulfate (HS) et la nucléoline sous sa forme membranaire, semblent avoir un rôle important dans l'entrée cellulaire de hRSV (Tayyari *et al.* 2011). De plus, l'intégrine $\alpha\beta 1$ et les héparane sulfate ont été récemment identifiés comme des récepteurs de hMPV (Tableau 1) (Cseke *et al.* 2009, Chang *et al.* 2012). De plus les virus recombinants hRSV et hMPV qui n'expriment pas la protéine G, sont tout à fait capables d'infecter des cellules *in vitro* (Teng *et al.* 2001) ainsi qu'*in vivo* (Cseke *et al.* 2009). Cette observation appuie l'hypothèse que la protéine de fusion F des *Pneumovirinae* semble être impliquée dans l'attachement aux récepteurs cellulaires plutôt que la protéine G.

Parmi les virus parainfluenza, ce sont les *Respirovirus* qui ont été les mieux étudiés. C'est particulièrement le cas du SeV, un virus murin étant idéal pour sa propre caractérisation *in vivo* chez son hôte naturel, la souris. Malgré cela, les récepteurs reconnus par le virus sont encore incertains. Il pourrait s'agir des sialoglycoprotéines ou des gangliosides (Suzuki *et al.* 1984, Suzuki *et al.* 1985)

2.3.2 Les voies d'infection de la cellule

Il existe deux voies principales de pénétration des virus enveloppés dans la cellule cible (Figure 5) :

(i) Après l'attachement, la particule virale fusionne son enveloppe directement à la surface de la cellule. C'est la voie d'entrée principale des paramyxovirus (Tableau 1) ; (ii) Alternativement, les virus peuvent être internalisés par un mécanisme d'endocytose et/ou de macropinocytose. L'acidification au sein des endosomes permet l'activation de la protéine de

fusion. Une des protéines les plus étudiées est la GP HA des virus influenza A. Le pH acide l'amène en effet dans un état métastable qui va faciliter les changements conformationnels successifs de celle-ci, nécessaires à la promotion de la fusion (Figure 8A).

Pour la plupart des paramyxovirus, cette fusion semble s'effectuer à la surface de la cellule, sans internalisation du virion. Elle est principalement indépendante du pH (Tableau 1). Cependant, certaines souches de hMPV ont besoin d'un pH acide pour induire la fusion membranaire. Bien que le mécanisme précis reste inconnu à ce jour, cette particularité pourrait supposer une entrée du virus par la voie endocytaire (Herfst *et al.* 2008, Schowalter *et al.* 2009). Il semble également que le NDV soit aussi parfois internalisé par endocytose via la cavéoline lors de son entrée dans la cellule (Cantin *et al.* 2007).

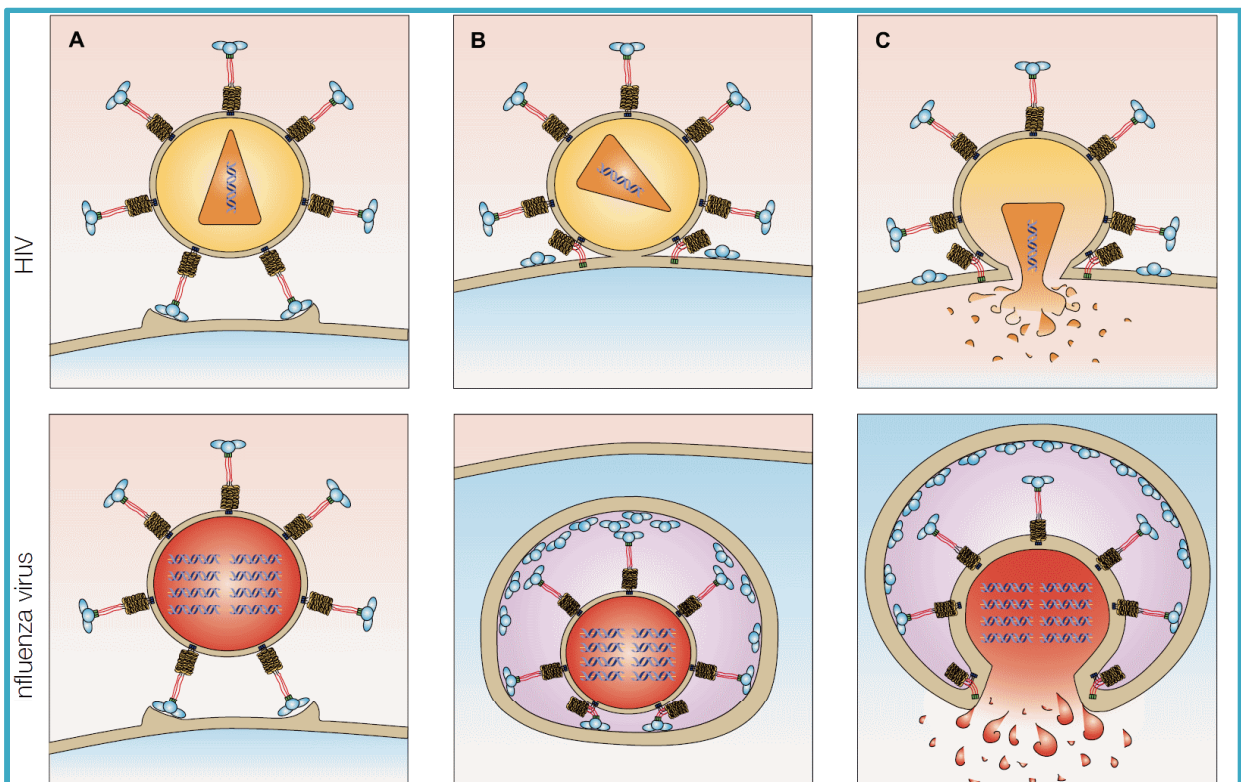


Figure 5 : Les différentes voies d'entrée des virus enveloppés

A| La particule virale s'attache à un récepteur de surface cellulaire grâce à sa ou ses GP d'attachement, ce qui va induire **B|** son internalisation puis l'activation des GP virales de fusion pour influenza (voie endosomale), cette activation peut se faire directement à la surface cellulaire pour HIV-1. La GP activée s'insère dans la membrane cible puis se replie sur elle-même afin de rapprocher les 2 bicouches lipidiques **C|** et provoquer leur fusion et donc l'entrée du matériel génétique viral dans la cellule.

Figure tirée de Barocchi *et al.* 2005

Comme indiqué précédemment, les paramyxovirus sont équipés de deux glycoprotéines impliquées dans l'entrée de la particule virale dans la cellule. La glycoprotéine d'attachement, nommée HN, H ou G selon les virus, et la glycoprotéine de fusion F. Comme son nom l'indique, la première est généralement impliquée dans l'attachement de la particule virale à un récepteur sur la cellule hôte (Tableau 1). Une glycoprotéine d'attachement peut reconnaître plusieurs récepteurs, comme par exemple H de MeV qui peut s'attacher aux récepteurs cellulaires Nectine-4, CD46 et CD150 (Muhlebach *et al.* 2011, Noyce *et al.* 2011). Il est envisageable que les récepteurs cellulaires aient un rôle dans le processus de fusion membranaire proprement dit. Néanmoins, aucune observation actuelle ne peut confirmer cette hypothèse pour les paramyxovirus (Figure 9).

La protéine F est responsable de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. Dans certains cas elle est également impliquée dans l'attachement cellulaire, cette particularité a été décrite pour les virus hRSV et hMPV. Le mécanisme de la fusion entre deux bicouches lipidiques a été décrit et se décompose en trois phases distinctes (Chernomordik *et al.* 1995) : la phase I consiste en un rapprochement des 2 membranes ; la phase II est une étape au cours de laquelle se crée une héli-fusion entre les couches lipidiques externe des membranes cellulaire et virale et enfin, la phase III est constituée par la création d'un pore stable entre les deux membranes. Ce procédé est thermodynamiquement très coûteux en énergie, mais il est rendu possible par l'intervention des GP virales de fusion. De plus la présence de plusieurs trimères de F est nécessaire à la réalisation du pore d'héli-fusion (Harrison, 2008). Comme abordé précédemment, cette fusion peut se produire à la surface de la cellule, ou bien après l'acidification d'un endosome. Cependant le modèle d'héli-fusion resterait identique dans ces deux voies d'infection cellulaire des virus.

Rôle Virus	Attachement*	Fusion*	Récepteurs ¹	Entrée	Nature du génom
Protéines de fusion de classe I					
HeV	G	F ₁ (F ₀)	Éphrine B2	Surface cellulaire	
NDV	HN	F ₁ (F ₀)	Sialoconjugués	Surface cellulaire, endocytose (?)	
hPIV	HN	F ₁ (F ₀)	Sialoconjugués GAG, ?	Surface cellulaire	
hRSV	G, F ₂ (F ₀)	F ₁ (F ₀)	HS ? intégrine $\alpha v \beta 1$	Surface cellulaire ou endocytose selon les souches	
hMPV	F ₁ (F ₀), G	F ₁ (F ₀)	F : RIG-1, intégrine $\alpha v \beta 1$, HS G : GAG ?	pH acide requis pour certaines souches	
<i>Paramyxoviridae</i>					ARN sb -
SRAS-CoV	S ₁ (S ₀)	S ₂ (S ₀)	ACE2	Endocytose, surface cellulaire	
<i>Coronaviridae</i>					ARN sb +
Ébola	GP ₁ (GP ₀)	GP ₂ (GP ₀)	Récepteur du Folate	Endocytose	
<i>Filoviridae</i>					ARN sb -
Influenza A	HA ₁ (HA ₀)	HA ₂ (HA ₀)	Sialoconjugués	Endocytose	
Influenza C	HEF ₁ (HEF ₀)	HEF ₂ (HEF ₀)			
<i>Orthomyxoviridae</i>					ARN sb -
HIV-1	gp120	gp41	CD4, (CCR5, CXCR4)	Surface cellulaire	
<i>Retroviridae</i>	(gp160)	(gp160)			ARN sb +
Protéines de fusion de classe II					
HCV	E2 [§]	E1 [§]	GAG?, LDL-R?, SR-BI, CD81, CLDN1	Endocytose	
<i>Flaviviridae</i>					ARN sb +
SFV	E2 (p62) [§]	E1 [§]	Non identifiés	Endocytose	
<i>Togaviridae</i>					ARN sb +
Protéines de fusion de classe III					
HSV-1	gC, gB	gB, gD, gH-gL	HS (PILR α , HVEM, Nectines...)	Surface cellulaire	
<i>Herpesviridae</i>					ADN db
VSV-G	G	G	Non identifiés	Endocytose	
<i>Rhabdoviridae</i>					ARN sb -

Tableau 1 : Caractéristiques de virus enveloppés pathogènes et récepteurs cellulaires nécessaire à leur entrée.

* Les précurseurs des GP d'attachement et de fusion sont mis entre parenthèses. ¹ Les corécepteurs cellulaires nécessaire à l'entrée des virus sont mis entre parenthèses. [§] Le génome de ces virus code un unique précurseur polyprotéique qui donnera, après clivage, l'ensemble des protéines virales.

2.3.3 *Les glycoprotéines HN et G*

La protéine HN est une protéine glycosylée présentant des activités d'hémagglutination et neuraminidase lui permettant non seulement de se lier mais également de cliver les acides sialiques. Ainsi, la particule virale pourra se lier à la surface de la cellule hôte, au niveau des récepteurs sialoconjugués, et s'en séparer lors du bourgeonnement à la fin du cycle viral. La présence de ces deux activités sur un même site catalytique ou sur des sites distincts a longtemps fait débat. Certaines équipes les ont attribuées à un seul site, du fait de l'impossibilité de ne bloquer qu'une seule des deux activités (Merz *et al.* 1981), alors que d'autres études sur SeV démontraient l'inverse (Portner 1981). Des études plus récentes, basées sur des approches de mutagenèse, ont montré qu'une perte de l'activité neuraminidase s'accompagnait d'une perte de l'activité d'hémagglutination, suggérant ainsi la présence d'un seul site catalytique responsable des deux activités (Iorio and Glickman 1992, Iorio *et al.* 1992, Sheehan and Iorio 1992, Mirza *et al.* 1994, Connaris *et al.* 2002).

Les résolutions des structures d'hémagglutinine-neuraminidase de NDV, en présence d'analogues d'acides sialiques, a cependant permis de détecter contre toute attente un second site de liaison au substrat (Zaitsev *et al.* 2004). Sa présence semble spécifique à NDV ainsi qu'à hPIV-3 et explique pourquoi les inhibiteurs de la neuraminidase, comme le Zanamivir n'abolissent pas la capacité de liaison de HN de NDV aux acides sialiques. (Zaitsev *et al.* 2004, Palermo *et al.* 2007, Porotto *et al.* 2007).

La structure de la protéine G des *Pneumovirinae* est très différente de la protéine d'attachement des *Paramyxovirinae*. En effet, elle ne possède pas les activités de neuraminidase et d'hémagglutinine. La glycoprotéine G des *Pneumovirinae* est une GP transmembranaire de type II (van den Hoogen *et al.* 2002). L'extrémité N-terminale est cytoplasmique, mais le plus grand fragment constituant l'extrémité C-terminale est extracellulaire (van den Hoogen *et al.* 2002, Bastien *et al.* 2004, van den Hoogen *et al.* 2004). La glycoprotéine G de hMPV semble être impliquée dans l'attachement du virus à la cellule cible, mais n'est pas essentielle pour la réplication virale. Un virus hMPV qui n'exprime pas la protéine G est capable de se répliquer *in vitro*, mais sa réplication est atténuée *in vivo* par rapport au virus *wt* chez le hamster doré (Biacchesi *et al.* 2004).

Par ailleurs cette protéine est la plus variable du hMPV (Bastien *et al.* 2004, Ishiguro *et al.* 2004, Peret *et al.* 2004, van den Hoogen *et al.* 2004), et peut-être retrouvée sous des formes

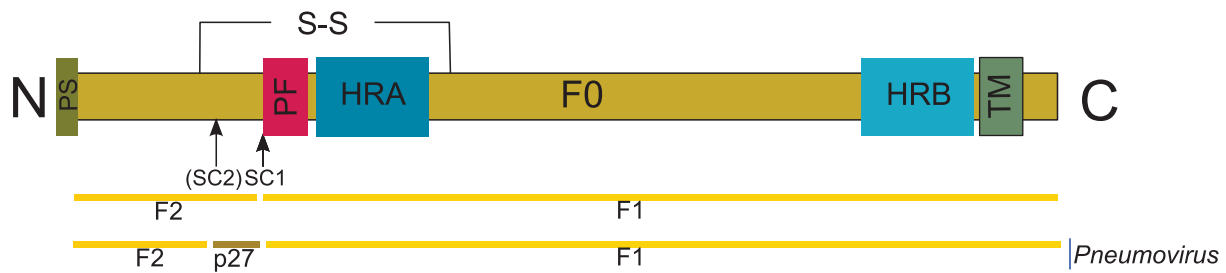


Figure 6 : Représentation schématique de la protéine de fusion F des paramyxovirus.

Après activation, le précurseur F_0 est clivé en deux sous-unités F_1 et F_2 au niveau du site de clivage 1 (SC1), reliées par un pont disulfure (S-S), juste avant le domaine du peptide fusion (PF). Chez les *Pneumovirus*, un second site de clivage (SC2) permet la libération du peptide 27 (p27). HRA: Heptad Repeat A domain; HRB: Heptad Repeat B domain; TM: domaine transmembranaire; N: côté N-terminal (exoplasmique); C: côté C-terminal (cytoplasmique); PS: peptide signal.

La figure n'est pas à l'échelle.

plus courtes suite à l'édition de sa séquence par la polymérase virale qui ajoute des codons-stops aléatoires (Bastien *et al.* 2004, Ishiguro *et al.* 2004, Peret *et al.* 2004, van den Hoogen *et al.* 2004).

2.3.4 Les glycoprotéines de fusion F

2.3.4.1 Généralités

La protéine de fusion F est une glycoprotéine transmembranaire exprimée à la surface de la particule virale et impliquée dans l'entrée du virion dans la cellule hôte.

La détermination de la structure de différentes GP de fusion a permis de mieux comprendre le mécanisme intrinsèque de fusion membranaire. Deux grandes familles de GP ont ainsi été déterminées sur la base de leurs particularités structurales et fonctionnelles (Figure 8) : les GP de fusion de classe I et celles de classe II (Kielian and Rey 2006). D'autres GP de fusion ne correspondent pas aux critères des classes I ou II. C'est le cas des GP des *Herpesviridae* et des *Rhabdoviridae* qui, bien que partageant certaines similitudes avec les mécanismes des 2 classes précédentes, doivent être classées dans une troisième catégorie (Tableau 1).

Les protéines F des paramyxovirus sont des GP de fusion de classe I (GP-I) (Tableau 1). Elles sont organisées sous forme d'un homotrimère à la surface membranaire cellulaire et virale. D'abord synthétisées sous la forme d'un précurseur inactif, les GP-I sont ensuite clivées

en 2 sous-unités fonctionnelles (F_1 et F_2) pouvant être reliées entre-elles par un pont disulfure au cours de leur maturation (Figure 6). C'est la classe des protéines de fusion de tous les paramyxovirus, mais aussi de nombreux autres virus (Tableau 1). C'est le cas de la GP S_0 du virus du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV) (Bosch *et al.* 2008), l'hémagglutinine HA de virus Influenza ou la gp120 du HIV-1.

2.3.4.2 Le site de clivage

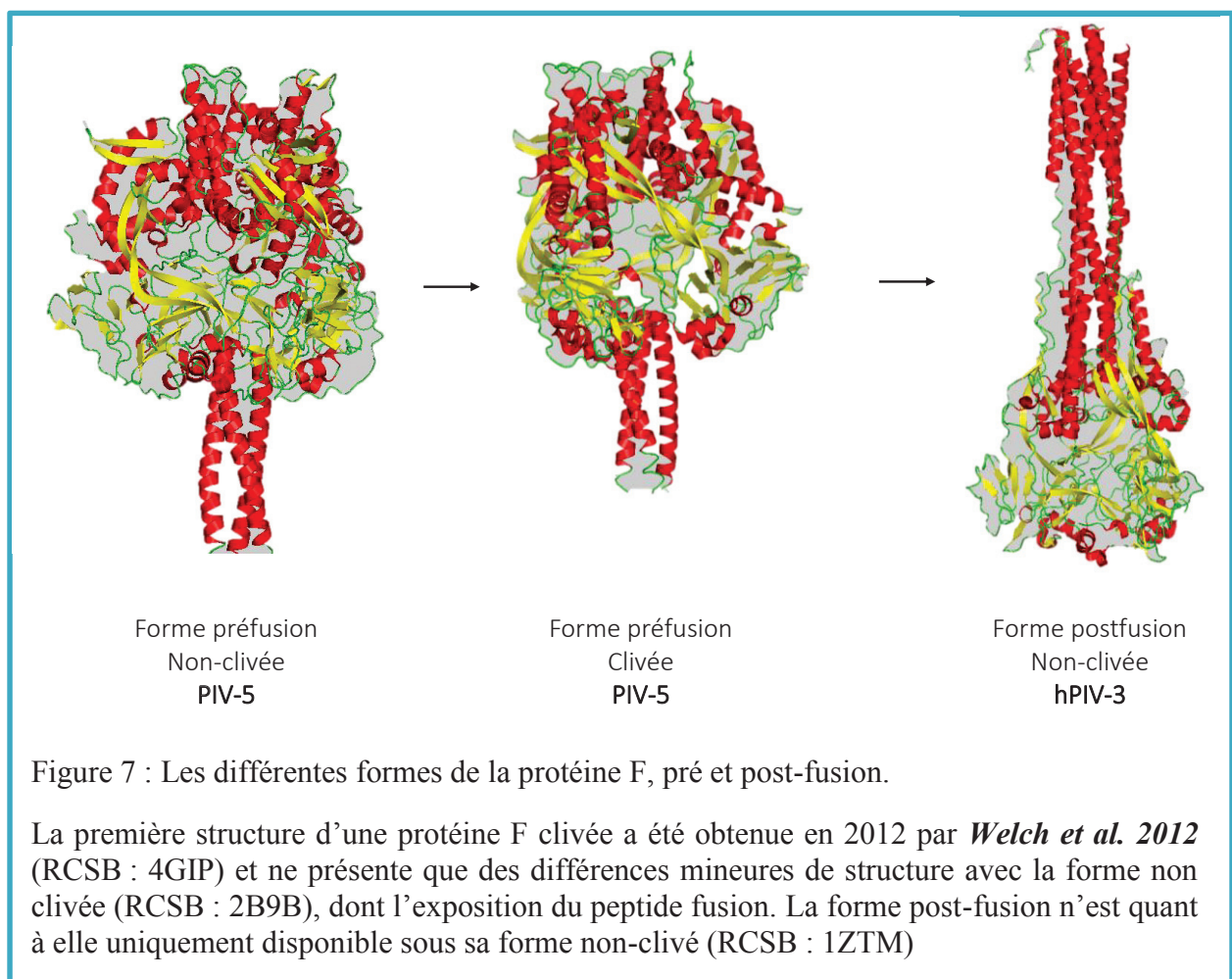
La protéine F est synthétisée sous forme d'un précurseur (F_0) dans la cellule infectée. Celle-ci doit être clivée au niveau d'un ensemble d'acides aminés polybasiques pour être biologiquement active sous la forme de deux sous-unités (F_1 et F_2) reliées par un pont disulfure (Yin *et al.* 2006). Pour hRSV, il existe deux sites de clivage, ce qui conduit à la libération d'un peptide additionnel, nommé p27 (Figure 6) (Zimmer *et al.* 2002). Au niveau du site de clivage, le polypeptide F_1 possède un domaine exposé appelé peptide fusion (PF), dont la fonction principale est de s'insérer dans la membrane de la cellule cible (Russell and Luque 2006). Cette étape de clivage permettrait aussi un premier changement de conformation de la GP F, ce qui diminuerait l'énergie nécessaire pour le passage de la protéine dans sa forme post-fusion (Welch *et al.* 2012).

Les sites de clivages sont déterminants pour la pathogénicité des souches virales. Par exemple la différence entre les souches lentogéniques et vélogéniques de NDV (respectivement faiblement et fortement pathogènes) est souvent portée par la séquence du peptide fusion (Collins *et al.* 1993). Un site de clivage multibasique correspond plutôt aux souches vélogéniques (Toyoda *et al.* 1987). On distingue de fait deux types de site de clivage chez les paramyxovirus (Klenk and Garten 1994) : (i) les sites multibasiques, qui seront clivés au niveau du réseau trans-Golgi par une endoprotéase cellulaire ubiquitaire comme la furine. Ces sites sont composés majoritairement d'arginine et une séquence consensus peut être déterminée avec le motif R-X-K/R-R. La furine coupe spécifiquement ce motif après la dernière arginine (Rockwell *et al.* 2002) ; (ii) les sites de clivage simples qui seraient quant à eux clivés par des protéases extracellulaire (Karron and Collins 2007).

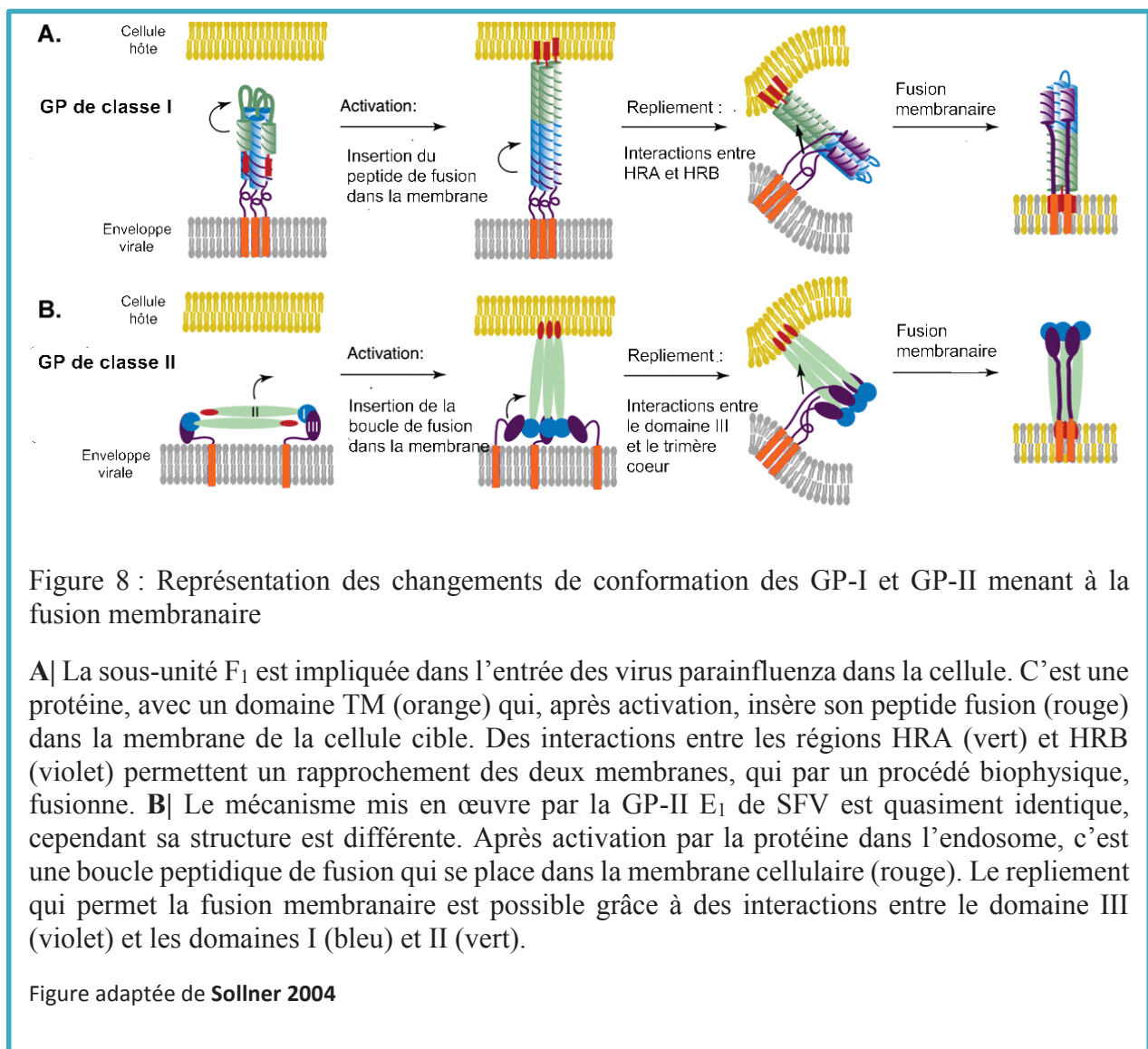
Les protéines F des virus hMPV et SeV n'ont qu'un site de clivage simple (Murakami *et al.* 2001, van den Hoogen *et al.* 2001), ce qui rend l'utilisation de trypsine obligatoire lors de la culture cellulaire. Il est probable qu'elles soient clivées *in vivo* par des protéases exogènes, comme TMPRSS2 ou le mini-plasmine (Murakami *et al.* 2001, Shirogane *et al.* 2008).

2.3.4.3 Domaines fonctionnels et dynamique conformationnelle des GP F

Après clivage, la forme activée de l'homotrimère de la protéine F subit toute une série de changements conformationnels. Cela aboutit à la fusion entre les deux membranes lipidiques (Yin *et al.* 2006). La partie N-terminale de la sous-unité F₁ présente en effet une courte séquence peptidique très hydrophobe (PF) d'une vingtaine d'acides aminés (Figure 6). Après activation de la GP F, le peptide fusion est découvert (Welch *et al.* 2012) et sa fonction est de s'ancrer dans la membrane de la cellule cible. Ainsi, la GP de fusion est reliée à la fois à l'enveloppe du virus (par sa partie TM) et à la membrane cellulaire (Figure 8). Cette insertion dans la membrane a pu être observée grâce à l'observation en microscopie électronique de la protéine de fusion F PIV-5. Après chauffage et/ou exposition à la trypsine la protéine forme des structures lipidiques en forme de rosette dont le peptide fusion est inséré dans le liposome (Connolly and Lamb 2006). Ces peptides de fusion (PF) présentent une identité de séquence très conservée au sein d'une même famille virale (jusqu'à plus de 90 %). Cet ancrage membranaire va induire la protéine F à se replier sur elle-même (Figure 7 et Figure 8).



La sous-unité F₂ (Figure 6) fait partie du trimère de F tant dans la forme pré-fusion que post-fusion, son rôle spécifique reste cependant à préciser (Tsurudome *et al.* 1998, Tsurudome *et al.* 2001, Melanson and Iorio 2006, Yin *et al.* 2006, Gardner *et al.* 2007, Swanson *et al.* 2010). En règle générale, la sous-unité F₂ est considérée comme responsable de l'attachement viral à un récepteur cellulaire. Cependant, ce n'est pas le cas des protéines F des paramyxovirus. Pour ces GP, la sous unité F₂ n'a pas de fonction d'attachement connue, même si elle semble jouer un rôle essentiel dans l'activation de la seconde sous-unité lors de la fusion membranaire (Tsurudome *et al.* 2006). Un domaine CBF2, très conservé parmi les paramyxovirus, peut être retrouvé sur cette sous-unité et serait impliqué dans l'interaction avec la glycoprotéine HN et la promotion du changement de conformation de la protéine F (Gardner *et al.* 2007).



La sous-unité F₁ constitue la majorité de la glycoprotéine exprimée à la surface membranaire. Elle est transmembranaire et présente une organisation spécifique avec 3 domaines peptidiques essentiels : les deux domaines HR et le peptide fusion (PF), (Figure 6 et Figure 8). La structure cristallographique de F PIV-5 non clivée sous sa forme de pré-fusion, stabilisée par GCNt (Yin *et al.* 2006), montrent que l'homotrimère de F forme une tête globulaire dans la partie N-terminale de la sous-unité F₁. Une tige est formée par l'interaction des domaines *coiled-coil* HRB de la sous-unité C-Terminale (Figure 7). Cette sous-unité F₁ joue le rôle principal dans la fusion membranaire.

Par ailleurs, quelques caractéristiques sont conservées entre les différentes familles virales exprimant des GP-I, comme par exemple la présence d'une face hélicoïdale riche en glycines dans leur conformation tridimensionnelle autour du PF (Del Angel *et al.* 2002). Ces résidus joueraient un rôle clé dans la fusion membranaire ; ils sont notamment impliqués dans la régulation des étapes initiales du processus de fusion chez les paramyxovirus (Russell *et al.* 2004).

Les deux domaines HR, ayant aussi une conformation en hélice α , dans la sous-unité C-terminale F₁, sont impliqués dans les changements conformationnels de F. Chez les paramyxovirus, ces domaines sont nommés HRA (partie N-proximale) et HRB (région C-proximale) (Figure 10). Ils constituent des régions peptidiques dites en « *heptad repeat* » (HR) dans lesquelles 7 résidus sont nécessaires pour la formation de deux tours d'hélice α . Ces structures présentent à la fois une face hydrophobe, composée majoritairement d'acides aminés non-polaires, et une face hydrophile, composée de résidus polaires. Cette conformation bipolaire permet le repliement du domaine HRA avec le domaine HRB, via des interactions entre leurs faces hydrophobes respectives (Figure 7 et Figure 8) (Russell *et al.* 2001, Yin *et al.* 2005, Swanson *et al.* 2010, Swanson *et al.* 2011). Au sein de la GP trimérique, ce changement conformationnel de chaque monomère conduit à la formation d'une structure en « fagot » de 6 hélices (6-HB) (Yin *et al.* 2005, Swanson *et al.* 2010, Swanson *et al.* 2011). Cette structure permet la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire (Kielian and Rey 2006) (Figure 7 et Figure 8). L'interaction entre les domaines HRA et HRB jouent un rôle important dans cette étape. Son inhibition avec des analogues des régions HR permet d'obtenir des formes intermédiaires de fusion (Russell *et al.* 2001). La structure conformationnelle obtenue grâce à cette interaction constitue la forme de post-fusion finale de la protéine F (Russell and Luque 2006) et permet la création d'un pore d'hémifusion entre les bicouches lipidiques virales et

cellulaires (Chernomordik *et al.* 1995), et ainsi la libération du matériel génétique virale dans la cellule cible (Figure 4, Figure 5 et Figure 8).

2.3.5 *Les hypothèses de promotion et de régulation de la protéine F par HN/G*

Pour les PIV, HN est suspectée d'être impliquée fortement dans l'activation fonctionnelle de F (Connolly *et al.* 2009), probablement via une interaction directe protéine-protéine (Takimoto *et al.* 2002). Cette coopération fonctionnelle a d'abord été démontrée par des transfections *in vitro* de plasmides exprimant F des virus parainfluenza (Hu *et al.* 1992, Heminway *et al.* 1994, Yao *et al.* 1997). Il est rapporté que la cotransfection avec HN est essentielle pour la formation de syncytiums à 24h post-transfection. De plus, c'est la protéine HN homotypique qui doit être coexprimée, puisqu'il n'y a généralement pas de formation de syncytiums lorsqu'une HN d'une autre espèce est coexprimée (Hu *et al.* 1992, Yao *et al.* 1997). Cette particularité semble ainsi indiquer une modulation très fine de la protéine F par HN. Par ailleurs, l'interaction entre F et HN des paramyxovirus a été confirmée par des études de coimmunoprécipitation et de 'co-capping' (Stone-Hulslander and Morrison 1997, Yao *et al.* 1997, Melanson and Iorio 2006, Bishop *et al.* 2007). La méthode de 'capping' consiste en l'induction de la mobilité latérale de GP de surface sur un seul côté de la cellule grâce à un anticorps, ce qui forme une sorte de coiffe ou 'cap' en langue anglaise. Le 'co-capping' implique de marquer une deuxième GP après la migration afin d'observer sa répartition par rapport à la première GP (Lydy *et al.* 1990). Après le 'capping' par un anticorps anti HN et un immunomarquage, les GP F et HN homotypiques (hPIV-3) se retrouvent distribuées dans la même aire, ce qui n'est pas le cas pour les GP hétérotypiques (F hPIV-3 exprimée avec HN de hPIV-2) (Yao *et al.* 1997).

Le changement de conformation de la protéine F conduisant à la fusion membranaire est irréversible. Ceci implique que la forme de post-fusion, non fusogène de la protéine F est définitive. C'est pour cela qu'il est important que l'activation de cette protéine se fasse par un contrôle spatial et temporel très strict lors de l'infection.

Des études précédentes sur hPIV-2, PIV-5 et NDV ont révélé que plusieurs domaines peptidiques étaient impliqués dans l'interaction F/HN, sans pour autant caractériser précisément les résidus impliqués. Ainsi, une première étude a démontré qu'une interaction entre la tête globulaire formée par le tétramère de HN et F était nécessaire à la fusion (Lee *et al.* 2008). Cependant, la plupart des études postérieures ont montré une interaction privilégiée et prédominante de F avec la tige de HN. Ces expériences étaient basées sur l'utilisation d'une

protéine HN tronquée de sa région « tête ». Néanmoins, certains auteurs ont proposé que des résidus situés dans les domaines transmembranaires (McGinnes *et al.* 1993, Bousse *et al.* 1994) et de la tête de HN pouvaient également jouer un rôle (Mirza *et al.* 1994, Bishop *et al.* 2007, Aguilar *et al.* 2009).

Les régions de la protéine F interagissant avec HN sont elles aussi encore mal caractérisées. La région HRB ainsi qu'une région située sur la tête globulaire formée par le trimère de F ont été identifiées pour NDV (Gravel and Morrison 2003, Lee *et al.* 2008). Ainsi, la modification d'un ensemble d'acides aminés sur la tête de la protéine F de CDV les aminoacides aux positions équivalentes chez les virus MeV, respectivement, permet à ces protéines F modifiées d'être activées par la protéine HN de MeV. Cette démarche expérimentale a été suivie avec une protéine HN de SV41 et une protéine F de PIV-5 modifiée avec des résidus de F de SV41, menant aux mêmes observations (Lee *et al.* 2008, Tsurudome *et al.* 2013). Ces résultats semblent indiquer que la spécificité de l'activation de F par une HN homologue est un processus indépendant de la fusion.

D'autres données expérimentales argumentent que la modulation de la fusion par HN soit extrêmement fine et spécifique des virus. Ainsi, pour NDV et hPIV-3, l'activité de fusion a été démontrée comme directement proportionnelle à l'augmentation de l'interaction entre F et HN (Melanson and Iorio 2004, Porotto *et al.* 2004, Porotto *et al.* 2011). A l'inverse, pour les glycoprotéines d'attachement et de fusion des morbilivirus et des henipavirus, une forte interaction entre les protéines est délétère pour la fusion (Plempner *et al.* 2002, Aguilar *et al.* 2006). Par ailleurs, l'interaction peut intervenir à différents moments du cycle viral. Les protéines H et F de MeV par exemple, interagissent dès leur production dans le réticulum endoplasmique rugueux (Plempner *et al.* 2001). A l'inverse, une telle interaction intracellulaire n'a pas été retrouvée pour hPIV-3, NDV, PIV-5 et HeV (Paterson *et al.* 1997, Li *et al.* 2004, Whitman *et al.* 2009).

Enfin, la découverte de souches de PIV possédant une protéine F autonome (Ito *et al.* 1997, Tsurudome *et al.* 2001, Tsurudome *et al.* 2006, Terrier *et al.* 2009) ou n'exprimant pas de protéine G, tout en gardant leur capacité à infecter (Chang *et al.* 2012), suggère l'existence de mécanisme d'auto-activation de la protéine F, indépendant de la glycoprotéine d'attachement. La protéine de fusion de la souche PIV-5 W3A peut en effet fonctionner de manière indépendante de HN, même si la co-expression d'une HN homotypique augmente la fusion (Ito *et al.* 1997). D'ailleurs, il n'existe pas, à ma connaissance, de souche de

paramyxovirus circulants qui ne possède pas de glycoprotéine d'attachement. Dans le cas de PIV-5, des mutations dans l'ectodomaine de la protéine de fusion sont responsables de l'autonomie de la protéine F (Ito *et al.* 1997, Paterson *et al.* 2000, Russell *et al.* 2001). Un résidu proline en position 22 de la sous-unité F₂, juste après la séquence signal d'exportation de la protéine, ou en position 443 de la sous-unité F₁ (à la bordure du domaine HRB), confèrent le phénotype d'indépendance vis à vis de HN. Cependant, ces mutations seules ne sont pas suffisantes pour générer une autonomie et d'autres mutations, telles que K132E (HRA) et V290A, sont nécessaires à l'autonomie de F PIV-5 (Ito *et al.* 2000). L'hypothèse est que ces mutations réduiraient le niveau d'énergie minimum nécessaire pour le déclenchement de la fusion. Les mutations du domaine HRB S443P, L447F et I449F pourraient ainsi jouer ce rôle, tel que proposé par Terrier *et al.* (Terrier *et al.* 2009).

Par ailleurs, une portion de la sous-unité F₂ (le domaine CBF2) interagit avec la région HRA de la sous-unité F₁ (Gardner *et al.* 2007). L'augmentation de l'interaction entre les régions HRA et HRB, par l'augmentation du degré d'hydrophobicité des faces internes de ces régions, permet elle aussi d'obtenir une fusion plus efficace (Schowalter *et al.* 2009, Terrier *et al.* 2009). En effet ces deux faces sont en interaction dans la forme de post-fusion de la protéine F. Une augmentation du potentiel d'interaction entre ces deux faces aurait ainsi comme conséquence de réduire l'énergie d'activation nécessaire pour le repliement de la protéine dans la dernière étape du processus de fusion. Certaines mutations ponctuelles sur la protéine F de PIV-5 (Takimoto *et al.* 2002), SeV (Porotto *et al.* 2012) et NDV (Melanson and Iorio 2004), la rendent donc moins dépendante de l'activation par HN. Ces nuances semblent indiquer un équilibre très fin entre l'activation par HN et l'auto-activation de F. En effet, une auto-activation trop « efficace » de F pourrait mener à la conformation de la protéine F en forme de post-fusion inactive, avant même le bourgeonnement du virus.

Cet équilibre d'activation par HN a ainsi donné cours à différentes hypothèses quant aux interactions spatiales et temporelles. Schématiquement, cette dernière peut en effet 1) « activer » F après s'être fixée à son récepteur ou 2) au contraire, jouer le rôle de chaperonne de la protéine F sous sa conformation de pré-fusion. Ce contrôle cesserait de s'exercer lors de l'attachement de la protéine HN à son récepteur. De plus le contrôle de la fusion peut s'effectuer soit ponctuellement, soit tout au long de la fusion. Cette dernière hypothèse a d'ailleurs été confirmée récemment (Porotto *et al.* 2011). Ces différentes hypothèses et les modèles correspondants sont présentés dans la Figure 9.

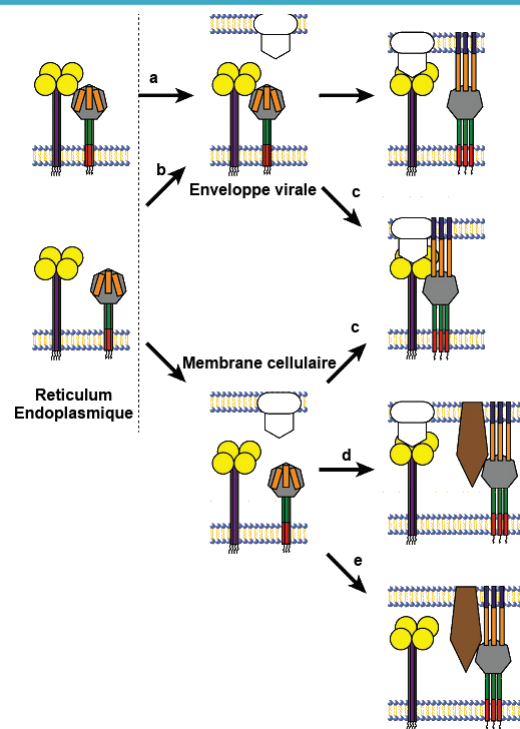


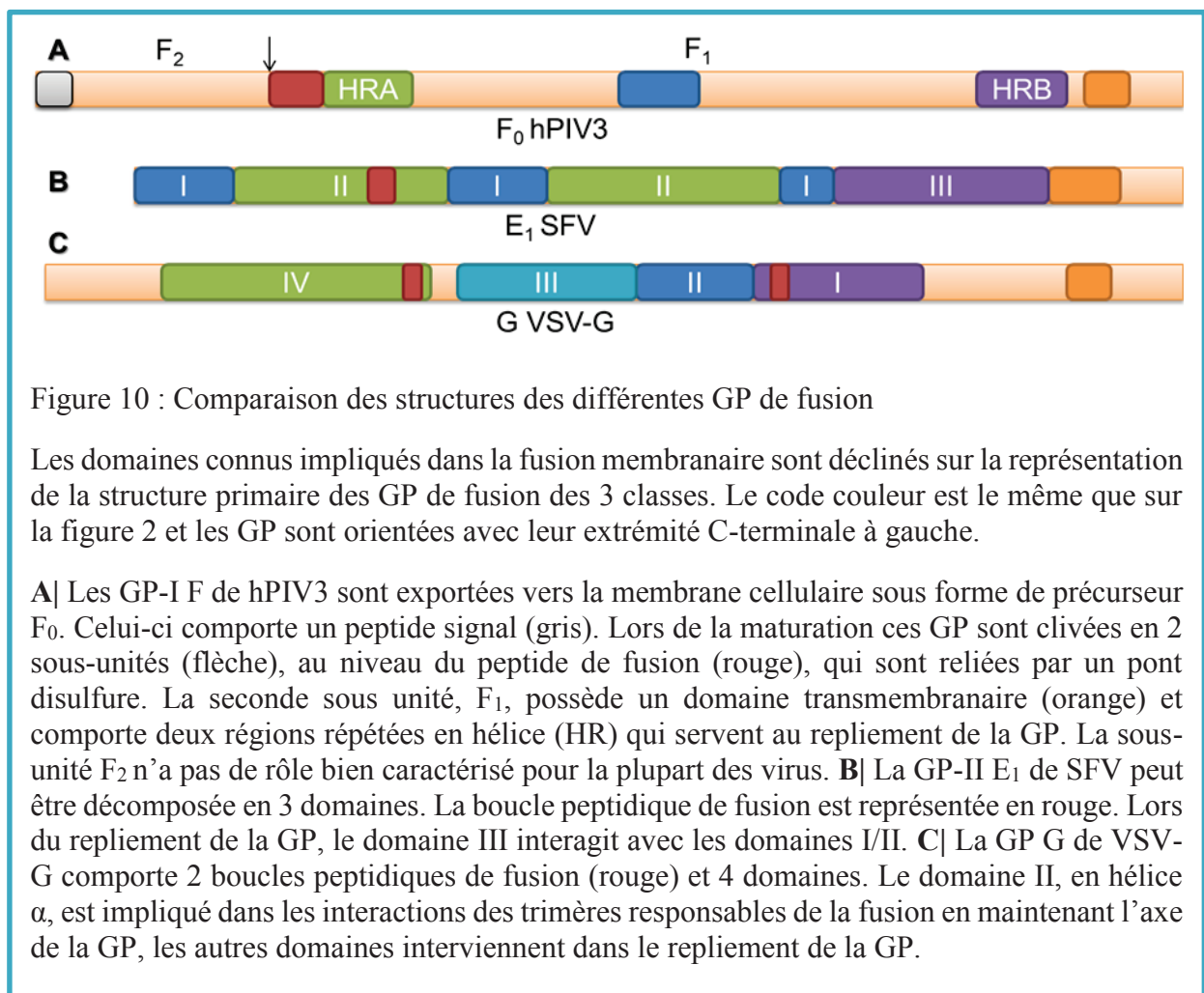
Figure 9 : Les différents modèles d'activation par HN

A| Les protéines d'attachement et F interagissent dès leur production et ne se dissocient qu'à l'attachement au récepteur, « libérant » la protéine F activée. **B|** Le trafic peut être effectué séparément, mais les deux protéines s'associent à la surface cellulaire **C|** Peu-importe la configuration lors du trafic ou en surface, les protéines sont en contact après l'engagement au récepteur ce qui active la protéine F avec un mécanisme plus modulaire. **D|** Certains paramyxovirus peuvent avoir deux récepteurs indépendants pour chacune de leur protéine, et F s'active seule après l'engagement. **E|** La protéine dite d'attachement peut n'avoir aucun rôle lors de l'entrée du virus dans la cellule pour certains paramyxovirus.

Figure adaptée de **Chang and Dutch 2012**

2.3.6 Les autres GP virales de fusion

Cette section décrit brièvement les autres types de protéines virales de fusion. Bien que leur mécanisme d'action soit similaire à celui des GP-I décrites ci-dessus, la structure des glycoprotéines de fusion de type II (GP-II) est très différente (Figure 8 et Figure 10). En effet celles-ci sont majoritairement constituées de feuillets β , alors que les GP-I sont constituées d'hélices α . De plus, les GP-II ne sont pas clivées lors de leur maturation intracellulaire contrairement aux GP-I, mais nécessitent obligatoirement un environnement acide afin de permettre la fusion inter-membranaire. Enfin, Les GP-II sont présentes à la surface du virion sous forme hétéromérique associées à une autre GP, dite chaperonne (Kielian and Rey 2006). Dans le cas du Semliki Forest Virus (SFV), l'hétérodimère formé par les GP E₁ et E₂ a constitué un modèle d'étude pour le mécanisme de fusion membranaire (Tableau 1 et Figure 10). La GP E₂ est une GP chaperonne de la GP E₁ et est responsable de l'attachement du virus à son récepteur cellulaire. Elle est également impliquée dans l'endocytose de la particule virale.



L'élucidation de la structure de la GP E₁ du SFV (Tableau 1) a permis de caractériser les domaines fonctionnels partagés par les GP-II (Roussel *et al.* 2006). Celles-ci sont composées de 3 domaines distincts: (i) le domaine I, ou domaine central, riche en feuillets β ; (ii) le domaine II à l'extrémité N-terminale du domaine I qui interagit directement avec la membrane de la cellule cible, notamment grâce à la présence de la boucle peptidique de fusion (comparable au peptide fusion des GP-I) ; (iii) et le domaine III, du côté C-terminal du domaine central, qui est un domaine de type Immunoglobuline (Ig). La partie TM est, quant à elle, située à l'extrémité C-terminale des GP (Figure 10).

Après endocytose du virus, l'acidification de l'endosome permet la dissociation de l'hétérocomplexe E₁/E₂. La GP E₁ subit alors un changement conformationnel et déploie ainsi la boucle peptidique de fusion. A cette étape, le mécanisme de fusion présente de nombreuses homologues avec celui associé aux GP-I. En effet, la GP E₁, sous forme d'homotrimère, subit des changements conformationnels conduisant à un repliement des domaines I/II (le « trimère cœur ») sur les domaines III de chaque monomère et permet ainsi le rapprochement des membranes virales et endosomales (Figure 8).

Il existe d'autres GP virales de fusion qui pourraient constituer une troisième classe. Elles ont un mode de fonctionnement est différent des classes I et II, mais partagent pourtant des similitudes avec les GP-I et II. Par contre, à la différence de ces dernières, les changements de conformation des GP en question, semblent être réversibles. C'est le cas du virus de la stomatite vésiculeuse de type G (VSV-G), qui ne possède qu'une seule GP de fusion, présente sous la forme d'un homotrimère à la surface des virus. Un pH acide est nécessaire à l'activation de cette GP. Elle comporte différents domaines, certains riches en feuillets β comme les domaines I et II retrouvés dans les GP-II, ainsi que 2 boucles peptidiques de fusion. Il existe aussi un long domaine en hélice α , qui permettrait le repliement de la protéine grâce à un domaine 'coiled-coil', en maintenant un axe entre les monomères, à l'image des GP-I (Roche *et al.* 2007) (Figure 10). Le virus de l'herpès de type 1 (HSV-1), bien que pénétrant dans la cellule par un mécanisme de fusion similaire à celui des virus décrits précédemment (Maurer *et al.* 2008), met en jeu 4 GP différentes (gB, gD et gH-gL). Chacune d'entre elles joue un rôle clé dans les différentes étapes du processus de fusion (Subramanian and Geraghty 2007).

2.4 Épidémiologie

Les virus hRSV, hMPV et hPIV sont la plus importante cause des infections respiratoires aiguës chez les enfants de moins de 5 ans. La plupart des individus sont infectés par ces pathogènes lorsqu'ils sont très jeunes. Beaucoup de publications scientifiques tentent de mesurer un taux d'hospitalisation causé par ces virus. Cependant elles apportent des informations extrêmement variables, dépendantes, entre autres de l'année et du lieu de l'étude. Un taux d'hospitalisation de 26 ‰ parmi les enfants de moins de 1 an aux États-Unis a été calculé par une étude américaine étudiant les années entre 1996 et 2006. Aucun écart important entre les années de l'étude n'a été constaté (Stockman *et al.* 2012). Ce chiffre peut être comparé aux taux respectifs de 4,9 à 6,1 ‰ d'infection par le hMPV des enfants de moins de 6 mois aux USA et en Espagne (Cilla *et al.* 2009, Williams *et al.* 2010). Le taux d'hospitalisation attribué à hPIV-3 varie grandement en fonction des années d'études et de l'âge des individus observés. Il se situe entre 1,6 ‰ chez les enfants de moins de 6 mois (Williams *et al.* 2010) jusqu'à 12,2 ‰ pour les enfants entre 1 et 2 ans (Chiu *et al.* 2010).

La mortalité attribuable à ces virus reste rare dans les pays développés. Les enfants touchés sont généralement prématurés, présentant des risques cardio-pulmonaires importants ou sont immunodéprimés (Leader and Kohlhasse 2003). Malheureusement, très peu d'études s'intéressent à l'impact de ces virus dans les pays en voie de développement. Une étude récente a cependant été menée à Karachi, au Pakistan, sur l'étiologie virale de 169 jeunes enfants présentant des pathologies respiratoires sévères, pendant 1 an à partir du mois de novembre 2010. De façon très surprenante, des infections avec les virus hMPV et hRSV étaient impliqués dans la majorité des cas de pneumonie sévère chez les enfants, bien plus que les infections avec le virus de la grippe Influenza A (Ali *et al.* 2013).

Dans les pays tempérés, la plupart de ces virus circulent pendant l'hiver et au cours du printemps, suivant la même courbe épidémique que la grippe, à l'exception de hPIV-3 qui se retrouve tout au long de l'année. Par contre, la circulation de ces virus dans les régions tropicales est prédominante au printemps et en été, notamment pour hMPV (Peiris *et al.* 2003) ou hRSV (Ali *et al.* 2013). Cette observation peut être expliquée par un taux d'humidité ambiant qui y est plus important lors de ces saisons. Ces deux études sont cependant en contradiction sur le pic épidémique de hMPV, ce qui porte à croire que la saisonnalité de la circulation varie selon les souches virales et les années. Une distinction peut pourtant être faite entre tous ces virus car le pic de cas de bronchiolite chez les enfants hospitalisés ne survient pas au même âge.

Ainsi le pic est atteint pour (i) les nourrissons de seulement 2,5 mois en ce qui concerne les infections hRSV, (ii) les enfants de 7 mois pour hMPV et (iii) les enfants de 10,6 mois pour hPIV (Welliver *et al.* 1986, Welliver 2003). Les virus hPIV-1 et hPIV-2 sont souvent associés à des infections sévères au niveau des voies respiratoires supérieures (larynx et trachée supérieure) (Henrickson *et al.* 1994). A l'inverse, les infections hRSV, hMPV et hPIV-3 sont plutôt associées à des affections des voies respiratoire inférieures, comme des bronchiolites, des bronchites et des pneumonies (Glezen *et al.* 1984, Boivin *et al.* 2003).

Pour toutes ces infections, il y a plusieurs facteurs de risques aggravant ; ceux-ci ont été particulièrement bien décrits dans le cas des infections par hRSV. La présence de maladies sous-jacentes comme par exemple une maladie cardiaque ou pulmonaire chronique, la trisomie 21, ou alors la naissance prématurée ou l'absence d'allaitement maternel, augmentent de façon significative le taux de mortalité de hRSV (Garcia *et al.* 2010, Paes *et al.* 2011). Par ailleurs, il a été calculé aux Etats-Unis que le coût de chaque hospitalisation due à hRSV était de 4517 US\$ pour les bébés prématurés et de 2135 US\$ pour les autres nourrissons de moins de 12 mois (Leader *et al.* 2003), ce qui souligne l'impact économique de ces virus.

Les adultes et les enfants plus âgés sont eux aussi couramment infectés et réinfectés par les paramyxovirus. En effet l'infection naturelle ne peut en aucun cas induire une protection immunologique complète et durable (Glezen *et al.* 1984, Glezen *et al.* 1986, Marx *et al.* 1999). Néanmoins, les réinfections sont majoritairement bénignes, ne produisant que des affections du tractus respiratoire supérieur. Toutefois, elles jouent probablement un rôle important dans la dissémination du virus dans la population. De plus, et bien que la problématique soit assez peu étudiée en comparaison de l'impact de la grippe, les personnes âgées semblent particulièrement sensibles aux réinfections sévères. En absence de données suffisantes, une équipe a exploité un modèle mathématique pour démontrer qu'entre 1990 et 1998, seulement 346 patients de moins de 4 ans sont morts par année suite à une infection par le virus hRSV aux Etats-Unis. A l'inverse, 12549 adultes de plus de 50 ans meurent chaque année (Thompson *et al.* 2003). Des chiffres aussi élevés correspondent à la mortalité généralement induite par une épidémie de grippe saisonnière d'intensité faible à moyenne. (Chiu *et al.* 2010).

Pour les infections par les virus hMPV, une étude a démontré une mortalité de 40% chez des patients de plus de 60 ans (Boivin *et al.* 2002). Ce travail rétrospectif est cependant à relativiser, au regard du faible nombre de patients inclus. Il faut noter que ces patients « à risque » présentaient des pathologies cardiovasculaires, pulmonaires et neurologiques avant

l'infection (Boivin *et al.* 2002). Une épidémie d'infections respiratoires aiguës des voies inférieures causées par le hMPV, causant des symptômes grippaux, a été rapportée au Canada dans un centre de soins prolongés pour personnes âgées de la province de Québec (Boivin *et al.* 2007). Au total, 10 % des patients infectés sont décédés.

Le mode majeur de dissémination des paramyxovirus respiratoires semble être les grosses gouttelettes respiratoires produites lors des éternuements (Hall *et al.* 1980). La transmission peut demander un contact assez proche entre les individus, mais peut aussi se produire par le contact d'objets contaminés. La période d'incubation est estimée entre 3 et 7 jours pour hRSV, 4 à 6 jours pour hMPV et 2 à 6 jours pour les hPIV (Lessler *et al.* 2009).

3 Traitements thérapeutiques

Très peu d'options sont disponibles aujourd'hui pour le traitement des maladies causées par les paramyxovirus respiratoires. Seule la ribavirine (voir ci-dessous) est utilisée pour traiter les cas sévères d'infection par hPIV, hRSV et hMPV. Disponible commercialement, le Palivizumab (une immunoglobuline) permet dans une certaine mesure de prévenir les infections par hRSV. Cependant, l'efficacité limitée de ces traitements met en lumière le besoin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, comme par exemple des peptides inhibiteurs d'attachement et/ou de fusion (cf. page 39), ou des petits ARN interférents (Deffrasnes *et al.* 2008, DeVincenzo *et al.* 2010). La mise en place de stratégies vaccinales est également nécessaire (voir la partie Vaccins p.42).

3.1 Une molécule antivirale : la ribavirine

La ribavirine est un analogue de nucléoside avec un large spectre d'activité antiviral, incluant les paramyxovirus (Sidwell *et al.* 1972, De Clercq 1993). Cependant, certaines études ont démontré une toxicité significative et suggéré une possible tératogénicité de la ribavirine chez les rongeurs (Ferm *et al.* 1978, Kochhar *et al.* 1980). De plus, l'utilisation de la ribavirine présente un rapport coût/efficacité très discutable. Ces facteurs ont ainsi limité son utilisation à des cas très sévères d'infection chez les enfants prématurés et les patients transplantés pour hRSV (Krillov 2011). Cette drogue est aussi active *in vitro* contre les infections à hMPV et hPIV. Néanmoins, en l'absence d'essai clinique randomisé et validé, cette utilisation reste et ne doit être restreinte qu'aux infections sévères et pour les patients immunodéprimés dont le pronostic vital est engagé (Chakrabarti *et al.* 2000, Nichols *et al.* 2001, Wyde *et al.* 2003, Safdar 2008).

3.2 Les inhibiteurs d'attachement et de fusion

Il n'existe sur le marché aucun traitement des paramyxovirus respiratoires par des inhibiteurs spécifiques de la fusion. Mais l'entrée des virus dans leur cellule hôte est une étape critique du cycle infectieux et constitue de ce fait une cible thérapeutique de choix. La stratégie qui consiste à cibler les étapes initiales du cycle viral présente de nombreux avantages. En effet, à l'inverse des autres stratégies utilisées, elle permet d'éviter le détournement des machineries transcriptionnelle et traductionnelle cellulaires qui interviennent très rapidement après l'entrée

du virus. De plus l'intervention de molécules inhibitrices sur leur cible dans l'espace extracellulaire permet de concevoir des drogues n'entrant pas dans les cellules, et de limiter au maximum leurs effets cytotoxiques potentiels.

Ainsi de nombreux programmes de recherche sont menés actuellement pour le développement de nouveaux antiviraux ciblant cette étape initiale, clé de l'infection.

3.2.1 *Stratégie d'inhibition de l'entrée virale*

Il est nécessaire d'étudier de manière approfondie les GP de fusion, car celles-ci pourraient constituer une cible majeure pour le traitement efficace des pathologies liées aux virus enveloppés, et particulièrement aux paramyxovirus. En effet, l'inhibition de l'entrée cellulaire des virus présente un certain nombre d'avantages. Notamment, elle vise un stade très précoce de l'infection et permet d'inhiber la transduction du génome viral dans les cellules hôtes et ainsi de limiter au maximum la progression virale.

Dans ce contexte, toutes les étapes du processus d'entrée des virus peuvent être ciblées : de l'adsorption de la particule virale jusqu'à la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane

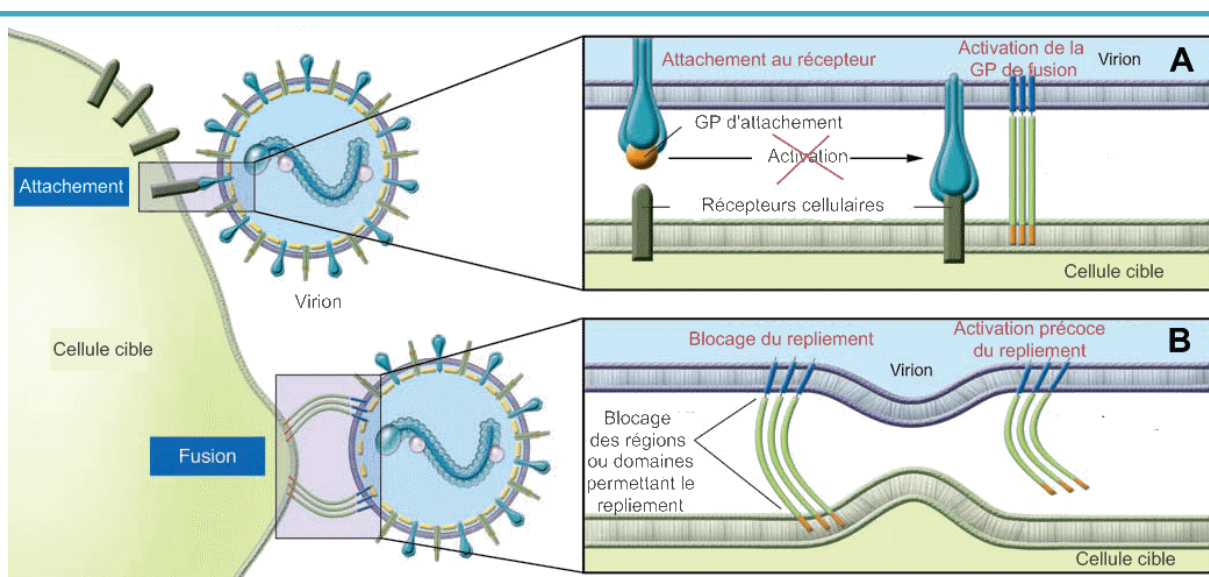


Figure 11 : Étapes d'entrée dans la cellule pouvant potentiellement être ciblées par des antiviraux

Les inhibiteurs d'entrée dans la cellule peuvent cibler **A** l'attachement de la GP virale à son récepteur ou corécepteur cellulaire ou alors inhiber l'étape d'activation par cette première de la GP de fusion. **B** Des inhibiteurs de fusion peuvent aussi être utilisés, en empêchant par exemple le repliement de la protéine après son ancrage dans la membrane de la cellule cible, ou au contraire en provoquant ce repliement précocement afin de rendre la GP inactive.

Figure adaptée de Moscona 2005

cellulaire (Figure 11). Différents types de molécules (peptides, sucres, petites molécules organiques...) ont ainsi été évaluées ; les parties ci-dessous traiteront de molécules déjà utilisées chez les patients, ou en cours d'essai clinique. Elles ciblent différents paramyxovirus, afin d'avoir une vue d'ensemble des différentes stratégies employées.

3.2.1.1 *Inhibition de l'attachement*

Le blocage de la GP ou de la sous-unité qui permet l'attachement du virus à la cellule permet de prévenir l'adsorption du virus.

La petite molécule 4-GU-DANA, ou Zanamivir (Relenza® Merck) est connu pour être un inhibiteur de l'activité neuraminidase d'influenza. Cette molécule peut également être utilisée pour inhiber l'entrée des virus parainfluenza, comme hPIV-3 (Tableau 1). En effet, la GP HN possède également dans son site catalytique une activité neuraminidase nécessaire au bourgeonnement des virus. Ainsi, le Zanamivir, en encombrant stériquement ce site, réduit l'affinité de la GP HN avec les récepteurs sialoconjugués. L'activité inhibitrice du Zanamivir étant faible, cette molécule n'est pas ou peu utilisée en clinique (Porotto *et al.* 2004).

3.2.1.2 *Antagonistes des corécepteurs*

Toujours dans l'optique de limiter l'adsorption du virus, des stratégies de neutralisation des récepteurs cellulaires par des ligands spécifiques ont également été développées. Cependant, la plupart des récepteurs ciblés par les virus ont un rôle indispensable pour la cellule. Des antagonistes de récepteurs qui empêcheraient la fixation des virus sur leurs récepteurs cellulaires pourraient avoir des effets indésirables sur la cellule, en perturbant les voies de signalisation cellulaire induites par ces récepteurs.

Des recherches plus avancées utilisant cette stratégie existent contre HIV-1. Il a été observé que des ligands des corécepteurs CCR5 et CXCR4 régulaient négativement la pénétration du virus. Ceci a amené à cibler en priorité ces corécepteurs. Cette stratégie est bien représentée par le maraviroc (Celsentri® Pfizer), petite molécule approuvée à la vente par la FDA en Aout 2007, qui est un ligand du CCR5. Cette molécule est capable, par compétition, d'empêcher le corécepteur d'interagir avec le complexe CD4-gp120 (Dorr *et al.* 2005). Cette stratégie de ciblage n'a pas été développée contre les paramyxovirus respiratoires, et notamment les parainfluenzas et les Pneumovirus, puisque leurs récepteurs et éventuels corécepteurs ne sont que trop peu caractérisés à ce jour.

3.2.1.3 Inhibition de la glycoprotéine de fusion membranaire

En revanche, l'axe de recherche et développement le plus soutenu jusqu'à présent, notamment pour les paramyxovirus respiratoires, porte sur l'inhibition des GP responsables de la fusion membranaire (Figure 11). Il en résulte des molécules appelées inhibiteurs de fusion.

3.2.1.3.1 Inhibition du repliement de la GP de fusion par un peptide

Ce sont tout d'abord des peptides analogues du domaine HRA des GP de classe I qui ont été développés, afin d'inhiber le repliement des GP F des paramyxovirus. Cette stratégie a d'abord été évaluée pour la HA des virus influenza (Richardson *et al.* 1980). En se fixant sur les domaines HRB, ces peptides empêchent le repliement de la GP et donc le rapprochement des membranes qui en dépendent (Russell *et al.* 2001). Plus récemment, des analogues des régions HRB, qui se lient à la région HRA, ont été développés et présentent une meilleure efficacité d'inhibition de la fusion membranaire (Russell *et al.* 2001). Cette stratégie est maintenant évaluée sur de nombreux virus équipés de GP de classe I. La première molécule antivirale de cette famille à avoir été mise sur le marché est l'enfurvitide, ou Fuzeon® d'après sa dénomination commerciale, un peptide inhibant l'entrée du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1) (Wild *et al.* 1994, Kilby *et al.* 1998, Dwyer *et al.* 2007).

En ce qui concerne les paramyxovirus, plusieurs types de peptides inhibant le repliement des GP ont également été testés ; certains donnant de très bons résultats en essai préclinique, notamment contre les infections à hMPV (Deffrasnes *et al.* 2008, Roymans *et al.* 2010). Cependant, ces peptides, d'une longueur de 20 à 40 acides aminés, doivent être stables et solubles afin de pouvoir être administrés, ce qui constitue l'une de leur limite majeure du fait de leur nature hydrophobe (Xu *et al.* 2004).

3.2.1.3.2 Inhibition des GP par des immunoglobulines

Le palivizumab (Synagis™, MedImmune) est un Anticorps monoclonal humanisé, reconnaissant un épitope conservé de F du hRSV (Johnson *et al.* 1997). Autorisé à être mis sur le marché en 1998 par la Food and Drug Administration (FDA), cet anticorps n'est utilisé que dans un but prophylactique. Il a été démontré qu'il réduit de 45% à 55% les hospitalisations des jeunes enfants à risque suite à une infection par le hRSV, (1998, Feltes *et al.* 2003, Meissner and Long 2003), bien que la durée moyenne des hospitalisations reste la même. Une administration mensuelle de cet anticorps monoclonal pendant la saison épidémique de hRSV est recommandée, sur la base de certains facteurs de risques connus, comme une naissance prématurée ou des risques cardiaques. Cependant, les indications optimales, basées sur le

rapport bénéfice-coût de l'administration, sont toujours mal définies (Krillov 2011, Wang *et al.* 2011). De nouveaux anticorps, de seconde génération, sont actuellement à l'étude et constituent ainsi des candidats très prometteurs pour les traitements curatifs et préventifs de ces infections (hors vaccins).

Le motavizumab (Numax, MedImmune), est un dérivé du palivizumab avec une meilleure affinité pour la protéine F (Wu *et al.* 2007). Bien que les essais cliniques aient démontrés une efficacité accrue pour la prévention des hospitalisations pédiatriques, par rapport au palivizumab (Carbonell-Estrany *et al.* 2010, Feltes *et al.* 2011), cet anticorps monoclonal ne sera probablement jamais commercialisé. En effet, son utilisation prophylactique a été rejetée par le comité de la FDA, probablement dû à des réactions d'hyper-sensitivité induites (Lowry 2010, Collins and Melero 2011). D'autres anticorps monoclonaux ciblant la protéine F de hMPV ont montré une excellente activité *in vitro* et *in vivo* sur des modèles animaux, mais ne sont pas encore entrés en essai clinique (Hamelin *et al.* 2008, Hamelin *et al.* 2010).

3.2.1.3.3 Inhibition de la protéine de fusion par des molécules chimiques

Une alternative intéressante aux peptides et anticorps inhibiteurs de fusion est la caractérisation de petites molécules présentant les mêmes propriétés inhibitrices.

En fonction des molécules, les modes d'action peuvent être très différents. Ainsi, contre la GP HA du virus influenza, la *tert*-butyl hydroquinone (TBHQ) réprime la fusion membranaire en bloquant les premiers changements conformationnels de la GP. Grâce à la résolution récente de la structure tridimensionnelle d'un complexe HA –TBHQ (Russell *et al.* 2008), il a été suggéré que cette molécule stabilise la GP dans sa conformation inactive à pH neutre, en liant 3 parties de la sous-unité HA₂ avec la sous-unité HA₁. Des études précliniques sont envisagées pour cette molécule et plusieurs de ces dérivés (Zhu *et al.* 2011).

Plusieurs inhibiteurs dérivé du benzimidazole interagissant avec F de hRSV ont aussi été étudiés (Douglas *et al.* 2005, Roymans *et al.* 2010). Ces composés semblent bloquer la formation de la structure 6HB lors du repliement de la GP F en forme post-fusion.

3.3 Perspectives

Ainsi, de nombreuses stratégies d'inhibition d'entrée des virus enveloppés ont été proposées depuis les années 1980 (Richardson *et al.* 1980). Cet objectif est toujours d'actualité pour de nombreux laboratoires de recherche, du fait des enjeux sanitaires que représentent les virus respiratoires pathogènes.

Cependant de nombreux obstacles existent. En effet les peptides ou immunoglobulines, qui sont pour beaucoup de grande taille, s'avèrent difficilement utilisables en clinique, posant des problèmes de stabilité, solubilité et d'innocuité. Une certaine toxicité peut également être observée, par exemple dans l'utilisation de l'aplaviroc, un inhibiteur de fusion contre HIV-1, qui a été abandonné en 2005 en raison de son effet hautement hépatotoxique (Nichols *et al.* 2008). Très peu de molécules arrivent au stade des essais cliniques en raison de leur toxicité et des coûts de développement.

4 Vaccins

A l'exception du vaccin contre MeV, il n'existe sur le marché aucun vaccin protégeant des paramyxovirus respiratoires pathogènes humains à ce jour, en dépit de l'importance de ces infections. Cependant il existe de très nombreuses études impliquant des candidats vaccins, certaines ayant atteint le stade des essais cliniques.

Un vaccin idéal est celui qui induit une bonne protection contre les infections et idéalement sur le long terme, tout en correspondant aux critères de sécurité établis. Plusieurs stratégies vaccinales conventionnelles contre les paramyxovirus seront décrites dans les paragraphes suivants, notamment celles basées sur l'utilisation de vaccins inactivés, vivants atténués ou sous-unitaires. Les nouvelles stratégies d'immunisation à base de pseudo-particules virales (VLP), de virus recombinants ou vecteurs, ou se basant sur l'administration d'acides nucléiques seront également revues. Les différentes voies d'administration, et particulièrement l'administration intra-nasale qui permet une délivrance de la dose vaccinale par la même voie que l'infection naturelle, seront aussi détaillées.

4.1 Vaccins inactivés

Les vaccins inactivés sont des particules virales complètes rendues inactives, généralement suite à une incubation en présence de formaline ou par chauffage de la production virale en solution. Les principaux avantages de ces vaccins, qui correspondent à la plupart des doses de vaccination, notamment contre la grippe, sont leur excellente stabilité, une relative facilité de production et un risque biologique réduit, voire quasi nul, du fait de l'absence de réplication virale.

A la fin des années 1960, un vaccin hRSV inactivé par la formaline et précipité par de l'alun (FI-RSV) a été évalué lors de différents essais cliniques concurrents (Fulginiti *et al.* 1969, Kapikian *et al.* 1969, Kim *et al.* 1969). De façon inattendue, plusieurs études ont rapporté qu'une majorité des enfants vaccinés (jusqu'à 80%) devaient être hospitalisés après la survenue d'infection naturelle. Ce chiffre impressionnant est à comparer aux 5% d'hospitalisation pour les enfants ayant reçu un vaccin contrôle sans virus (Kim *et al.* 1969). Il faut toutefois tempérer ces résultats, car d'autres études menées en parallèle n'ont pas toutes démontré un taux aussi élevé de pathologie induite par le vaccin (phénomène couramment nommé *enhanced disease* en anglais), même si une tendance similaire a pu être rapportée.

Ainsi, l'échec de cette première tentative de vaccination par un paramyxovirus inactivé a durablement impacté le développement de nouveaux vaccins pour cette famille de virus. De plus des symptômes accentués de la maladie après l'infection de différents modèles animaux immunisés avec des vaccins inactivés à la formaline de hPIV-3 (Ottolini *et al.* 2000) et hMPV (de Swart *et al.* 2007, Hamelin *et al.* 2007, Yim *et al.* 2007) ont aussi été observés. Pour toutes ces raisons, la recherche de vaccins paramyxovirus inactivés a été quasiment abandonnée depuis, tout du moins dans le contexte de la vaccination d'individus séronégatifs. Mis à part les virus des oreillons et de la rougeole, dont les vaccins sont basés sur une souche vivante atténuée, aucun autre vaccin contre les infections par les paramyxovirus chez l'homme n'a été mis sur le marché.

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour tenter d'expliquer les causes de cette 'enhanced disease'. Il a été montré que la vaccination avec le FI-hRSV induit une réponse de type Th2 (Openshaw *et al.* 2001). Cette caractéristique est particulièrement surprenante car l'infection naturelle provoque plutôt une réponse de type Th1. Cette réponse Th2 serait responsable de lésions pulmonaires et une des hypothèses propose que cette réponse Th2 paradoxale soit due à une hypersensibilité causée par le formaldéhyde (Moghaddam *et al.* 2006). Cette hypothèse a longtemps été privilégiée, mais ne corrèle pas avec les vaccins contre la grippe qui sont eux aussi inactivés à la formaline et ne provoquent pas de 'enhanced disease'. Des travaux récents ont permis de proposer une autre hypothèse, basée sur l'activation des TLR par le vaccin inactivé. Delgado *et al.* ont ainsi démontré que le FI-hRSV induisait une faible activation des TLR. Cette faible activation empêcherait une maturation efficace des cellules B, qui produirait des anticorps très peu spécifiques des épitopes de hRSV lors d'une infection naturelle (Delgado *et al.* 2009). Des études supplémentaires restent donc nécessaires pour la compréhension de cette pathologie induite par la vaccination.

4.2 Vaccins vivants atténués

La plupart des stratégies de construction de ces vaccins sont basées sur une atténuation du virus via (i) une sélection, notamment par de nombreux passages en culture cellulaire *in vitro* dans certaines conditions (comme une sélection de virus se répliquant à une température plus basse que celle *in vivo* dans les voies respiratoires humaines), (ii) des mutations dans les gènes clés impliqués dans la réplication virale, (iii) la délétion de gènes non-essentiels et/ou (iv) l'utilisation de virus chimériques recombinants à base notamment de virus animaux proches,

comme les virus parainfluenza bovin de type 3 (bPIV-3) et Sendai (SeV), tels des vecteurs portant respectivement les glycoprotéines virales de hPIV-3 ou hPIV-1.

4.2.1 *Vaccins viraux non-recombinants.*

Ces vaccins sont traditionnellement obtenus après un grand nombre de générations en cellules et/ou systèmes allantoïques. L'avantage théorique de tels vaccins est d'induire une meilleure réponse immunitaire par rapport aux virus inactivés, car la semence vaccinale est capable de se répliquer (à faible niveau), d'être reconnue et de stimuler le système immunitaire, sans développer de pathologie. Ces avantages sont malheureusement aussi susceptibles de devenir des inconvénients quant à la biosécurité des vaccins, car il existe toujours un risque de réversion des semences vaccinales en un phénotype pathogène. Ce problème limite ainsi l'utilisation de tels vaccins, notamment pour les femmes enceintes et les personnes immunodéprimées.

Il existe des vaccins vivant atténués pour certain paramyxovirus. Pendant les années 1960, le groupe de Maurice Hilleman a développé le vaccin ROR qui protège contre 3 virus dont deux paramyxovirus : les virus des oreillons (MuV) et le virus de la rougeole (MeV). Ces souches atténuées après plusieurs générations dans des œufs embryonnés de poule, ont ensuite été produites sur des cellules embryonnaires de poulet (Hitchner and Johnson 1948, KATZ *et al.* 1958, KATZ *et al.* 1960, Buynak and Hilleman 1966, Hilleman *et al.* 1967, Young *et al.* 1967, Buynak *et al.* 1969).

Certains vaccins vivants atténués hRSV et hPIVs ont également été évalués (cpRSV (cpts-248/404) et hPIV3 cp45). Alors que la souche hPIV3 cp45 semble être bien tolérée et présente des propriétés immunogènes (Belshe *et al.* 2004), la souche cpRSV est responsable de certains effets secondaires et semble ainsi être insuffisamment atténuée (Wright *et al.* 2000). Une étude clinique de Phase I du hPIV3 cp45 est actuellement en cours (NCT01021397 et NCT01254175).

Il existe aussi un vaccin vétérinaire contre la maladie de Newcastle, causée par le virus NDV, nommé parfois paramyxovirus aviaire de type 1 (APMV-1). Il est classé parmi les *Paramyxoviridae*, au sein du genre *Avulavirus*. Ce dernier est assez étroitement apparenté au genre *Rubulavirus* dans lequel on retrouve les virus hPIV-2 et PIV-5. La maladie de Newcastle est fatale chez les poulets, avec des symptômes proches de ceux causés par le virus de la grippe aviaire (conjonctivite, diarrhées et pathologies respiratoires). Il n'y a pas de traitement

thérapeutique disponible, seules des mesures prophylactiques (vaccin) ou sanitaires (abatage des volailles) sont utilisées.

Les souches de NDV sont classées en 4 groupes relatifs à la sévérité des symptômes induits, présentés ici dans l'ordre décroissant (Gallili and Ben-Nathan 1998) : vélogénique (ex : Parrot 70181), mésogénique (ex : Komarov), lentogénique (ex : LaSota) et asymptomatique (ex : V4). Ces différents groupes résultent principalement d'une mutation dans le site de clivage de la protéine F. Les souches vélogéniques, qui touchent les volailles à tous les âges, induisent la mort d'un embryon de poulet en moins de 60H. Les souches mésogéniques sont moins virulentes et touchent principalement les jeunes poulets. Les souches lentogéniques quant à elle sont les moins virulentes et induisent des infections respiratoires modérées (Collins *et al.* 1993). La plupart des vaccins sont développés à partir de souches lentogéniques.

Les technologies de vaccins vétérinaires, et notamment du vaccin NDV, sont restées pendant plus de 50 ans très conventionnelles (Huang *et al.* 2003), avec l'utilisation d'une souche vivante atténuée lentogénique. Cependant malgré les très bonnes réponses immunogènes induites par ces souches, leur capacité intrinsèque à redevenir virulente par mutation sur le site de clivage de la GP F, ne permet pas de garantir une biosécurité maximale. Pour réduire le risque de réversion et pour augmenter le pouvoir immunogénique des souches virales atténuées, des mutations additionnelles et/ou des délétions de gènes peuvent être introduites spécifiquement dans le génome viral par génétique inverse. On obtient ainsi un virus recombinant. Il existe aussi des vaccins NDV inactivés (formaldéhyde) et adjuvantés (émulsion eau-huile ou hydroxyde d'aluminium), issus de souches vélogéniques ou mésogéniques conférant une résistance à plus long terme.

La vaccination NDV est effectuée conjointement avec les autres vaccinations nécessaires aux volailles. La méthode la plus courante pour les vaccins vivant atténués NDV est l'inoculation par instillation nasale et cloacale. Ils peuvent aussi être administrés par goutte oculaire, ou introduit dans l'eau de consommation. Les vaccins inactivés sont administrés, par injection.

4.3 Vaccins sous-unitaires

Un vaccin sous-unitaire est généré à partir d'une protéine virale complète ou partielle. Afin d'induire une réponse immunitaire forte, ces vaccins contiennent fréquemment des adjuvants. Ce type de vaccin est relativement aisé à produire et évite les risques associés à l'utilisation d'un virus vivant. Il peut donc potentiellement être utilisé chez les femmes enceintes et autres personnes à risque. L'immunisation maternelle avec ce type de vaccin contre le virus influenza a notamment été démontrée comme une méthode efficace pour protéger les nourrissons, en induisant le transfert d'anticorps maternels (Zaman *et al.* 2008).

La protéine considérée comme la plus immunogène parmi les paramyxovirus est la protéine F (Skiadopoulos *et al.* 2004, Lamb and Parks 2007). Toutefois, la glycoprotéine d'attachement peut aussi présenter un fort caractère immunogène, comme par exemple pour MeV (Griffin *et al.* 2008). De ce fait, la plupart des vaccins sous-unitaires évalués jusqu'à maintenant sont basés sur la GP de fusion (en combinaison ou non avec la glycoprotéine partenaire HN/G). Plusieurs études précliniques animales se sont révélées encourageantes, notamment avec l'utilisation de la protéine F de hRSV, hMPV et hPIV-3 (Brideau *et al.* 1993, Homa *et al.* 1993, Lehman *et al.* 1993, Cseke *et al.* 2007, Swanson *et al.* 2011). Un essai clinique de phase I, mené par Novavax, évalue actuellement un vaccin hRSV-F sous-unitaire chez des adultes en bonne santé (NCT01290419) (Novavax 2011). Par ailleurs, une autre étude préclinique pour hMPV rapporte qu'un vaccin F sous-unitaire non adjuvanté n'induit pas de protection à long terme chez des primates non-humains (Herfst *et al.* 2008).

4.4 Limitations actuelles et prospectives

L'échec de la vaccination par le vaccin inactivé FI-hRSV a considérablement impacté la recherche de nouveaux vaccins anti paramyxovirus. Bien que les vaccins sous-unitaires et vivants atténués soient très prometteurs, ils peuvent présenter certains inconvénients, comme une protection à moins long terme après vaccination ou un risque potentiel de biosécurité. Un autre problème majeur existe en ce qui concerne les virus hPIV, hMPV et hRSV. Il s'agit de la population ciblée : les nourrissons et les jeunes enfants. La réponse immunitaire des premiers est faible et peut être perturbée par les anticorps maternels (Collins and Melero 2011), il est donc difficile d'en induire une efficace et protectrice. De plus, nous avons vu que les pics d'hospitalisation dus aux infections par ces virus survenaient très jeune, les infections survenant

plus tard se révélant généralement bénignes. La population cible d'une vaccination est donc difficile à évaluer, mais le ciblage de l'entourage direct du nourrisson pourrait être une piste intéressante. La mère pourrait être la cible principale, mais la vaccination est limitée chez les femmes enceintes pour des raisons de biosécurité.

Le développement de vaccins plus efficaces et plus sûrs apparaît clairement comme une nécessité. Différentes approches innovantes sont aujourd'hui considérées, telles que i) la modification des séquences génomiques et peptidiques des vaccins et ii) la délivrance des protéines immunogènes d'intérêt par des vecteurs vaccinaux d'origine animale. Nous verrons quelques exemples de ces vaccins recombinants et chimériques prometteurs dans les prochains paragraphes.

4.5 Vaccins viraux recombinants

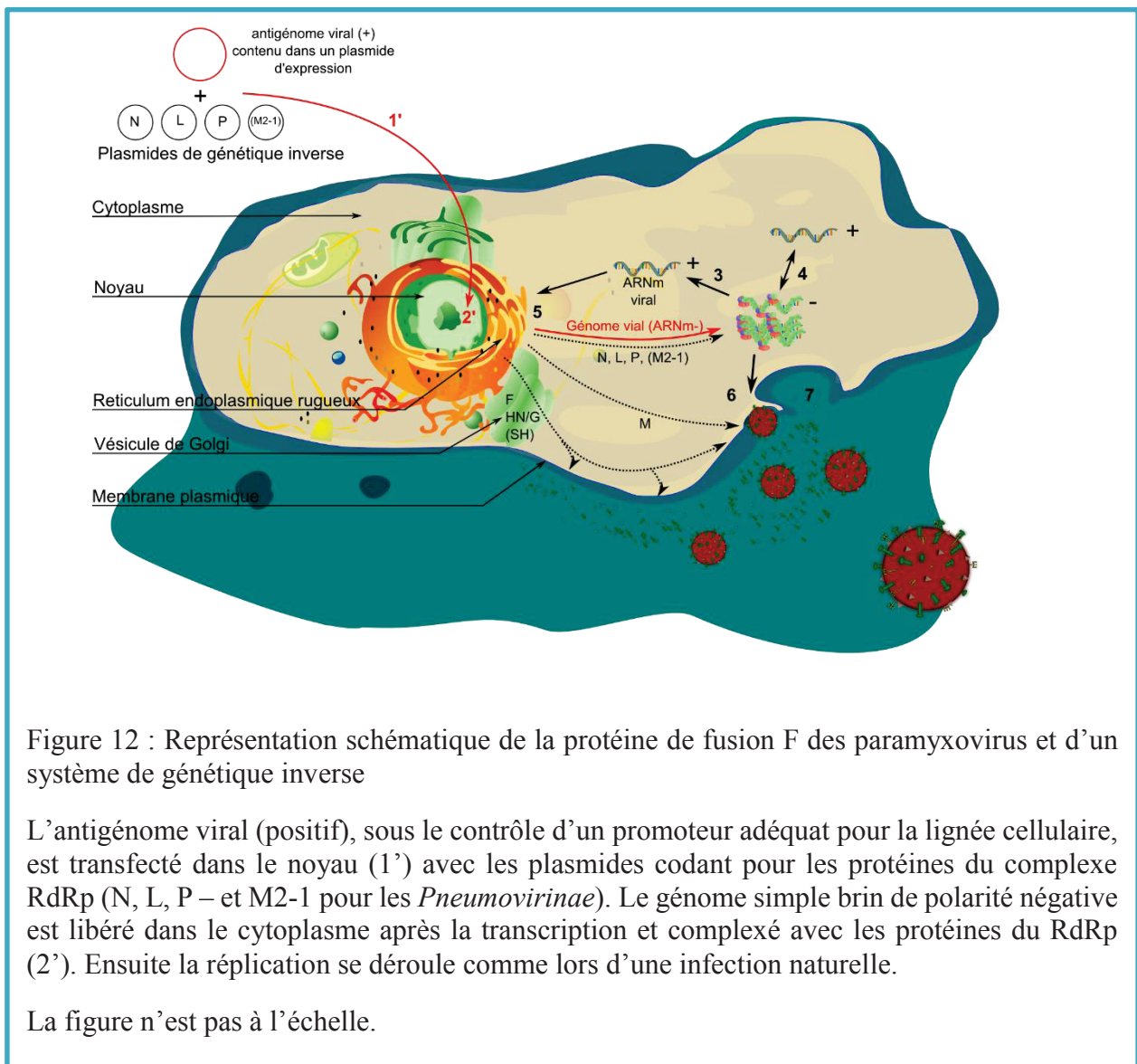
4.5.1 Ingénierie des génomes des paramyxovirus

L'évolution des techniques de biologie moléculaire permet désormais d'effectuer des modifications directement et à façon dans le génome viral. Un génome de paramyxovirus peut accepter jusqu'à 5000 bases supplémentaires de séquence génomique (Walpita and Flick 2005), ainsi que la suppression de plusieurs gènes. Cependant, certains paramyxovirus requièrent de suivre la « règle de six » : la taille totale du génome doit correspondre à un multiple de six (génome 6N) pour que le virus soit capable de se répliquer (Calain and Roux 1993, Pelet *et al.* 1996, Samal and Collins 1996, Durbin *et al.* 1997).

La transfection d'un jeu de plasmides dans des cellules permissives permet de produire des virons répliatifs par génétique inverse. Succinctement, l'antigénome d'ADN complémentaire (ADNc) est transfecté dans des cellules permissives, conjointement aux plasmides codant pour les protéines du complexe viral RdRp (Feuillet *et al.* 2011, Feuillet *et al.* 2011). Le prérequis pour toute manipulation génétique du virus est donc l'obtention et le clonage de l'antigénome dans un plasmide d'intérêt. Une représentation schématique d'un système de génétique inverse est présentée dans la Figure 12. Ce système est décrit précisément dans l'article 2 présenté dans ce manuscrit.

4.5.2 Vecteurs dérivés de paramyxovirus

Les principaux vecteurs dérivés des paramyxovirus, qui ont été développés jusqu'à présent, sont basés sur des Respiravirus humains ou animaux comme SeV, bPIV-3 et hPIV-3 ; des Pneumovirus et métapneumovirus comme hRSV et hMPV et leur alter ego animaux bRSV et aMPV ; des Rubulavirus tel que hPIV-2 ; des Avulavirus tel que NDV et des morbilivirus comme MeV (Zuniga *et al.* 2007, Yoneda *et al.* 2013). Ces vecteurs ont été développés afin de remplir trois objectifs opérationnels principaux : i) l'atténuation de la souche vaccinale *in vivo*, ii) la protection efficace contre la réplication du virus *wt* dans les voies respiratoires supérieures et inférieures et iii) la production industrielle efficace des semences vaccinales.



L'utilisation de bases virales d'origine animale comme SeV, bPIV-3 et NDV a notamment pour but de réduire l'impact de la réponse immunitaire préexistante chez l'homme contre le vecteur, pour le rendre ainsi plus efficace. Ces vecteurs sont de plus considérés comme déjà atténués chez l'homme, car ils peuvent infecter l'homme, sans toutefois induire une pathologie. Néanmoins, de par leur spectre d'infection spécifique à l'animal, il convient d'évaluer les propriétés de ces vecteurs lors de l'administration à l'homme, et notamment leur capacité d'infection et d'expression d'antigènes *in vivo*.

Alternativement, les vecteurs basés sur des virus humains doivent être atténués. Cela peut être réalisé par l'acquisition d'une ou plusieurs mutations thermosensibles (*ts*), obtenue après plusieurs passages *in vitro* à une température plus élevée ou plus basse que celle requise pour une infection *in vivo* chez l'homme. Une autre méthode plus efficace et ciblée consiste en la suppression de protéine accessoire et/ou la mutation spécifique d'un gène essentiel pour atténuer (*att*) la virulence des vecteurs. Ces options réalisables grâce aux outils de biologie moléculaire présentent un risque moindre de réversion des génomes et du phénotype *wt*, notamment via la combinaison de plusieurs mutations d'intérêt (*att* et *ts*).

4.5.3 Vaccins hMPV recombinants

Mon travail de thèse s'est inscrit dans un objectif de développement à terme d'un candidat vaccin hMPV. Mes recherches se sont focalisées sur l'ingénierie de la protéine F de hMPV, dans le but de produire une protéine optimisée et d'induire ainsi une meilleure réponse immunitaire. Malgré la découverte récente de ce virus, différentes initiatives et développements de candidats vaccins basés sur hMPV ont été menés ces dernières années (Biacchesi *et al.* 2005, Pham *et al.* 2005)

De fait, les principales stratégies utilisées pour le développement de vaccins recombinants hRSV ont été adaptées à hMPV. Toutes les constructions décrites dans la littérature permettent une atténuation grâce à la suppression d'un gène accessoire et/ou le remplacement d'un gène essentiel. Les vaccins rhMPV- Δ M2-2 et rhMPV- Δ G par exemple, ont été obtenus par la suppression des gènes M2-2 et G, respectivement (Biacchesi *et al.* 2005). Ces candidats vaccins sont efficacement atténués, malgré une réduction constatée du titre viral de seulement 0.8 log₁₀ pour le virus rhMPV- Δ G dans le tractus respiratoire supérieur de singes verts africains (AGM) par rapport au virus sauvage.

Ces études semblent indiquer que ces vecteurs recombinants sont efficaces pour protéger contre une réinfection par hMPV *wt*. Une réduction jusqu'à 3 et 4,5 log₁₀ du titre viral

in vivo dans les tractus respiratoires supérieur et inférieur, respectivement, des AGM a été observée 28 jours post-challenge. Cependant, il faut noter qu'une prévalence élevée de mutations fortuites sur l'ensemble du génome a été observée en l'absence de la protéine M2-2 (Schickli *et al.* 2008). Ceci qui pourrait limiter l'intérêt chez l'homme de ce candidat vaccin (rhMPV-ΔM2-2). Il a aussi été démontré que le virus rhMPV-ΔG augmentait la réponse IFN ainsi que la voie de transcription IRF- et NF-κB-dépendante (Bao *et al.* 2008). D'un autre côté, la protéine G recombinante (sous forme soluble) est immunogène, mais non protectrice contre une infection avec le virus *wt* chez les rats des cotonniers (Ryder *et al.* 2010). Ces résultats confortent le développement de vaccins déficient pour la protéine G, cette dernière n'ayant qu'un faible impact sur l'immunogénicité des candidats vaccins.

Le rhMPV-Pa est un autre candidat vaccin prometteur qui exprime la protéine P d'aMPV, en remplacement de sa propre protéine P (Pham *et al.* 2005). Il induit la production d'anticorps neutralisant à un niveau similaire de celui observé après une infection naturelle. Il permet également la réduction efficace de la réplication de hMPV *wt* après un challenge, dans les tractus respiratoires supérieur et inférieur des AGM. De plus, le candidat vaccin rHMPV-Pa est complètement atténué puisqu'il ne se réplique qu'à des titres faibles dans la trachée et le nasopharynx des AGM. Ces caractéristiques encourageantes ont mené ce candidat en évaluation clinique de phase I pour être testé sur des enfants séropositifs à hMPV. Cependant hMPV et hMPV-Pa ont été rapportés comme ayant une faible capacité d'infection, et donc potentiellement d'immunisation, chez les adultes sains séropositifs à hMPV (NCT01109329) (Biacchesi *et al.* 2007, Schmidt 2011). Ceci met ainsi en exergue le besoin de vacciner les enfants séronégatifs à hMPV avec ce type de vecteur.

4.6 Autres stratégies vaccinales

En plus des stratégies vaccinales décrites ci-dessus, d'autres approches basées sur des vecteurs à ADN ou non virales sont en cours de développement.

Une des pistes les plus explorées actuellement est l'utilisation de pseudo-particules virales (VLP) exprimant des antigènes à leur surface, généralement la protéine F (McGinnes *et al.* 2010, McGinnes *et al.* 2011). Les VLP sont des enveloppes ou capsides virales incapables de se répliquer dans les cellules de l'hôte, car elles ne contiennent pas le matériel génétique des virus. Les VLP sont donc considérées comme plus sûres que les vaccins vivants atténués. Elles sont déjà utilisés pour des vaccins contre le virus de l'hépatite B (Engerix, Recombivax) et le virus du papillome humain (Cervarix, Gardasil) par exemple (Roldao *et al.* 2010).

La recherche de vaccins VLP est aussi très active pour les paramyxovirus, avec de nombreux candidats actuellement évalués, comme par exemple pour hMPV (Levy *et al.* 2013). Cette pseudo particule lentivirale, exprimant les glycoprotéines F et G de hMPV, permet d'induire une protection efficace contre l'infection des deux sous-types de hMPV chez les souris BALB/c. De plus, elle permet d'induire un fort taux d'anticorps neutralisants contre le virus.

D'autres vecteurs, tels que des adénovirus (AdV) non répliatifs, sont aussi utilisés dans le développement de vaccins (Fu *et al.* 2009). Cependant, la forte proportion d'individus séropositifs aux AdV et la toxicité hépatique potentielle de ce type de vecteurs ont freiné leur développement.

4.7 Considérations et perspectives sur le développement des vaccins paramyxovirus

Tous les vaccins basés sur des vecteurs paramyxovirus actuellement évalués en essai clinique ou préclinique sont administrés par la voie intranasale, parfois combinée avec une inoculation intratrachéale. Cette dernière semble nécessaire pour les vaccins basés sur le vecteur NDV (DiNapoli *et al.* 2009). Cependant, ce type d'administration est difficile et n'est pas adapté à une vaccination de masse. L'utilisation de solution sous forme d'aérosol, et une brumisation efficace de la solution vaccinale, semblent être une option idéale pour atteindre le tractus respiratoire inférieur (Bennett *et al.* 2002, DiNapoli *et al.* 2009).

D'un point de vue industriel, la capacité à produire efficacement les vecteurs est essentielle pour réduire les coûts de production et donc permettre leur développement jusqu'au marché. Le développement du MEDI-534, un candidat vaccin polyvalent basé sur le virus bPIV-3 et ciblant hPIV-3 et hRSV, en est une bonne illustration. Le gène F de hRSV a été cloné à la première ou seconde position dans le génome (nom des constructions dans la publication : b/h PIV3/hRSV-F1 ou b/h PIV3/hRSV-F2) (Tang *et al.* 2003). Bien que les résultats préliminaires semblent indiquer une meilleure immunogénicité en faveur du candidat b/h PIV3/hRSV-F1 chez les singes rhésus, les chercheurs ont sélectionné la seconde construction pour les développements. En effet ce vecteur présente une meilleure capacité de production en système cellulaire (lignée Vero). Ce candidat est désormais en essai clinique de phase II (NCT : 00686075).

En ne prenant en compte que cet aspect, l'utilisation d'un vecteur NDV pourrait être avantageuse. En effet les industriels du vaccin produisent déjà ce virus sur des œufs embryonnés de poule (Rauw *et al.* 2009). La maîtrise de la technologie pour une production efficace de ce type de vecteur permettrait de réduire les coûts de développement et de production de tels vaccins.

L'une des caractéristiques majeures des paramyxovirus respiratoires est leur capacité à réinfecter tout au long de la vie des individus. Il est donc important d'augmenter la durabilité de la réponse immune. Ceci pourrait être obtenu en développant de nouveaux adjuvants ou en utilisant de nouvelles voies d'administration des vaccins paramyxovirus, à l'image des stratégies développées pour les virus Influenza par exemple (Mastelic *et al.* 2010, Durando *et al.* 2011).

Enfin, la problématique principale est le choix de la population cible pour la vaccination paramyxovirus respiratoire. Schmidt *et al.* décrivent dans un article de revue, (Schmidt *et al.* 2011), que les nourrissons de moins de quatre mois, qui sont les plus sensibles à ces infections virales, ne sont pas en mesure de produire une réponse immunitaire forte avec une seule administration. Ils en nécessitent au moins deux, voire davantage. Cette réponse faible est due en partie aux anticorps maternels, transmis passivement et qui protègent le nourrisson les premiers mois de sa vie en neutralisant la plupart des antigènes. Une approche alternative serait donc de vacciner les femmes enceintes, qui protégeraient ainsi indirectement l'enfant par le transfert transplacentaire d'anticorps efficaces contre les paramyxovirus respiratoires.

Cependant, les risques en termes de biosécurité excluent l'utilisation des vaccins vivants atténués et privilégient la stratégie sous-unitaire chez la femme enceinte.

La vaccination des personnes âgées est aussi à prendre en compte, car cette population est également touchée par ces infections respiratoires. La présence d'anticorps neutralisants, même à faible dose, risquerait d'affecter l'efficacité du vaccin. L'utilisation d'un vaccin basé sur un virus d'origine animal, ou de type sous-unitaire en combinaison avec un adjuvant, pourrait donc constituer une approche pertinente pour cette population cible.

En général la recherche actuelle tend vers le développement de vaccins chimériques multivalents, capables de couvrir jusqu'à 4 infections virales différentes. Cette stratégie permettrait de réduire drastiquement les coûts, et ainsi de « populariser » ces vaccins. Cette stratégie permettrait à terme de réduire l'impact des infections respiratoires sévères à paramyxovirus en protégeant davantage les différentes catégories de population.

5 Utilisation des protéines F dans les vecteurs oncolytiques

Les vecteurs oncolytiques viraux sont des outils prometteurs dans la stratégie de lutte contre le cancer. De nombreux virus sont utilisés à cette fin, mais la recherche actuelle est plus largement axée sur des vecteurs basés sur les adénovirus, le virus de la vaccine, le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) et les virus du type herpès simplex (HSV). De nombreux articles de revue ont pour objet ces derniers (Alemany *et al.* 2000, Varghese and Rabkin 2002, Hastie and Grdzlishvili 2012, Verardi *et al.* 2012, Angarita *et al.* 2013, Choi and Yun 2013). Il existe aussi de nombreux autres vecteurs potentiels, comme par exemple les paramyxovirus MeV, MuV et NDV (Lech and Russell 2010, Msaouel *et al.* 2013). L'intérêt des différentes plateformes virales étant les cellules ciblées, qui varient selon le type de tumeurs.

L'adénovirus de type 5 (AdV-5) est cependant le virus le plus utilisé en tant que vecteur. C'est un virus humain, non enveloppé et à ADN double brin. Le vecteur adénoviral est considéré comme anti angiogène, notamment car sa protéine E1A interagit avec des protéines angiogènes telle que p300, un co-activateur transcriptionnel (Saito *et al.* 2006, Ye *et al.* 2006). Cette protéine permet de sous-réguler l'activité des facteurs de croissance vasculaire endothéliaux, impliqués dans la prolifération cellulaire.

Le développement de vecteur à base de sérotype plus rare d'AdV est de plus en plus privilégié (Michael 2012). L'infection à AdV-5 est en effet très commune au cours de l'enfance, et ce partout dans le monde (Thorner *et al.* 2006), et la présence d'anticorps neutralisants préexistants pourrait défavoriser l'infection des cellules tumorales par le vecteur. Par exemple, l'utilisation d'un vecteur réplicatif AdV-5 exprimant un transgène de HIV-1 comme GAG et utilisé comme vaccin, donne une très faible réponse immune contre le transgène chez les sujets séropositifs à AdV-5 lors d'une infection ultérieure par HIV-1 (Cheng *et al.* 2010).

La cytotoxicité du vecteur basé sur l'AdV-5 est démontrée, mais peut encore être améliorée, puisque leur propagation au sein d'une tumeur compacte reste notamment très limitée (Alemany *et al.* 2000, Sauthoff *et al.* 2003). La plupart des modifications pour améliorer l'efficacité du vecteur ont pour but (i) de cibler sélectivement les cellules cancéreuses, en modifiant les protéines de la capside virale ; (ii) d'augmenter l'activité du promoteur en amont de E1 ou alors d'utiliser un transgène pour équiper le virus contre les tumeurs (Alemany 2009). Cette dernière stratégie a été utilisée pour augmenter la cytotoxicité du vecteur, modifier le microenvironnement tumoral, ou encore induire une réponse immune contre les cellules

tumorales (Cody and Douglas 2009). L'utilisation de glycoprotéines de fusion virale constitue de ce fait une stratégie de choix dans cette perspective.

L'utilisation de ces glycoprotéines est intéressante car elles sont très cytotoxiques lorsqu'elles sont exprimées dans une cellule. De plus, les cellules environnantes non transduites sont elles aussi touchées par une mortalité plus élevée : la formation de syncytiums cellulaires induit un effet dit '*bystander*', ou témoin, qui permet d'impacter les cellules tumorales environnantes non transduites par le vecteur (Bateman *et al.* 2000, Higuchi *et al.* 2000, Lin *et al.* 2010). Enfin, des études *in vivo* ont démontré que ces GP de fusion induisent une réponse immune forte, capable d'agir sur des tumeurs distantes non traitées par le vecteur oncolytique (Bateman *et al.* 2002, Ahmed *et al.* 2003, Hoffmann *et al.* 2007, Hoffmann *et al.* 2007, Hoffmann *et al.* 2007, Hoffmann *et al.* 2008).

Les principales glycoprotéines virales transgéniques testées sont la gp120 de HIV-1, la protéine de fusion du virus de la leucémie du Gibbon (GALV), de MeV, de hRSV, de VSV et de PIV-5 (Li *et al.* 2001, Brade *et al.* 2003, Gomez-Trevino *et al.* 2003, Allen *et al.* 2004, Hoffmann *et al.* 2006, Hoffmann and Wildner 2006, Hoffmann *et al.* 2007, Hoffmann *et al.* 2007, Hoffmann *et al.* 2007, Hoffmann *et al.* 2007, Hoffmann and Wildner 2007, Guedan *et al.* 2008, Hoffmann *et al.* 2008, Hoffmann *et al.* 2008, Durupt *et al.* 2012, Guedan *et al.* 2012).

L'utilisation de protéines de fusion en tant que transgènes soulève cependant quelques problèmes. C'est le cas pour la plupart des glycoprotéines F des paramyxovirus, qui nécessitent une activation par une seconde glycoprotéine, comme cela a déjà été vu ci-dessus. La construction des vecteurs ne permet généralement pas d'ajouter de gène codant une seconde protéine dans le génome adénoviral, la taille maximum possible étant déjà atteinte. Un second écueil pourrait être dû paradoxalement à la cytotoxicité de ces protéines, qui empêche la production efficace du vecteur dans un système cellulaire.

Mon travail de thèse s'est également inscrit en partie dans le cadre d'un projet d'ingénierie de la protéine F de PIV-5 mené au laboratoire pour son exploitation en tant que gène fusogène d'intérêt dans les vecteurs oncolytiques. Un article soumis à publication est présenté dans ce manuscrit.

RESULTATS ET DISCUSSION

1 Introduction

La préparation de cette thèse s'est effectuée dans le cadre d'un programme de recherche mené sous la supervision du Dr Manuel Rosa-Calatrava et dans la continuité des travaux du Dr Olivier Terrier. Ces travaux se sont focalisés sur l'étude des protéines F de hPIV-2 (Terrier *et al.* 2008) et de PIV-5 (Terrier *et al.* 2009, Terrier *et al.* 2009) et leur ingénierie en vue de leur exploitation dans un vecteur adénoviral oncolytique, construit par le Dr François Durupt (Durupt *et al.* 2012), (article 3 ci-dessous). Plusieurs brevets ont été déposés dans le cadre de ce programme (FR 07 05235 – PCT/FR 2008/001067-WO 2009/037402 A9, FR 08/06547 - PCT/FR2009/001317 – WO 2010/058100, FR 08/06548 - PCT/FR2009/001318 – WO2010/058099).

Dans ce contexte, j'ai eu l'opportunité au cours de mon travail de thèse d'étudier différents paramyxovirus et de mettre au point diverses techniques innovantes. Mes travaux ont donné lieu à une publication sur la protéine F de hPIV-2 et à la préparation d'un article à soumettre sur hMPV, en tant que premier auteur (articles 1 et 2). J'ai également contribué au travail d'ingénierie de la protéine F de PIV-5 pour son exploitation dans un vecteur oncolytique basé sur l'AdV-5 (article 3). J'ai aussi fait une communication orale, lors d'un congrès international (ESCV à Amsterdam), sur une technique de mesure de quantification de la fusion cellule-cellule en utilisant des nanoparticules fluorescentes. Enfin, j'ai également effectué un travail bibliographique sur les nouvelles générations de vaccins vivants atténués et multivalents basés sur un vecteur paramyxovirus, qui a donné lieu à une revue en tant que premier auteur (article 4).

Le début de ce travail de thèse s'est fait autour de la protéine F de hPIV-2, avec la construction de plasmides d'expression des protéines F et HN de la souche Greer et leur modification. Un ensemble de mutants a été évalué. Le choix de ces mutants s'est basé sur l'analyse de certains variants cliniques de hPIV-2 (Terrier *et al.* 2008), présentant un phénotype hyperfusogène en culture cellulaire *in vitro*. Ce caractère hyperfusogène a été déterminé par la capacité du virus à induire la formation de grosses structures multinucléées, résultat de la fusion entre plusieurs cellules, appelées syncytiums. D'autres mutations ont été sélectionnées, sur la base de mutations décrites comme ayant un impact sur la fusion membranaire chez PIV-5 ou NDV (Reitter *et al.* 1995, Paterson *et al.* 2000, Terrier *et al.* 2008). Des mutations analogues ont été effectuées à partir d'une comparaison de séquence des protéines F de PIV-5, hPIV-2 et NDV. Parmi l'ensemble des mutations étudiées, uniques ou en combinaison, une mutation

unique T96A a attiré notre attention et a fait l'objet d'une publication scientifique (Le Bayon *et al.* 2013), (article 1, ci-dessous).

La deuxième partie de ce travail de thèse s'est faite dans la continuité directe de l'optimisation de la protéine F pour obtenir des caractéristiques hyperfusogène. Le but était d'étudier l'implication des domaines modifiés dans la fusion, avec l'objectif également de construire de nouveaux outils thérapeutiques, comme pour PIV-5 (Terrier *et al.* 2009, Durupt *et al.* 2012), (article 3 ci-dessous). Cette deuxième partie s'est articulée autour de la protéine F de hMPV, cette dernière est en effet indépendante de sa glycoprotéine d'attachement G pour son activité de fusion et la promotion de la fusion. Cette propriété représentait ainsi un avantage majeur par rapport à la protéine F de PIV-5, qui avait nécessité un travail d'ingénierie préalable pour la rendre indépendante de sa GP d'attachement HN.

De plus, l'étude de la GP F d'hMPV représente d'autres avantages. Le virus a été découvert récemment (van den Hoogen *et al.* 2001) et forme un nouveau genre de paramyxovirus (Figure 1), (Boivin *et al.* 2002). Il nous est donc paru intéressant d'appliquer la stratégie appliquée à F de PIV-5, pour valider les hypothèses formulées sur les mutations de pré-fusion et de post-fusion proposées. De plus, le partenariat mis en place avec l'équipe du Dr Guy Boivin de l'université Laval, outre son expertise et sa reconnaissance internationale dans le domaine de hMPV (Boivin *et al.* 2002), nous donnait l'opportunité d'utiliser un système de génétique inverse afin d'évaluer l'impact des mutations dans la GP F dans un contexte viral

A ce titre le Dr Boivin m'a accueilli au sein de son groupe de recherche à Québec au Canada pendant 15 mois sur ce projet. Il m'a permis d'évaluer et de valider fonctionnellement plusieurs mutations ponctuelles et leurs combinaisons dans la GP F, en termes de phénotype hyperfusogène. Le projet prévoyait aussi d'évaluer l'impact de ces combinaisons de mutations dans le cadre d'une infection *in vivo*, et d'examiner la réponse immunitaire induite chez des souris Balb/c. L'impossibilité de produire certains des virus combinant plusieurs mutations, et la nécessité d'optimiser spécifiquement la technique de génétique inverse, m'ont empêché d'aborder cette phase importante du projet. Le seul virus recombinant produit, exprimant la protéine F mutante de hMPV évaluée comme la plus fusogène semble montrer une déficience répllicative (article 2, ci-dessous).

Malgré tout, le projet continue dans le laboratoire du Dr. Boivin, en partenariat avec l'équipe du Dr. Rosa-Calatrava. Nos objectifs sont d'établir un lien éventuel entre le caractère hyperfusogène de F, la virulence et la réponse immune induite chez l'hôte. Ce travail a pour

objectif à terme de construire des vaccins recombinants avec une GP F optimisée, si le lien hyperfusogénicité – réponse immune pouvait être établi.

Tous ces travaux m'ont permis de couvrir un large pan de la recherche de nouveaux outils thérapeutiques, en partant de la découverte de nouvelles mutations parmi des souches virales cliniques, jusqu'à leur application et leur évaluation en tant qu'outil dans un vecteur oncolytique ou le développement de vaccin candidat.

2 Article 1 : Caractérisation d'un résidu clé pour le phénotype hyperfusogène de la glycoprotéine de fusion du virus parainfluenza humain de type 2.

2.1 Introduction

Les virus hPIV sont des pathogènes responsables d'infections respiratoires plus ou moins graves, touchant le tractus respiratoire inférieur et supérieur humain. Un ensemble de souches cliniques variantes ont été précédemment décrites, notamment au sein de notre laboratoire (Terrier *et al.* 2008). Dans cette étude, certaines de ces souches présentaient une particularité phénotypique lors de l'infection *in vitro* de tapis cellulaires de lignées A549. Elles induisaient la formation de syncytiums de taille plus importante et en plus grand nombre, avec des effets cytopathiques amplifiés, par rapport à la souche sauvage de référence *Greer*. Ces souches ont ainsi été décrites comme hyperfusogènes (Terrier *et al.* 2008). La caractérisation des séquences de gènes codant les protéines de surface F et HN a permis de mettre en lumière la substitution récurrente d'un résidu. L'acide aminé alanine était remplacé par un résidu thréonine en position 96 de la sous-unité F2 de la protéine F (A96T) dans les différentes souches variantes, par rapport à la souche de référence non hyperfusogène.

Afin d'évaluer le lien fonctionnel de cette mutation avec les phénotypes hyperfusogène des souches variantes, j'ai entrepris de muter la protéine F de la souche de référence *Greer*. Il s'agissait également de l'exprimer de manière transitoire dans la lignée cellulaire A549 d'épithélium respiratoire humain, en présence et en absence de l'expression de la protéine HN homotypique. La fusion intercellulaire induite par F, conduisant à la formation de syncytiums, a été évaluée grâce à une technique de quantification de la fusion basée sur l'expression d'un gène rapporteur luciférase (technique détaillée dans l'article 2). L'expression en surface de la protéine F a été confirmée par immunomarquage et l'observation des cellules transfectées en microscopie confocale. Elle a aussi été quantifiée par cytométrie de flux. Nous avons ainsi pu démontrer que la mutation A96T a un effet important sur l'activité de fusion de la protéine F, mettant en lumière le rôle de la sous-unité F2 dans la régulation de la fusion. En effet, la protéine F exprimée seule est capable d'induire faiblement la fusion cellulaire. Cette capacité est quasiment inhibée par la mutation A96T. A l'inverse, en condition de co-expression de la protéine F mutée A96T avec la protéine d'attachement HN wt, un phénotype hyperfusogène a pu être constaté. Les mécanismes moléculaires de cette transactivation de la coopération de HN

n'ont pu être déterminés dans le cadre de cette étude, mais plusieurs hypothèses ont été formulées et discutées dans l'article publié.

Cet article a été publié dans le journal international à comité de lecture en langue anglaise **Virus Genes**.

Le Bayon, J.-C., et al., Characterization of a key residue for hyperfusogenic phenotype in human parainfluenza virus type 2 (hPIV-2) fusion glycoprotein. *Virus Genes*, 2013: p. 1-5. DOI: 10.1007/s11262-013-0932-0

2.2 Article

2.2.1 *Characterization of a key residue for hyperfusogenic phenotype in human parainfluenza type 2 (hPIV-2) fusion glycoprotein*

Characterization of a key residue for hyperfusogenic phenotype in human parainfluenza virus type 2 (hPIV-2) fusion glycoprotein

Jean-Christophe Le Bayon · Olivier Terrier ·
Gaëlle Cartet · Bruno Lina · Manuel Rosa-Calatrava

Received: 6 March 2013 / Accepted: 31 May 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract Human parainfluenza viruses (hPIV) are pathogens responsible for upper and lower respiratory tract infections. We previously described clinical variant strains of hPIV-2 that display unusual large syncytial cytopathic effects. Their molecular characterization revealed a recurrent conserved specific amino acid substitution: A96T in the F2 subunit of the fusion glycoprotein F. The objective of this study was to investigate the contribution of this A96T substitution to the specific hyperfusogenic properties of the hPIV-2 variant strains. Based on a transient expression strategy, quantification of cell–cell fusion assays, and flow cytometry, we have shown that the A96T mutation strongly alters the fusogenic properties of F hPIV-2, highlighting this key residue in the F2 subunit and its possible role in fusion regulation. This work highlights the benefits of monitoring genetic and phenotypic changes of circulating strains to complete our understanding of Paramyxovirus fusion and related pathogenesis.

Keywords *Paramyxoviridae* · Paramyxovirus · Parainfluenza virus · Fusion protein · Hemagglutinin–neuraminidase protein

Introduction

The Paramyxovirus family includes numerous viruses that are of importance to animal and human health [1]. Within this family, human parainfluenza viruses (hPIV), belonging to the *Rubulavirus* genus, are responsible for upper and lower respiratory tract infections in young children, the elderly, and immunocompromised adults. Neither specific antivirals nor prophylactic approaches are available yet [2–5]. Cellular entry of hPIV occurs by two steps. Following the virion anchorage at the cell surface, a pH-independent fusion occurs between the viral envelope and the cellular membrane. This process is mediated by two viral glycoproteins (GP) at the surface of the viral particle: (i) the hemagglutinin–neuraminidase (HN) that binds to sialo-conjugated cell surface receptors and (ii) the fusion glycoprotein (F), which promotes membrane fusion [6, 7]. Similarly to other class I viral glycoproteins, F is synthesized as a precursor (F0) that must be proteolytically cleaved at polybasic residues, to generate the biologically active forms (F1 and F2). The F1 polypeptide exposes a fusion peptide (FP, Fig. 1a), whose function is to be inserted into target membrane. HN is thought to be implicated in the activation of F, possibly through direct interactions [8–10]. Previous work on hPIV-2, PIV-5, or NDV determined some of the functional regions involved in F/HN interactions, but the nature of implicated residues remains to be elucidated [11–13]. The F2 subunit region was also demonstrated to play an important role in the activation of F [14]. We have previously shown on the

Jean-Christophe Le Bayon and Olivier Terrier equally contributed to this study.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11262-013-0932-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

J.-C. Le Bayon · O. Terrier (✉) · G. Cartet · B. Lina ·
M. Rosa-Calatrava (✉)
Laboratoire de Virologie et Pathologies Humaines VirPath,
EA4610 UCBL/HCL, Equipe VirCell, Faculté de Médecine
Laennec, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de
Lyon, 69372 Lyon Cedex 08, France
e-mail: olivier.terrier@univ-lyon1.fr

M. Rosa-Calatrava
e-mail: manuel.rosa-calatrava@univ-lyon1.fr

Published online: 08 June 2013

 Springer

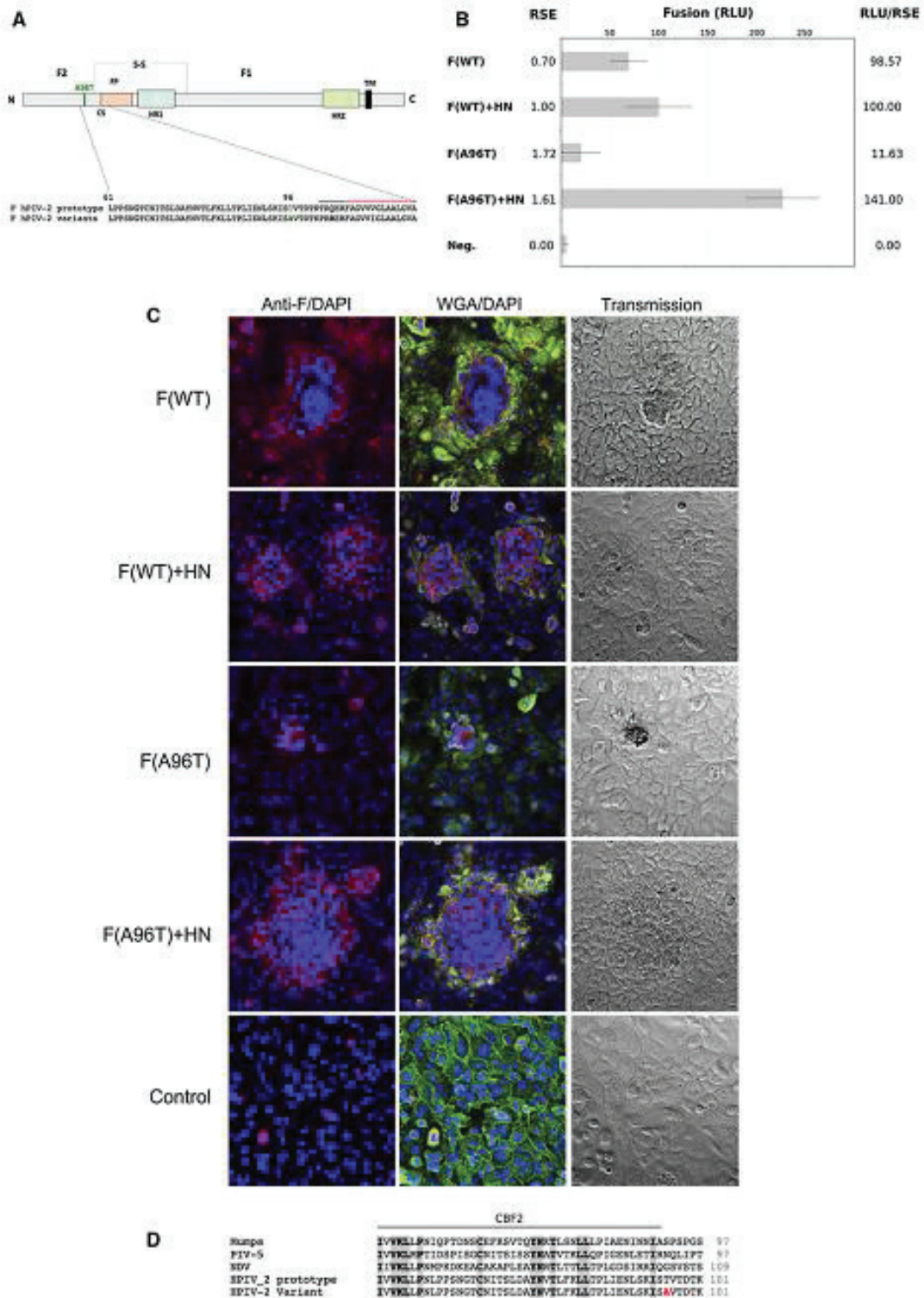


Fig. 1 **a** Schematic diagram of hPIV-2 F functional domains. The different domains are indicated in F1 and F2 subunits (S–S disulfide link, CS cleavage site, FP fusion peptide, HR1 and HR2 heptad repeat domains, TM transmembrane domain, CT carboxy-terminal tail). A96T substitution is highlighted in green in the alignment of amino acid residues 61–120 between prototype and variants F hPIV-2. **b** Quantitative cell–cell fusion assay and cell surface expression. A549 cells were cotransfected for 12 h with plasmids encoding F (WT) and (A96T) with or without HN protein and a (LTR)-luciferase reporter plasmid. Cells were resuspended and overlaid onto HuH-7-Tat cells. At 48 h post-transfection, cells were lysed and luciferase activity was measured. Quantification of fusion (RLU) was expressed as a percentage of F (WT) + HN luciferase activity. Results are shown as mean $\pm$ SD (three independent experiments). Surface expression of F was determined by FACS analysis using NG8F5 antibody at 24 h post-transfection. The mean fluorescent intensity of cells is represented as relative surface expression (RSE) indexes, by comparison to F (WT) + HN coexpression (two independent experiments). The quantification of fusion normalized by the relative surface expression (RLU/RSE) is indicated in the right panel. **c** Syncytia assay. A549 cells were transfected with plasmids encoding F (WT) and (A96T), as indicated. F (WT) and HN proteins were coexpressed, as a reference for cell–cell fusion. After 48 h post-transfection, cells were fixed and immunostained with NG8F5 antibody (kind gift of Dr. Olivier Ferraris, Lyon, France) (red). Nuclei were counterstained with DAPI (blue) and membranes by WGA (green). Cells were examined at 60 $\times$ magnification by fluorescence and phase contrast confocal microscopy. One single optical section image was acquired at the level of representative syncytia. **d** Sequence alignment of CBF2 region. Within the F2 subunit of several Paramyxoviruses in regard to F hPIV-2 prototype and variant sequences, hPIV-2 residue 96 is indicated (red) (Color figure online)

PIV-5 model that isolated mutations or combinations of mutations in different functional domains of F can not only affect the HN-dependence for fusion, but also its fusogenic capacities and level of surface expression [15]. Once triggered, F undergoes a series of conformational changes causing the two lipid bilayers to closely merge [6, 16].

We previously reported the functional characterization of hPIV-2 clinical variant strains, which presented unusual phenotypic and antigenic characteristics [17]. Compared to hPIV-2 prototype strains, these variants were associated with larger plaque sizes and higher level of syncytia formation. The molecular characterization was focused on the two envelope GPs and revealed several amino acid substitutions localized in hPIV-2 F functional domains. Among them, an alanine to threonine substitution in position 96 (A96T) in the F2 subunit was remarkably conserved in sequences from the variant hyperfusogenic strains (Fig. 1a). The objective of this study was to investigate the contribution of this recurrent A96T substitution to the specific hyperfusogenic properties of hPIV-2 variant strains. This report details the functional characterization of F A96T mutated protein and discusses our findings with regard to cellular entry mechanisms of Paramyxoviruses.

Results and discussion

To evaluate the role of the hPIV-2 A96T mutation with regard to fusogenic capacities and surface expression, we used a transient expression strategy and methodologies similar to those we previously reported for the PIV-5 model [15]. We first generated hPIV-2 HN and F expression plasmids by cloning into pCDNA3.1(+) the F and HN cDNAs from the hPIV-2 prototype strain hPIV-2/Lyon/27640/2009 (accession number GU187338), as a standard reference. The F A96T mutation was then generated by site-directed mutagenesis PCR. Human lung epithelial A549 cells were transfected with either a plasmid expressing hPIV-2 wild type (WT) or mutant (A96T) F, together with an empty plasmid or the WT HN-expressing plasmid. To characterize the fusogenic properties of these constructs, we used a quantitative cell–cell fusion assay according to previously established protocols [15, 18]. In brief, A549 “donor” cells, expressing luciferase under the control of the HIV-1 promoter, were cocultured for 48 h with HuH7-Tat “indicator” cells, which constitutively expressed the HIV-1 Tat activator. Only syncytia generated by fusion of transfected A549 with HuH7-Tat cells are expected to express measurable levels of luciferase activity. In parallel, the surface expression of F constructs was evaluated by flow cytometry. Relative F surface expression (RSE) and relative quantification of fusion (RLU) were expressed as a percentage of values obtained with the coexpression of F (WT) and HN proteins (Fig. 1b).

When F (A96T) was expressed alone, it harbored much lower fusogenic levels than F (WT) (RLU around 20 and 70 %, respectively) (Fig. 1b). In contrast, we measured a high level of fusion when F (A96T) was coexpressed with HN, over twofold more compared to that induced by F (WT) and HN (RLU of 227 %, Fig. 1b). We did not observe any difference of fusion between F (WT) and F (A96T) when adding exogenous trypsin (data not shown). Interestingly, the F (A96T) surface expression was relatively high when it was expressed alone or together with HN, with RSEs of 1.72 and 1.61, respectively (Fig. 1b). Moreover, normalization of fusion values to relative surface expression (RLU/RSE, Fig. 1b) indicates similar indices for the F (WT) with or without the coexpression of HN (RLU/RSE of 98 and 100, respectively). In contrast, indexes calculated for F (A96T) were markedly different, with RLU/RSEs of 11.62 when expressed alone and 141.00 in the context of HN coexpression (Fig. 1b). All these results indicated a marked increase of fusogenic capacities for the A96T mutant, only in the presence of HN, suggesting a stronger HN-dependence for the F (A96T) compared to its WT counterpart.

The contribution of the A96T mutation in favor of fusion was also observed in syncytia assays (Fig. 1c). Expression of mutated F led to smaller syncytia than those induced by the F (WT). In contrast, in the context of HN coexpression, larger multinuclear cell structures were observed with F (A96T) in comparison with F (WT) (Fig. 1c). Similar results were obtained in LLC-MK2 cells, suggesting that the fusogenic properties of A96T F mutant are not cell type-dependent (data not shown). Altogether, these observations were in accordance with the above quantitative results and confirmed that the A96T mutation strongly alters the fusogenic properties of F hPIV-2. Also, these results point to the residue 96 in F2 subunit that could be involved in the F/HN functional interactions. In this way, we can hypothesize that this specific residue plays a role in the previously described biomolecular complementation for F and HN, and that any modifications at this position could alter the way F activation is "triggered" by HN [9]. In a complementary manner, higher level of surface expression for F (A96T) with regard to F (WT) could also be decisive in maximizing the F/HN functional relationships. Among Paramyxoviruses, a conserved region in the F2 (CBF2) subunit has been shown to be involved in the proper folding of F and in fusion regulation. Site-directed mutagenesis has revealed that mutations made to residues located at the edge of CBF2 resulted in altered fusion promotion activity [14]. Alignment and analysis of a set of Paramyxovirus F proteins (Fig. 1d) indicated that the F hPIV-2 A96T mutation is located in close proximity to the CBF2 region and could be implicated in the regulation of the fusion mechanism. This hypothesis will be further studied at the viral level, by a reverse genetic approach and could constitute one interesting tool to explore relationships between fusion and virulence for hPIV. Moreover, it has been shown that a threonine residue at the edge of F2 subunit of the cleaved activated F PIV-5 protein was involved in an interaction with the N-terminus FP on the F1 subunit [19]. As the end of the F2 subunit is quite dissimilar between hPIV-2 and PIV-5, the structure of hPIV-2 cleaved activated F will be an essential prerequisite to better understand the F activation and the possible HN interactions.

In conclusion, we have characterized a key A96T mutation in hPIV-2 F for HN-dependent fusion, from an initial comparison between clinical hPIV-2 strains with different fusogenic phenotypes [17]. Although we cannot exclude the role of additional amino acid substitutions, this work highlights the continuing interest in monitoring genetic changes and particular phenotypes of circulating viral strains, providing a source of useful data to better understand viral-mediated membrane fusion.

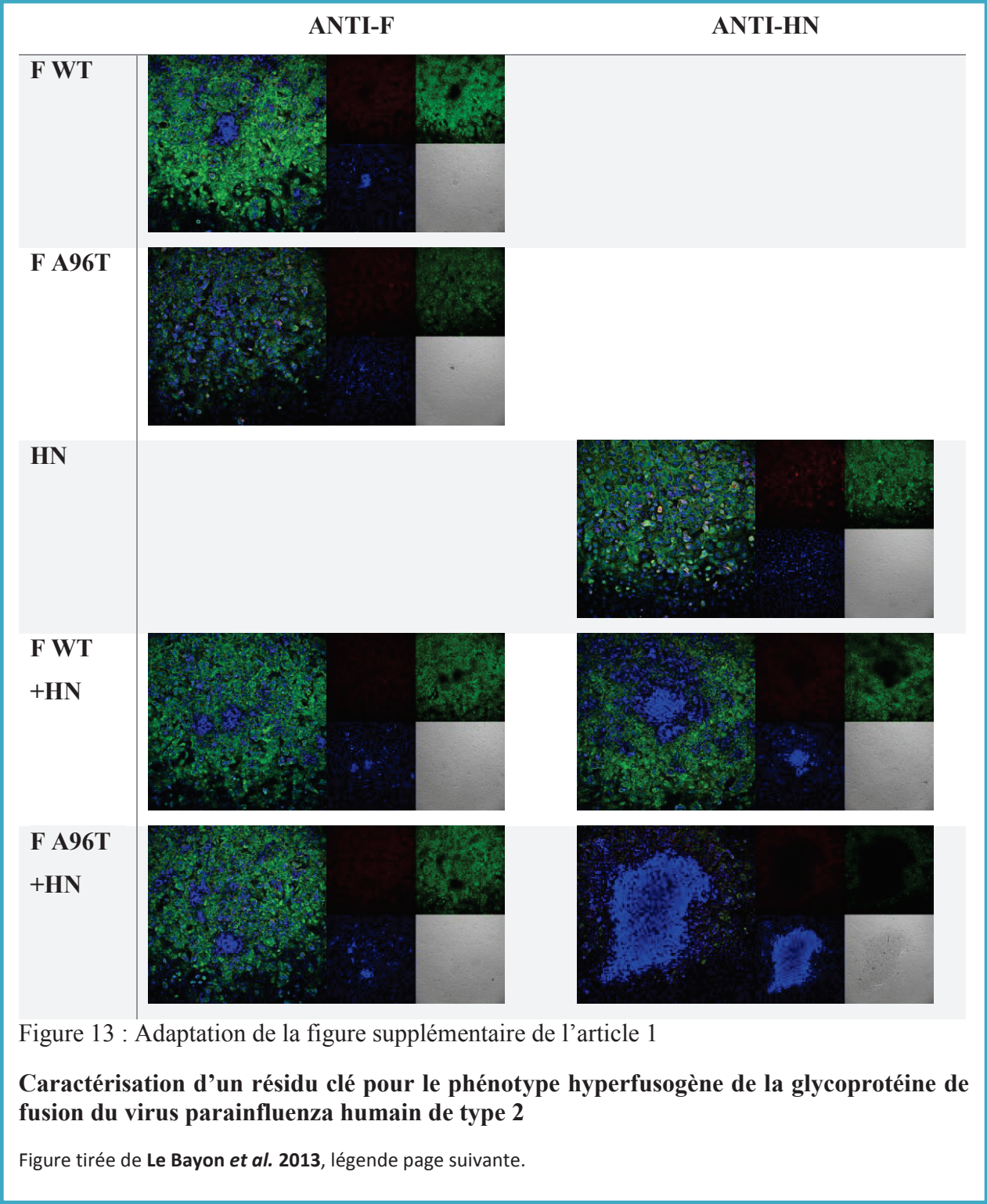
Acknowledgments The authors would like to thank all the members of the VirCell Team and all the staff at the Centre Commun de Quantimétrie (Université Claude Bernard Lyon 1). J.-C. L. B. was supported by a contrat doctoral from the Université Claude Bernard Lyon 1 and a CMIRA Explora'doc 2012 fellowship from Rhône-Alpes region. M. R. -C. was supported by a contract d'interface grant from the Hospices Civils de Lyon.

References

1. R.A. Lamb, G. Parks, Paramyxoviridae: the viruses and their replication, in *Fields Virology*, 5th edn., ed. by D.M. Knipe, P.M. Howley (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007), pp. 1449–1646
2. A. Moscona, Entry of parainfluenza virus into cells as a target for interrupting childhood respiratory disease. *J. Clin. Invest.* **115**, 1688–1698 (2005)
3. R. Karron, P. Collins, Parainfluenza viruses, in *Fields Virology*, ed. by B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley (Lippincott-Raven Press, New York, 2007), pp. 1497–1526
4. H. Schomacker, A. Schaap-Nutt, P.L. Collins, A.C. Schmidt, Pathogenesis of acute respiratory illness caused by human parainfluenza viruses. *Curr. Opin. Virol.* **2**, 294–299 (2012)
5. J.-C. Le Bayon, B. Lina, M. Rosa-Calatrava, G. Boivin, Recent developments with live-attenuated recombinant Paramyxovirus vaccines. *Rev. Med. Virol.* **23**, 15–34 (2013)
6. A. Chang, R.E. Dutch, Paramyxovirus fusion and entry: multiple paths to a common end. *Viruses* **4**, 613–636 (2012)
7. E.C. Smith, A. Popa, A. Chang, C. Masante, R.E. Dutch, Viral entry mechanisms: the increasing diversity of Paramyxovirus entry. *FEBS J.* **276**, 7217–7227 (2009)
8. T. Takimoto, G.L. Taylor, H.C. Connaris, S.J. Crennell, A. Portner, Role of the hemagglutinin-neuraminidase protein in the mechanism of Paramyxovirus-cell membrane fusion. *J. Virol.* **76**, 13028–13033 (2002)
9. S.A. Connolly, G.P. Leser, T.S. Jardetzky, R.A. Lamb, Bimolecular complementation of Paramyxovirus fusion and hemagglutinin-neuraminidase proteins enhances fusion: implications for the mechanism of fusion triggering. *J. Virol.* **83**, 10857–10868 (2009)
10. S. Bose, A. Zokarkar, B.D. Welch, G.P. Leser, T.S. Jardetzky, R.A. Lamb, Fusion activation by a headless parainfluenza virus 5 hemagglutinin-neuraminidase stalk suggests a modular mechanism for triggering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, E2625–E2634 (2012)
11. V.R. Melanson, R.M. Iorio, Addition of N-glycans in the stalk of the Newcastle disease virus HN protein blocks its interaction with the F protein and prevents fusion. *J. Virol.* **80**, 623–633 (2006)
12. M. Tsurudome, M. Ito, M. Nishio, M. Kawano, H. Komada, Y. Ito, Hemagglutinin-neuraminidase-independent fusion activity of simian virus 5 fusion (F) protein: difference in conformation between fusogenic and nonfusogenic F proteins on the cell surface. *J. Virol.* **75**, 8999–9009 (2001)
13. M. Tsurudome, M. Ito, M. Nishio, M. Kawano, K. Okamoto, S. Kusagawa et al., Identification of regions on the fusion protein of human parainfluenza virus type 2 which are required for hemagglutinin-neuraminidase proteins to promote cell fusion. *J. Gen. Virol.* **79**(Pt 2), 279–289 (1998)
14. A.E. Gardner, R.E. Dutch, A conserved region in the F(2) subunit of Paramyxovirus fusion proteins is involved in fusion regulation. *J. Virol.* **81**, 8303–8314 (2007)

15. O. Terrier, F. Durupt, G. Cartet, L. Thomas, B. Lina, M. Rosa-Calatrava, Engineering of a parainfluenza virus type 5 fusion protein (PIV-5 F): development of an autonomous and hyper-fusogenic protein by a combinational mutagenesis approach. *Virus Res.* **146**, 115–124 (2009)
16. C.J. Russell, L.E. Luque, The structural basis of Paramyxovirus invasion. *Trends Microbiol.* **14**, 243–246 (2006)
17. O. Terrier, G. Cartet, O. Ferraris, F. Morfin, D. Thouvenot, S.S. Hong et al., Characterization of naturally occurring parainfluenza virus type 2 (hPIV-2) variants. *J. Clin. Virol.* **43**, 86–92 (2008)
18. D. Lavillette, E.-I. Pécheur, P. Donot, J. Fresquet, J. Molle, R. Corbau et al., Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. *J. Virol.* **81**, 8752–8765 (2007)
19. B.D. Welch, Y. Liu, C.A. Kors, G.P. Leser, T.S. Jardetzky, R.A. Lamb, Structure of the cleavage-activated prefusion form of the parainfluenza virus 5 fusion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 16672–16677 (2012)

2.2.2 *Supplementary data*



Syncytia assay. A549 cells were transfected with plasmids encoding F (WT) and (A96T), as indicated. F (WT) and HN proteins were co-expressed, as a reference for cell-cell fusion. After 48 hours post-transfection, cells were fixed and immuno-stained with NG8F5 antibody (kind gift of Dr Olivier Ferraris, Lyon, France) (red), for anti-F, or with 12E12B8F3 antibody (Argene, France) for anti-HN. Nuclei were counterstained with DAPI (blue), and membranes by WGA (green). Cells were examined at 40X magnification by fluorescence and phase-contrast confocal microscopy. One single optical section image was acquired at the level of representative syncytia.

2.2.3 *Analyse des résultats*

Les résultats obtenus dans cette étude démontrent une forte augmentation des capacités fusogènes du mutant F A96T, en présence seulement de HN. Ceci suggère une plus forte dépendance de ce mutant à la glycoprotéine HN par rapport à la protéine F sauvage.

La contribution de la mutation A96T en faveur de la fusion a été observée dans un test de fusion intercellulaire, utilisant un gène rapporteur luciférase, et dans l'analyse de formation de syncytiums (Figure 1B et 1C de l'article ci-dessus). L'expression de la protéine F mutée dans des cellules de la lignée A549 conduit à la formation de syncytiums plus petits que ceux obtenus avec la protéine F *wt*. Lors de la co-expression avec la protéine HN, le résultat inverse est observé, avec de plus grandes structures cellulaires multi-nucléées (Figure 1C de l'article). Des résultats similaires ont été obtenus dans les cellules LLC-MK2, suggérant que les propriétés décrites ne sont pas dépendantes de la lignée cellulaire utilisée dans cette étude.

Ces résultats laissent penser que le résidu 96 de la sous-unité F₂ soit impliqué dans la relation fonctionnelle entre F et HN. Nous avons donc émis l'hypothèse que ce résidu spécifique joue un rôle dans cette interaction, et que toutes les modifications de ce résidu pourraient modifier cette dernière sur le modèle de la complémentation biomoléculaire (Connolly *et al.* 2009). Par ailleurs, un plus haut niveau d'expression de F A96T a été constaté à la surface des cellules transfectées, ce qui pourrait également favoriser les interactions fonctionnelles entre F et HN.

Parmi les paramyxovirus, une région conservée de la sous-unité F₂ (CBF2) a été rapportée comme impliquée dans le repliement de la protéine F et la régulation de la fusion. La modification par mutagenèse dirigée a révélé que la mutation des résidus en bordure de la région CBF2 altéraient l'activité de promotion de la fusion (Gardner *et al.* 2007). Or, l'alignement d'un panel de protéines F de paramyxovirus (figure 1D de l'article) montre que le résidu 96 de F hPIV-2 se trouve à proximité C-terminale directe de CBF2. L'acide aminé dans cette position pourrait donc être impliqué dans la régulation du mécanisme de fusion. Cette hypothèse devra être vérifiée au niveau de la particule virale, via l'utilisation d'une approche de génétique inverse par exemple. Elle pourrait ainsi constituer un outil intéressant pour explorer la relation entre la fusion et la virulence des virus parainfluenza humains.

2.3 Discussion et perspectives

Comme tous les virus possédant un génome ARN, le taux de mutations produites aléatoirement dans le génome des paramyxovirus est élevé. De plus, l'ARN polymérase de paramyxovirus (P) ne possède pas d'activité de correction (Kolakofsky *et al.* 2005). Cette particularité permet l'émergence rapide de variants cliniques et pourrait ainsi favoriser l'échappement viral à la réponse immunitaire des hôtes infectés. L'hétérogénéité des souches apparaîtrait donc par une pression de sélection (Domingo and Holland 1997).

Très peu de données sont disponibles sur la diversité génétique des virus Parainfluenza. Certains types de PIV peuvent constituer différents génotypes assez proches qui peuvent co-circuler, comme le virus parainfluenza de type 3 bovin (bPIV-3) (Horwood *et al.* 2008). Ils peuvent aussi constituer de véritables sous-types comme le virus parainfluenza humain de type 4 (hPIV-4 sous types a/b). L'article 1 se base notamment sur le travail du Dr Terrier qui a comparé les séquences des gènes F et HN hPIV-2 (Terrier *et al.* 2008) entre les souches isolées la même année (1997 ou 2001) révélant une quasi-identité. Ceci laisse à penser que la diversité génétique de souches hPIV-2 circulant à un instant t est relativement restreinte. La limite de cette étude est cependant que l'analyse soit restreinte à la protéine F.

Parmi les souches cliniques variantes de hPIV-2 étudiées, certaines présentaient des caractéristiques phénotypiques et antigéniques particulières avec notamment une augmentation du nombre de syncytiums observés après l'infection d'un tapis cellulaire *in vitro*. La protéine F de ces souches décrites comme hyperfusogènes présente une mutation A96T sur la sous-unité F₂ de la glycoprotéine. Cette mutation se retrouve à la bordure de la région CBF₂, qui est particulièrement conservée au sein des paramyxovirus. Cette dernière semble être impliquée dans le repliement de la protéine F, ainsi que dans la régulation de la fusion. Il est notamment rapporté que la mutation d'acides aminés dans cette région provoque une altération de l'activité fusogène de la protéine F (Gardner *et al.* 2007). Or, la mutation A96T se retrouve directement du côté C-terminal de cette séquence conservée et pourrait donc, lui aussi, être impliqué dans la déstabilisation de l'activité de ce domaine.

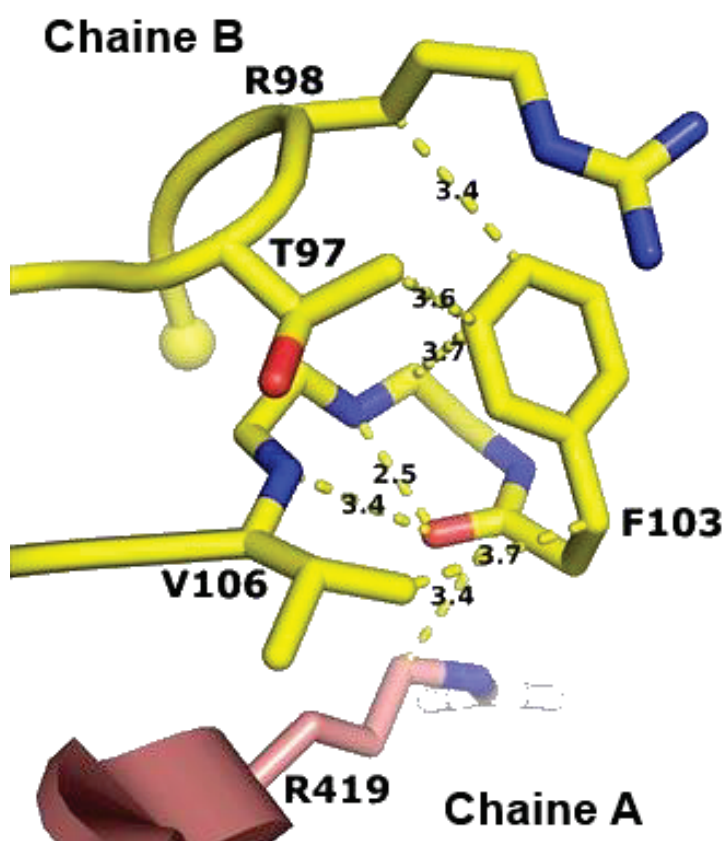


Figure 14 : Vue détaillée des interactions avec le résidu F103 de la chaîne B de F PIV-5.

Les interactions avec les domaines des chaînes adjacentes sont faibles, et le résidu interagit avec les acides aminés de la fin de la sous unité F₂ de la même chaîne, incluant T97 et R98. Les résidus F103 et T97 de F PIV-5 pourraient correspondre aux résidus F107 et A/T96 de F hPIV-2.

Figure adaptée de (Welch *et al.* 2012)

Une autre hypothèse, ou interprétation complémentaire, pourrait proposer un rôle de ce résidu dans la stabilité de la structure de la protéine F clivée, notamment de la zone d'interaction entre le peptide fusion (extrémité N-terminale de la sous-unité F₁ de la protéine) et la partie C-terminale de la sous-unité F₂. Une structure de F PIV-5 dans sa forme de pré-fusion clivée en deux sous-unités a été résolue récemment (Welch *et al.* 2012). Ces données structurales permettent de mettre en évidence ce type d'interaction. Ainsi, sur la chaîne B du trimère de F PIV-5, une interaction entre le résidu F103 avec la thréonine T97 est constatée (Figure 14).

Il n'a pas été possible d'obtenir une modélisation satisfaisante de la protéine F de hPIV2 (avec et sans la mutation A96T) dans sa forme clivée de pré-fusion, par analogie avec la

structure de F PIV-5 obtenue par Welch *et al.* (pdb : 4GAP), en utilisant les programmes SwissModel (Swiss Institute of Bioinformatics) et Geno3D (PBIL, Université de Lyon). Ces programmes modélisent notamment les sous-domaines protéiques, qu'il s'agisse de la sous-unité F₂ de la chaîne B (4GAP-B) ou de la sous-unité F₁ (4GAP-F). Ainsi, le résidu F103 de F PIV-5 correspondrait à F107 de F hPIV-2 en tant que premier acide-aminé de la séquence très conservée après le site du clivage et qui correspond au peptide fusion. La position de T97 de F PIV-5 à la bordure C-terminale de la région CBF₂ pourrait quant à elle correspondre au résidu A/T96 de F hPIV-2. Cependant, cette zone entre CBF₂ et l'extrémité C-terminale de la sous-unité étant très dissemblable entre les deux virus, il nous a été difficile de confirmer nos hypothèses avec un alignement de séquence et seule une résolution de structure de F hPIV-2 nous aurait permis de valider cette hypothèse.

Néanmoins, cette interaction suspectée entre le peptide fusion, et surtout entre la phénylalanine, qui est le seul résidu hydrophobe accessible après clivage, et la thréonine permet d'élaborer une nouvelle hypothèse. Cette thréonine supplémentaire pour F de hPIV-2, bloquerait encore plus efficacement le peptide de fusion, et il faudrait nécessairement l'activation induite par HN pour activer la fusion. Cette induction plus efficace par HN aurait un autre résultat potentiel : celui d'éviter l'activation trop précoce de F qui rendrait inefficace la glycoprotéine. Dans cette hypothèse, il serait observé une augmentation de la fusion par rapport au nombre de glycoprotéines F en surface, en présence seulement de HN, ce qui est rapporté dans notre étude.

Malgré tout, cette étude a permis de mettre en évidence le rôle de la sous-unité F₂ de la protéine F de hPIV-2, dans la promotion de la fusion. Les questions restent cependant nombreuses quant aux mécanismes et à l'implication de la GP d'attachement HN. En effet, nous avons rapporté que la fusion induite par F en présence de HN était significativement plus importante avec la mutation F A96T. Cependant, nous avons pu aussi mesurer une différence entre les activités de fusion autonomes de F, au détriment de la protéine mutée.

Bien que des études précédentes aient indiqué que les protéines F des virus parainfluenza exprimés seules ne permettaient pas la fusion membranaire (Hu *et al.* 1992, Heminway *et al.* 1994, Yao *et al.* 1997), nous avons pu observer une fusion intercellulaire induite par F, grâce à des conditions de tests favorisant cette observation. Il s'agit d'un temps d'incubation optimisé de 48H, au lieu de 16-20H, et l'utilisation du test rapporteur luciférase sous promoteur TAT-HIV-1. Ce dernier est plus sensible que les tests impliquant l'activation

d'un promoteur T7 par une surinfection avec vecteur de type vaccine, tels qu'utilisés dans les travaux antérieurs retrouvés dans la littérature.

Dans les présents travaux, nous avons constaté que la protéine F mutée A96T semblait être mieux exprimée à la surface des cellules transfectées. La fusion intercellulaire induite par celle-ci, en l'absence de HN, est cependant très faible en comparaison à celle observée avec la F sauvage. Ces résultats nous permettent donc de suspecter une implication de la protéine HN dans le phénotype de la protéine F mutée. Le manque de connaissance théorique sur l'activation par HN (voir introduction) et de données structurales ne permet que de spéculer sur les conséquences de cette mutation simple sur la protéine F. Deux hypothèses peuvent être envisagées : 1) cette mutation affecte l'interaction directe entre HN et la région mutée et/ou 2) cette mutation a un effet sur l'activité de fusion de la protéine F.

Dans la première hypothèse, une interaction pourrait se faire directement avec le résidu ou la région mutée. De plus, comme décrit ci-dessus et par analogie avec F PIV-5, cette zone de F₂ pourrait se retrouver en interaction avec le peptide de fusion dans la forme active de F (forme clivée pré-fusion). En absence d'activation par HN, cette interaction empêcherait la libération du peptide fusion. Le résidu thréonine ayant un encombrement stérique plus important que l'alanine, ce blocage serait encore plus efficace. Ceci qui conduit à observer une fusion induite par la protéine mutée plus faible que celle observée avec la protéine F sauvage. Après s'être attachée à son récepteur cellulaire, la protéine HN interagirait plus efficacement avec le résidu T96 et favoriserait l'induction de la fusion membranaire et donc *in fine* la fusion proprement dite.

Afin de confirmer la seconde partie de cette hypothèse, il conviendrait d'évaluer et de quantifier l'interaction entre cette région, mutée ou non, avec la protéine HN, notamment par l'utilisation d'approches par coimmunoprécipitations. L'autre méthode permettant d'observer une interaction entre le résidu 96 et le peptide fusion reste, dans l'idéal, une résolution de la structure clivée en pré-fusion de la GP F de hPIV-2, à l'image de ce qui a été fait pour PIV-5. Malheureusement, hPIV-2 n'est pas un modèle expérimental comme pourrait l'être PIV-5 ou SeV. Il n'a pas non plus l'importance clinique d'autres paramyxovirus tels que hRSV, hPIV-3, MeV ou HeV. Pour ces raisons la résolution d'une telle structure ne semble pas être rapidement disponible.

Dans la seconde hypothèse, la mutation provoquerait une meilleure activité fusogène intrinsèque à F. Ceci se ferait en favorisant le changement de conformation de F après le clivage.

De plus, HN éviterait l'activation trop précoce de F, tant qu'aucun récepteur de la cellule cible ne soit engagé (modèle « *spring loaded* » décrit dans l'introduction). Dans cette hypothèse notre résidu n'aurait pas de lien direct avec HN, mais favoriserait un changement de conformation de la protéine F pour sa forme de post-fusion. Ceci se ferait trop précocement pour permettre la fusion membranaire en absence de HN. L'utilisation d'anticorps spécifiques des formes de post-fusion, ciblant par exemple la structure 6HB, et de pré-fusion de F sauvage et mutée à la surface de cellules, permettrait d'évaluer la proportion de forme pré/post-fusion et de valider cette hypothèse. Il n'y a cependant aucun anticorps de ce type disponible commercialement.

En conclusion, nous avons identifié dans cette étude un résidu clé en position 96 de la sous-unité F₂ de la protéine F de hPIV-2, impliquée dans la fusion membranaire dépendante de HN. De plus, le résidu T96 a été identifié à partir d'une comparaison de souches cliniques de hPIV-2, présentant différents profils d'induction de la formation de syncytiums *in vitro* (Terrier *et al.* 2008). Bien que nous ne puissions pas exclure le rôle de mutations supplémentaires impliquées dans la fusion membranaire au sein de la protéine F de ces souches, ce travail permet de mettre en exergue l'intérêt de l'observation et du contrôle génétique des souches virales circulantes, afin de mieux comprendre la fusion membranaire induite par le virus.

3 Article 2 : Evaluation de mutations hyperfusogènes sur la protéine F de hMPV

3.1 Introduction

Cet article rapporte une étude dont le but était d'évaluer une combinaison de mutations, principalement dans les régions HR de la protéine F du métapneumovirus humain (hMPV), pouvant conférer un phénotype hyperfusogène à la protéine. Le hMPV est un paramyxovirus découvert en 2001 et impliqué dans des infections respiratoires touchant les jeunes enfants et les personnes âgées, capable de réinfecter un individu tout au long de sa vie (van den Hoogen *et al.* 2001, Falsey *et al.* 2003, Falsey 2008, Walsh *et al.* 2008).

L'entrée du virus dans la cellule hôte est permise par la protéine F. A l'inverse de la plupart des paramyxovirus, seule la glycoprotéine F de hMPV semble nécessaire pour l'attachement et le processus de fusion membranaire, sans nécessiter la co-expression de la protéine G (Cseke *et al.* 2009). Les structures de pré- et de post-fusion obtenues avec différents paramyxovirus, ont démontré que les interactions entre les HRA et HRB sont essentielles pour le repliement de la protéine F et la fusion membranaire (Russell *et al.* 2001, Yin *et al.* 2005, Swanson *et al.* 2010, Swanson *et al.* 2011). C'est principalement le cas des interactions entre les faces hydrophobes de ces domaines. L'inhibition de cette interaction est d'ailleurs possible grâce à des peptides dérivés de ces régions et qui agissent en tant qu'antagonistes (Miller *et al.* 2007, Deffrasnes *et al.* 2008).

Nous avons muté certains acides aminés des faces internes des domaines HR de la protéine F de hMPV, souche CAN98-75, par des résidus hydrophobes, avec la même stratégie développée par Terrier *et al.* sur F PIV5 (Terrier *et al.* 2009). Différentes combinaisons des mutations T144V dans le domaine HRA et des mutations S470V et S477V dans le domaine HRB de la protéine F, nous ont permis d'obtenir des phénotypes hyperfusogènes lorsque les protéines F étaient exprimées transitoirement dans des cellules *in vitro*. Malgré la validation de notre stratégie d'ingénierie, nous n'avons pas été capables de générer un virus recombinant hMPV viable, porteur de la combinaison des trois mutations. D'autres virus recombinants, porteurs d'autres combinaisons de mutations hyperfusogènes, sont en cours de production par génétique inverse.

Cet article est en préparation pour être soumis dans un journal international à comité de lecture en langue anglaise.

3.2 Article en préparation

3.2.1 *Hydrophobic mutations in Heptad-Repeat domains of the human metapneumovirus F glycoprotein improve its hyperfusogenic activity*

Jean-Christophe Le Bayon^{1,2*}, Laetitia Aerts², Olivier Terrier¹, France Feuillet^{1,2}, Guy Boivin² and Manuel Rosa-Calatrava^{1*}

1. Laboratoire de Virologie et Pathologie Humaine, VirPath EA4610/Equipe VirCell, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1 – Hospices Civils de Lyon, Faculté de médecine RTH Laennec, rue Guillaume Paradin, 69008, Lyon, France
2. Research Center in Infectious Diseases, CHUQ-CHUL and Université Laval, Québec City, QC, Canada

Running title: Enhancement of the hMPV F protein fusion activity

Keywords: paramyxovirus; human metapneumovirus, class-I fusion protein, heptad-repeat domain

Word count:

Summary word count:

* Co-senior and corresponding authors:

M. Rosa-Calatrava, Virpath EA4610/équipe VirCell, Faculté de médecine RTH Laennec, Bat B 2ème étage, 9-11 rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon CEDEX 08. E-mail: manuel.rosa-calatrava@univ-lyon1.fr

Guy Boivin, Infectious Diseases Research Center of the CHU of Québec, and Laval University, Quebec City, Quebec, Canada G1V 4G2. E-mail : Guy.Boivin@crchul.ulaval.ca

3.2.2 *Summary*

Human metapneumovirus (hMPV) is a broadly spread respiratory virus, involved in some severe upper and lower respiratory tract disease in young children and elderly. The fusion protein (F) is the key tool of the hMPV to infect a cell. This protein, as all class I fusion protein, is able to lead the virus-cell membrane fusion and is highly suspected to be the major attachment protein.

We designed and evaluated several mutations in the heptad-repeat domains (HR) of the F protein, a key domain involved in the fusion. One of our mutants, displaying the three mutations T144V, S470V and S477V, showed an enhanced fusion activity in quantitative cell-cell fusion assays despite a relative low cell surface expression while transfected in LLC-MK2. The mutation K166E showed a very low fusogenic profile suggesting that the charge of this amino-acid on the side chain of HRA might be determinant.

3.2.3 *Introduction*

The human metapneumovirus (hMPV) is a member of the large viral family *Paramyxoviridae*. This virus was initially isolated in the Netherlands in 2001, although it was retrospectively found in nasal washes as early as the 50s (van den Hoogen *et al.* 2001). This broadly spread virus cause severe upper and lower respiratory tract infections especially for children and the elderly, with the ability to reinfect throughout life (Falsey *et al.* 2003, Falsey 2008, Walsh *et al.* 2008). Despite its significant importance in public health, no convincing therapeutic or prophylactic treatment are available (Le Bayon *et al.* 2013).

Among Paramyxoviruses, viral entry into host cell is usually led by the synergic action of the attachment protein, called HN, H or G, and the fusion protein (F). Unlike most of the *Paramyxoviridae* hMPV F glycoprotein is involved in both cell attachment and fusion processes (Cseke *et al.* 2009). Furthermore some strains of hMPV F protein can request a low-pH for its activation. Similarly to other class I viral proteins (Yin *et al.* 2006), the hMPV F glycoprotein is synthesized as a precursor (F₀) that must be proteolytically cleaved at polybasic consensus site, to generate a disulfide-linked F₁/F₂ polypeptidic biological active form . Upon activation F undergoes a series of conformational changes causing the two lipid bilayers to closely merge (Yin *et al.* 2006). Pre and post-fusion crystalized structures, obtained with different Paramyxovirus as PIV-5 showed that the interactions between two domains (HRA and HRB) were essential for the F fusion activity. The prevention of this interaction inhibits the fusion and peptides derived from HRA or HRB sequences were designed as potent inhibitors of the hMPV infection (Miller *et al.* 2007, Deffrasnes *et al.* 2008). The mutation K166E showed a very low fusogenic profile. This residue is located on the side chain of HRA, and the change of properties (to an acidic residue) might destabilize the structure of F protein.

We previously engineered the F protein of another paramyxovirus, parainfluenza virus type 5 (PIV-5) and we found that replacing some HRA and HRB residues by hydrophobic amino acids can drastically increase cell-cell fusion when associated with some mutation to make the PIV-5 F independent of the attachment protein HN for its activation (Terrier *et al.* 2009).

These mutations were transposed in hMPV F glycoprotein of CAN98-75 strain. The mutations T144V in the HRA domain and S470V and S477V in the HRB domain of the F protein increased the fusion activity *in vitro*, while combined together.

The F conformational change is described as irreversible and permanent, and we wanted to investigate if the combination of mutation was involved in premature activation of the F protein, which may result on the lack of infectiosity of the virus particle.

3.2.4 *Material & Methods*

3.2.4.1 *Cell lines, virus strains and plasmids*

The monkey kidney LLC-MK2 (ATCC: CCL-7) cell line was used for viral propagation and transient expression experiments and virus propagation. The human hepatoma HuH7-Tat cell line (kindly provided by Dimitri Lavillette, Lyon, France) was used in quantitative fusion assay (Lavillette *et al.* 2007). Hamster kidney BSR-T7/5 cell line was used for generation of hMPV by reverse genetics.

Cell culture was performed with MEM medium completed by 10% fetal bovine serum (FBS) and 50 units.mL⁻¹ penicillin / 50µg.mL⁻¹ streptomycin (Gibco®, Life technologies™).

The virus strain CAN98-75 (group B) (Biacchesi *et al.* 2003) and C-85473 (group A) (Hamelin *et al.* 2005).

The virus strain CAN98-75 was used as template for the reverse genetics system (figure 1 A) and cloned into pSP72 plasmid (Promega) under T7 promoter. The *GFP* gene from pEGFP-N1 was inserted in the first position in the genome.

The genes L, N, P and M2.1 were cloned separately into pTNT plasmids.

3.2.4.2 *hMPV F gene extraction, cloning and site-directed mutagenesis*

The hMPV was propagated, amplified and purified as described before. RNA was extracted with QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) in accordance with the manufacturer's instructions, with elution in a final volume of 40 µL. Complementary DNA was synthesized by use of 10 µL of RNA eluate, random hexamer primers (Amersham Pharmacia Biotech), and an Omniscript RT Kit (Qiagen), used in accordance with the manufacturer's instructions. PCR amplification of all the gene was performed with specific primers.

Mutations in pcDNA3.1 plasmid encoding the PIV5 F protein were generated by PCR following the protocol of the QuickChange Site-Directed Mutagenesis system (Stratagene) but using Pfu Turbo (Agilent). PCR was performed using a series of complementary primers (IDT DNA).

Mutations in the reverse genetics system were performed the same way on a fragment of the antigenomic plasmid production, extracted using DraIII and AflII enzymes (NEB). This fragment included the entire ORF of F and M2 and was cloned into pSP72 plasmid and was mutated by site-directed mutagenesis, following the QuickChange Site-Directed Mutagenesis

System with PfuTurbo (Agilent Technologies) and complementary mutagenesis primers (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA). A region including *F* was amplified by PCR and the purified product was directly used as a mutagenesis primer on the antigenome.

3.2.4.3 *Syncytia assay*

LLC-MK2 in twelve-well tissue culture dish were transfected with Lipofectamine LTX with PLUS reagent (Life Technologies™) according to the manufacturer's instruction. Each well were transfected. with 1µg of F in pcDNA3.1(+) plasmid, peGFP-N1 (Clontech) or empty pcDNA3.1(+) plasmid (Life Technologies™). Cells were washed 12 hours post transfection (hpt) and incubated in OptiMEM with 1µg.mL⁻¹ trypsin (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) until 96 hpt. Cell layer was fixed by formalin and the nucleus dyed with DAPI 1/2000. The aggregates of 3 and more nucleus were enumerated in each well using a Nikon Eclipse TE300 inverted microscope with 10X lense and 340-380nm excitation. Pictures were captured with a Coolsnap fx CCD camera (Roper Scientific).

3.2.4.4 *Quantitative Fusion assay*

Luciferase assay was performed by transfecting LLC-MK2 confluent layer in six-well tissue culture dish with Lipofectamine LTX with PLUS reagent (Life Technologies™) according to the manufacturer's instruction. Each well were transfected. with 2µg of F in pcDNA3.1(+) plasmid, peGFP-N1 (Clontech) or empty pcDNA3.1(+) plasmid (Life Technologies™) and 150ng of HIV-1 long terminal repeat (LTR) – luciferase reporter. For each well, cells were washed and scraped 12 hours post transfection (hpt) in 1mL culture medium and reseed in two wells of 24-well tissue culture dish with 3.10⁵ HuH7-TAT cells per well. Cells were washed and incubated in 2mL OptiMEM with 1µg.mL⁻¹ trypsin (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) 36 hpt. Cells were lysed and the luciferase activity was measured at 64, 72 or 96 hpt using the luciferase assay system protocol from Promega with a Wallac 1420 Victor²™ plate reader (Perkin Elmer).

3.2.4.5 *Flow cytometry*

Multiwell-6 cultures dishes (cm) of LLC-MK2 cells transfected with plasmid encoding F proteins as reported for the syncytia assay. Trypsin (µg.µL⁻¹) was added after 40 hours and the cells were detached with 200µL of EDTA 5mM. Cells were suspended in 1mL PBS + BSA 1% then transferred in a 4mL polystyrene tube (BD 2058), incubated 1H then washed. Mab anti F hMPV F453 (MedImmune) was added to the cells (1:500 in PBS + BSA 1%) and incubated

1H. Cell pellets were washed and incubated with Alexa 488-conjugated goat anti-hamster IgG (Invitrogen) at 1/1000 for 30min at RT. Finally the pellets were washed and suspended in 300µL PBS.

The cells were washed between each step by performing a centrifugation at 1200 rpm with 900µL PBS + BSA 1%, remove the supernatant and incubate 30' at RT in 900µL + BSA 1%, except for the final wash with 900µL PBS + 2mM EDTA.

Fluorescence intensity of 10,000 cells was measured by a FACS Canto flow cytometer (BD) and was expressed as a relative surface expression (RSE) index.

3.2.4.6 *Recovery of recombinant virus*

Confluent BSR T7/5 cells (Habjan *et al.* 2008) in six-well dishes were transfected with 7 µg of antigenomic plasmid corresponding to hMPV CAN98-75 wild-type with GFP in first position in the genome (hMPV-98GFP), the same recombinant hMPV but with F including mutations. Lipofectamine 2000 (Life Technologies™) was used as transfection reagent, according to manufacturer's instructions. After overnight incubation at 37°C, transfection medium was removed and replaced by OptiMEM supplemented with NEAA. Trypsin was added 3 days post-transfection to a final concentration of 1 µg/ml, then cells were scraped and plated with their current culture medium onto a confluent LLC-MK2 layer. GFP fluorescence was monitored and usually observed around day 5–6 post-infection (p.i.).

LLC-MK2 cells and saved as stock viral preparations.

3.2.5 Results

3.2.5.1 Mutation design

The previous work made on PIV-5 F (Terrier *et al.* 2009), showed that the fusion activity of the F protein could be increase with the single or combined mutation of some amino-acids in the *a* and *d* position of the helical wheel representation (figure 1 B and C). The hypothesis was that mutations of these residues into hydrophobic amino acids would reinforce the hydrophobicity of the corresponding face of the wheels thereby potentially increasing the coiled-coil interactions between HR-A and HR-B domains in the post-fusion state of PIV-5 F. This increased strength of the interaction might enhance the fusion activity of the F protein. We tried to investigate if this observation can be done on a non-close-related paramyxovirus: the human metapneumovirus (hMPV), which belong to another gender.

The LearnCoil-VMF software (Singh *et al.* 1999) was used to predict the HR region on hMPV type B CAN98-75 strain fusion glycoprotein (F) sequence (Genbank accession number: AY145289.1) and also the relative position of amino-acids on the helix (figure 1c). The study of the coiled-coil domains of HRA and HRB revealed that non-hydrophobic residues (threonines in positions 144 and serine in position 470 and 477) occupy the “*a*” and “*d*” positions of their helical wheel representation. The mutations T144V, S470V and S477V were introduced into the F protein (figure 1B), either separately or in combination (single, double and triple mutants).

Another mutation, K166E, on the *e* position of HRA was inserted. The *e* and *g* positions are thought to stabilize the coiled-coiled structure by ionic interaction and the change of charge between a lysine and a glutamate could drastically change this interaction. Furthermore the residue E166 can be found in the hMPV type A C-85473 strain F protein (Hamelin *et al.* 2006). This latter strain can induced big syncytia on a LLC-MK2 layer, which is thought to be led by the hyperfusogenic activity of its F.

3.2.5.2 Syncytium assays

As for many paramyxoviruses, syncytium formation has been shown to occur in a non-viral context upon transient expression of recombinant hMPV F protein (Schowalter *et al.* 2006). In order to evaluate the F fusogenitcity, we first analyzed the effect of the mutations or combinations of mutations on F while transient expression of the protein in LLC-MK2 cells. We transfected cells in 12-wells culture dishes with equal quantities of each recombinant F expression plasmid and monitored syncytia formation (figure 2 A). After nucleus coloration,

we reported the number of nucleus aggregates that is thought to reflect the number of F induced syncytia (figure 2 B).

We found that the transfection of LLC-MK2 with the F of hMPV CAN98-75 WT plasmid induced significantly the formation of syncytia, with a mean of 154.3 nucleus aggregates per well, $\pm$ 5.8 (standard error of mean, SEM) compared to cells transfected with the pEGFP-N1 plasmid ($p < 0.05$) or non-transfected ($p < 0.001$). All the confidence levels were calculated with a one-way ANOVA, with a Dunnett test onto the WT value, and the experiment was repeated 4 times. Among the mutants, the K166E F was the one with the fewer ability to induce syncytia with a mean of only 101 $\pm$ 3.1 nucleus aggregates per well, to compare to the 93 $\pm$ 4 induced by the transfection with GFP, but not significantly. This level should be consider as the background noise. It could be due to an artifactual observation of nucleus aggregates which might be formed by the nucleus of 3 or more confluent cells. The single mutations T144V, S470V and the combined T144V and S477V (144-477) were not reported as significantly different of WT F either. Four mutants were reported as highly able to induce syncytia, with $p < 0.0001$, the F proteins harboring the S477V mutation; T144V and S470V (144-470); S470V and S477V (470-477); or T144v, S470V and S477V (144-470-477) mutations with means of 367 $\pm$ 26.6, 257 $\pm$ 26, 258.8 $\pm$ 15.48 and 295.5 $\pm$ 8.9 nucleus aggregates, respectively. Based on this assay, only the mutations modifying the hydrophobicity on the HRB helix were able to significantly increase the fusion activity of the F protein. However this syncytia assay suffer limitation. Only the number of syncytia, via the nucleus aggregates, were count and as it was impossible to count accurately the number of nucleus per syncytia, the number of individual cells forming the syncytium is unknown. In the case of a recombinant F protein able to induce large syncytia, with a large amount of cells per syncytium, only one syncytium in counted, as a less fusogenic F would formed more of smaller syncytia.

3.2.5.3 *Quantitative cell-cell fusion assay.*

We further investigated mutants containing HR mutations using a quantitative cell-cell fusion assay, with LLC-MK2 “donor” expressing luciferase and HuH7-Tat “indicator” cells system, as described before (Terrier *et al.* 2009). This system has the advantage of being able to reflect more precisely the number of cells involved in the syncytia. Donor cells were transfected with equal quantities of plasmids encoding hMPV F wt or mutated proteins. Results were collected 64hpt and expressed as a percentage of luciferase activity observed for F wt expression alone, and normalized with the negative control (non-transfected cells) as bottom line (Figure 3A). Cells transfected with eGFP-N1 plasmid and the pLuc-LTR can be considered

as the background level of fusion and represented only a small relative fraction of F wt fusion activity (19% +/- 1% , figure 3A). K166E mutant showed a fusion activity at this similar background level (18% +/- 1%). This observation is coherent with the one made with the syncytia assay, and demonstrate that the change of the positive charge lysine amino-acid by a negative charge glutamate residue reduce drastically the fusion activity of F. This result is highlighting the importance of the ionic interaction between the side chains of HRA and HRB (in positions *e*, *g*, *e'* or *g'*, figure 1 C). The mutated residue E166, located in *e* position on HRA, is in presence of another E residue in *e'* position on HRB and the presence of this two negative charge amino-acid may interfere with the correct folding of the F protein. F S470V and F T144V mutants had a fusion activity of 42% +/-3% and 112% +/- 13%. These results are similar to those observed in syncytia assay. The T144V mutation alone do not seem to have any effect on the fusion activity of F.as contrary as S470V might downregulate the fusion activity, but at non-significant levels.

Other F mutants displayed an increase fusion activity, from more than 237% +/-37% of WT for S477V to 290% +/-12% for the triple mutant 144-470-477. As for the previous assay, we concluded that mutations in HRB were more likely to increase the fusion activity of F in the context of cell-cell fusion. The triple mutant 144-470-477 had the highest upregulating rate at 290% +/-12%, and was the most significant value (one-way ANOVA test, $p < 0.001$). This data suggest that the hypothesis that an increased hydrophobicity of residues in *a* and *c* position of the helix

The precedent results were obtained after an incubation of 64hpt, other experiments were performed at 72 and 96hpt and showed a lot of variability. We choose to display the repartition of means, for each mutants, in the concatenate 7 experiments (two experiment of each, but three for 64 hpt) into an interleaved box, with Tukey plot (figure 3 B). Results are more contrasted, but the fusion negative GFP showed an upper quartile lower to 50% fusion activity of F. Most of mutants had really variable relative means. Only 144-470-477 had a lower quartile repartition upper than the wt value and we choose to evaluate this mutant in a viral context.

3.2.6 Discussion

The aim of this study was to evaluate the possibility of combining fusion activity-related mutations with novel substitutions within the heptad-repeat domains A and B, with the final goal of generating an efficient hyperfusogenic hMPV F protein.

The mutation K166E showed a very low fusogenic profile suggesting that the charge of this amino-acid on the position e on the side chain of HRA might be determinant. However the residue E166 is found for the strain C-8583 who was described as able to create big syncytia in cell culture. No other change can be seen between these two strains in the e position of HRA nor in the HRB e' counterpart position. The residue by itself cannot explain this absence of fusogenicity, but might be involved in a mechanism implicating other residues.

A recombinant hMPV virus carrying these mutations was created in order to find: 1) a better replication of the virus *in vitro* and *in vivo*. These evidences would make the direct link between the activity of hMPV F protein and the infectiosity of the virus. 2) Or the virus would be unable to replicate efficiently in BALB/c mice lungs. These results might show that the increasing of HRA and HRB affinity caused a premature activation of the F protein and resulted in an attenuated virus.

We were able to produce the virus in cell culture with reverse genetics culture, but we were not able to make it grow on LLC-MK2. In fact we noticed that the viral markers (M gene by rPCR and N protein by immunostaining) slowly disappeared, suggesting that the virus was not able to replicate efficiently. This might be the cause of the destabilisation of the F protein leading to an early folding of the F protein to its post-fusion conformation. These “hyperfusogenic” mutations might be used in the design of attenuated recombinant vaccines.

3.2.6.1 Perspectives of this work.

Mutations in the heptad repeat domain of the hMPV F protein are useful molecular tool to unravel the molecular mechanism behind viral-mediated membrane fusion. But as for other fusion protein, the deep mechanism of fusion has shadow zones. Furthermore there are actually no structure of the prefusion form of the hMPV F, and most of recent work on it were based on *in silico* analysis based on the PIV-5 F structure. Resolve this structure would help to better understand the specificities of the hMPV F protein, and especially will be a prerequisite to understand to mechanism of activation of the F. Although PIV-5, and other paramyxoviruses, need the second surface protein, in order to be able to induce fusion, hMPV F protein is independent of SH and G proteins.

3.2.7 *Acknowledgments*

The authors would like to thank all members of the VirPath Lab of Université de Lyon in Lyon and the Infectious Disease Research center of the CHUL in Québec, for their support. Jean-Christophe Le Bayon held a CMIRA Explora'doc 2012 fellowship from Région Rhône-Alpes.

3.2.8 *Figures*

Mutants	transposed from C-85473	Mutations		
		Located in HRA	Located in HRB	
	K166E	T144V	S470V	S477V
WT				
K166E	+			
T144V		+		
S470V			+	
S477V				+
144-470		+	+	
144-477		+		+
470-477			+	+
144-470-477		+	+	+

Table 1: List of combinations of mutations analyzed in this study

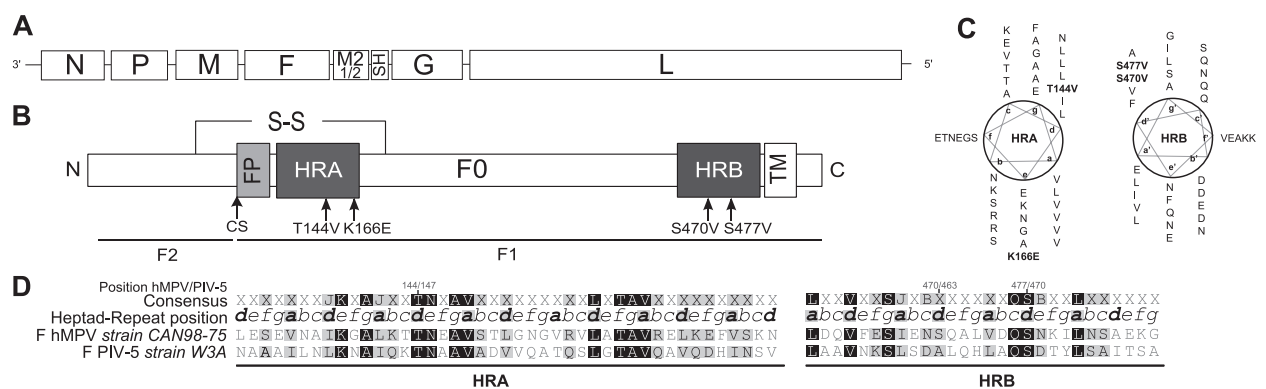


Figure 1: General view of F hMPV protein features

A. Genomic composition of hMPV

B. F protein major domains and mutations

C. HRA is composed by amino acids from position L130 (d) to N172 (d); HRB is composed by amino acids from position E453 (a) to G487 (g).

D. The alignment was performed using Geneious 6 software with. HRB was slightly shortened in order to correspond to the alignment of both protein (cf. supplementary data, figure 2)

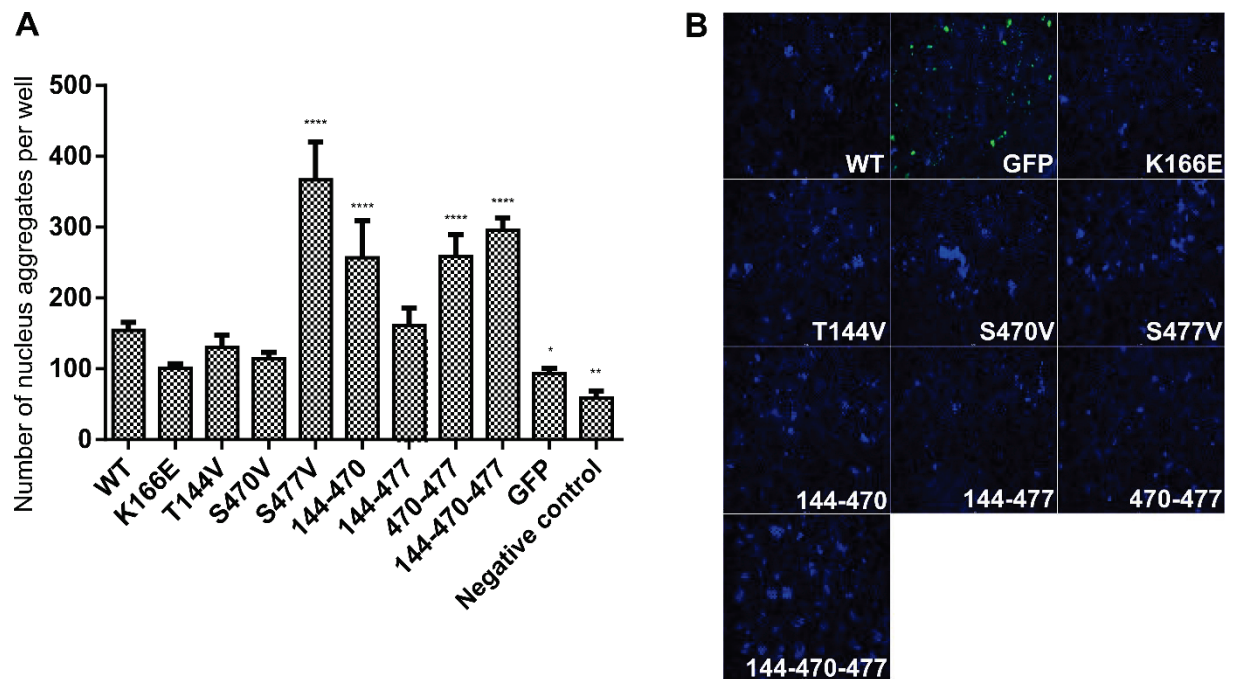


Figure 2: Simple syncytia counting.

Cells were transfected with pcDNA3.1(+) plasmid expressing the F protein in a 48 well dish . Cells were fixed after 36H with formaline 2% and dyed with DAPI. Nucleus aggregates were observed at 10X magnification. A. Average number of nucleus aggregates per well. B. Example of observation.

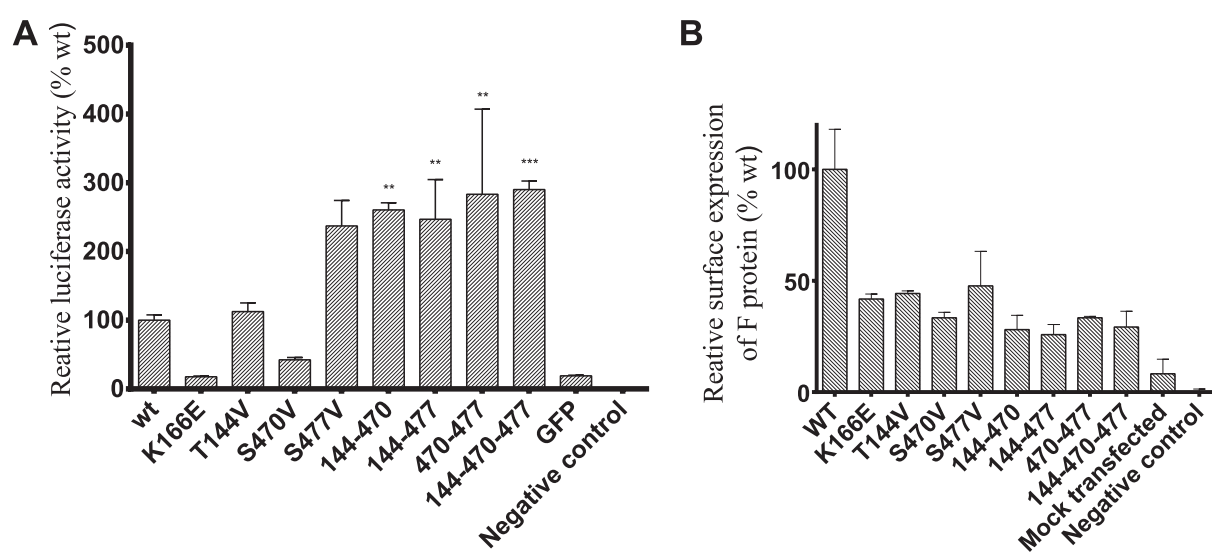


Figure 3: Fusogenicity and expression of the F proteins.

A. Cell-cell luciferase fusion assay

B. Flow cytometry with MedImmune Antibody

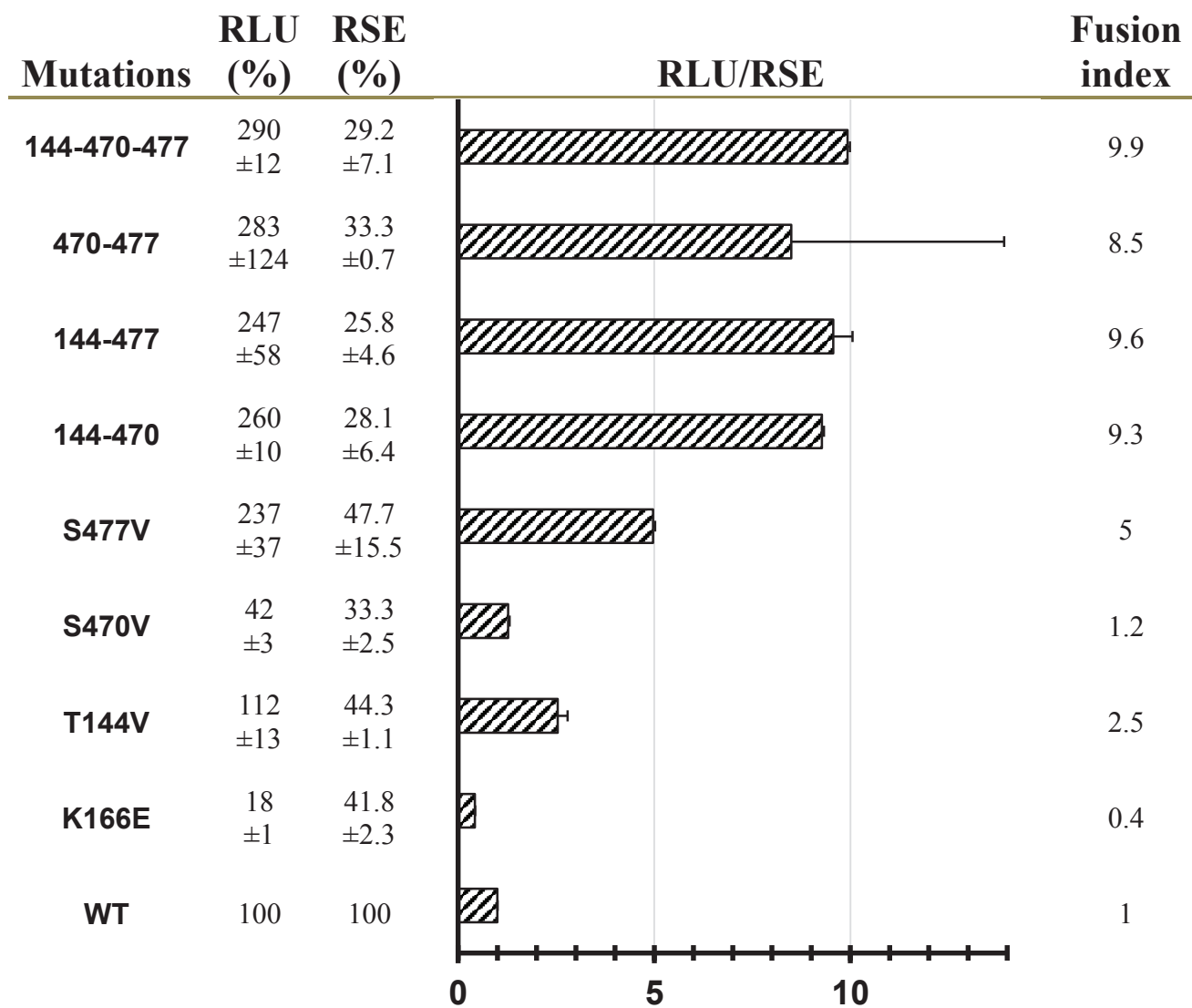
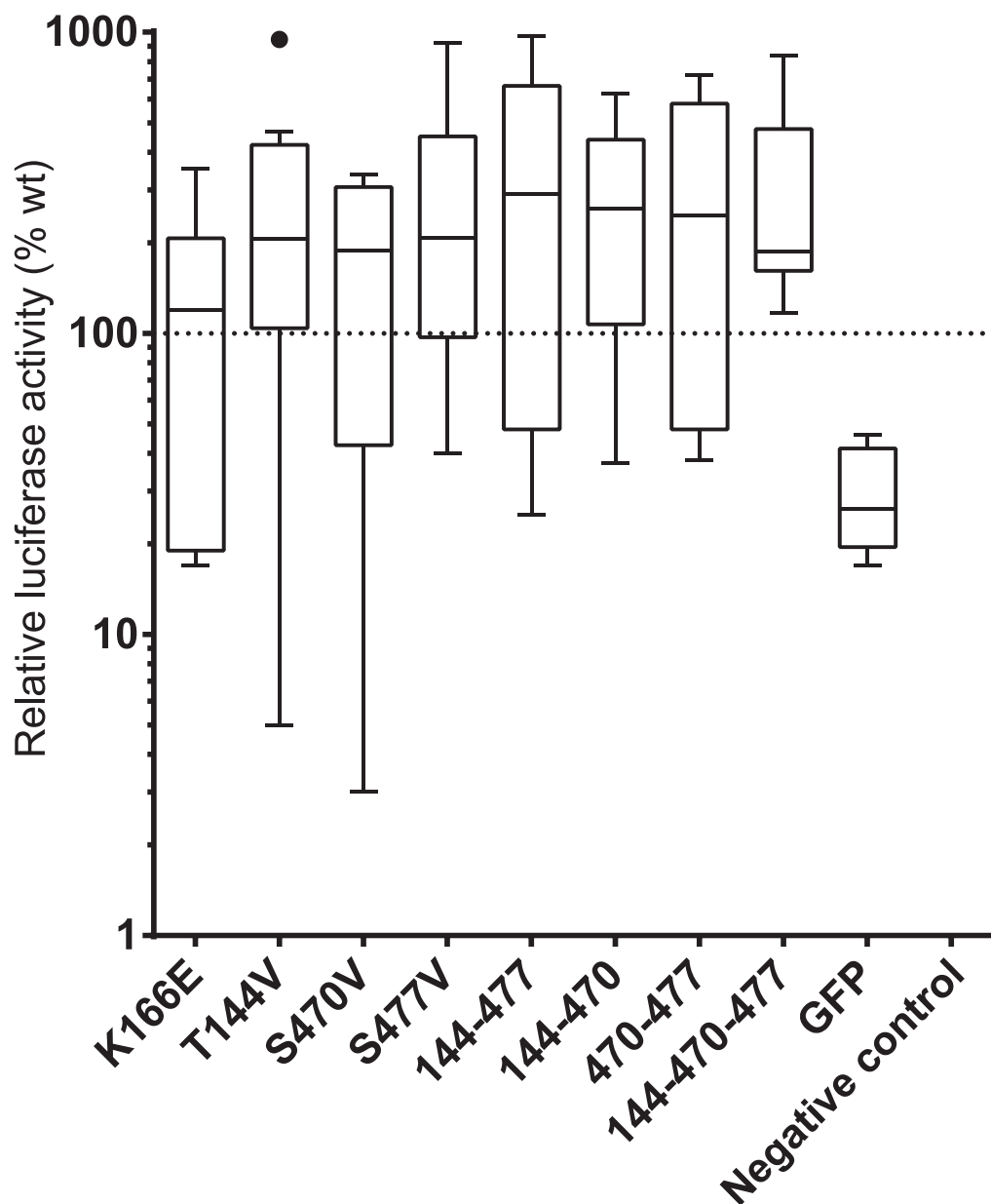


Figure 4: Fusion Index

3.2.9 *Supplementary data*

Supplementary figure 1:

Repartition of different mean measures of relative luciferase activity induced by some mutated F protein, expressed in LLC-MK2 cell line. The relative luciferase activity is a percentage of the luciferase activity induced by the expression of F WT, after transfection of cells by a mutated F gene in pcDNA3.1+ and 96H incubation



3.3 Discussion et perspectives

Les régions « *heptad-repeat* » (HR) sont des régions clés pour le repliement de la protéine F lors de la fusion membranaire. A ce titre, c'est une région de choix pour l'ingénierie de protéines F ou de virus recombinants, afin de les optimiser dans un objectif prophylactique ou thérapeutique.

Par exemple, l'optimisation des hélices '*coiled-coil*', au niveau des domaines HR impliqués fonctionnellement dans la forme de post-fusion de F de PIV-5, a déjà été réalisée au sein du laboratoire VirPath (Terrier *et al.* 2009). Le remplacement de résidus non hydrophobes des positions a, a', d et d' des régions HR de F PIV-5 par des valines a permis d'observer un accroissement des propriétés fusogènes de la protéine. Cependant, pour acquérir ce phénotype, ces mutations devaient être associées à certaines autres, dites « d'indépendance » vis-à-vis de l'activation par HN ou de « pré-fusion ».

La protéine F de hMPV a la particularité d'être indépendante de sa glycoprotéine d'attachement. Bien que les protéines F de certaines souches de hMPV requièrent un pH acide, la souche CAN98-75 étudiée peut induire une fusion inter membranaire de manière indépendante du pH. Cette particularité permet ainsi d'étudier l'influence des mutations dans les domaines HR de F, sans prendre en compte l'influence des facteurs extérieurs, tels que l'interaction avec la protéine d'attachement et le pH.

Dans cette étude, nous avons observé qu'une combinaison de mutations dans les régions HRA et HRB permettait d'observer une très forte augmentation de la fusion intercellulaire induite par la protéine F de hMPV, lorsque celle-ci est exprimée à la surface de cellules de la lignée LLC-MK2. Cette augmentation de la fusion induite est particulièrement observée avec les protéines F comportant la mutation S477V dans le domaine HRB, en combinaison ou non avec d'autres mutations.

Ainsi, comme dans le cas de PIV5, l'accroissement des interactions hydrophobes entre les régions HR de F hMPV permettrait donc une augmentation directe et intrinsèque de l'activité fusogène de F dans des conditions d'expression transitoire à la surface des cellules. Cependant, il est étonnant de ne pas retrouver ces mutations simples de F dans les souches sauvages circulantes dans la population, malgré l'augmentation significative de fusion qu'elles confèrent.

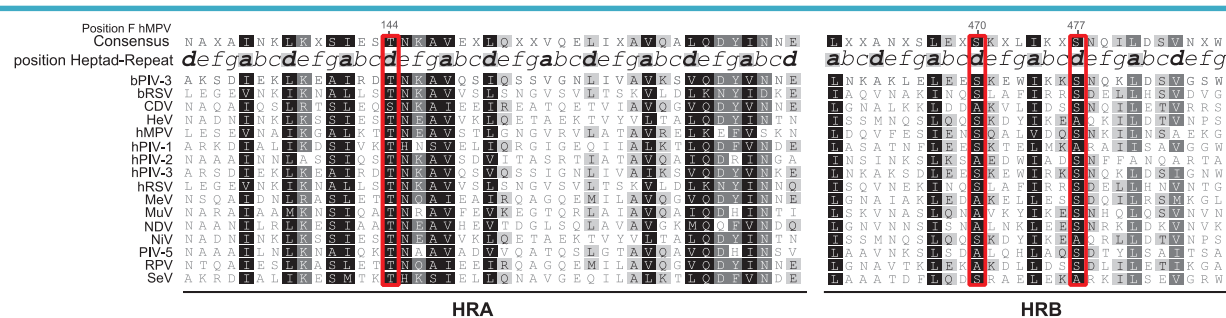


Figure 15 : Alignement des régions HR de F de virus représentatifs des paramyxovirus

Alignement des régions HR de la séquence de la protéine F des virus bPIV-3, bRSV, CDV, HeV, hMPV, hPIV-1 à 3, hRSV, MeV, MuV, NDV, NiV, PIV-5, de la peste bovine (RPV) et SeV à partir des génomes viraux de référence récupérés sur Genbank (NCBI) grâce au logiciel Geneious. Encadré, le résidu correspondant à T144 de hMPV sur HRA est très conservé parmi les paramyxovirus, ainsi que ceux correspondant à S470 et S477 (S ou A).

En effet, un alignement des régions HR sur un échantillon représentatif des paramyxovirus (Figure 15) connus permet de mettre en évidence que les résidus mutés dans notre étude (T144, S470 et S477) ne sont jamais des résidus hydrophobes dans les positions correspondantes pour les protéines F de ces virus. De plus, il apparaît que le résidu thréonine correspondant à T144 de F hMPV (en position **d** sur HRA) est particulièrement conservé. Dans la région HRB, les résidus sérine correspondant à S470 et S477 (en position **d'**) sont eux aussi particulièrement conservés ou alors remplacés par un résidu alanine. L'augmentation de l'interaction entre les faces hydrophobes des régions HR pourrait donc être préjudiciable à l'activité de fusion dans le contexte de l'infection virale. Celle-ci favorise tout de même la fusion cellulaire en condition d'expression transitoire de la GP F.

Dans ce contexte, nous avons initié la construction de virus comportant ces mutations, afin d'évaluer notre hypothèse de travail. Nous avons construit un génome recombinant de la souche hMPV CAN98-75, comportant différentes combinaisons des mutations F T144V, S470V et S477V dans les domaines HRA et HRB, ainsi que le gène *GFP* en première position du génome viral (hMPV F-HR-GFP). Ceci a permis afin de générer le virus mutant hMPV F-HR-GFP par génétique inverse. Après la première étape (P0) de génération du virus par transfection des plasmides anti-génomiques et satellites (cf. Matériel et méthodes), il est apparu que les virus ayant plusieurs mutations dans les domaines HR étaient incapables de se répliquer efficacement. La réplication déficiente a été observée lors des étapes d'amplification des particules infectieuses successives (P1 à P3), jusqu'à une perte totale de l'expression des

protéines virales et GFP mesurable (Figure 16). Ces résultats décevants ont notamment été obtenus avec les virus exprimant les F identifiées comme étant les plus fusogènes en expression transitoire cellulaire.

Des virus contenant une seule mutation hyperfusogène dans les régions HR sont en cours de production. Leurs capacités répliquatives seront évaluées *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, une baisse des capacités répliquatives virales appuierait l'hypothèse qu'une protéine F, davantage apte à se conformer dans sa forme de post-fusion, n'est pas adaptée pour une fusion inter-membranaire efficace dans un contexte d'infection.

En absence de production efficace de virus arborant les mutations 144-470-477, nous n'avons pas pu comparer le virus F-HR-GFP au virus WT-GFP. Il est envisageable que la trop forte augmentation de l'interaction entre les deux faces hydrophobes des régions HR mutées puisse provoquer une activation et un repliement trop précoce de la protéine F dans sa configuration de post-fusion non active. Cette hypothèse est en accord avec le fait que la plupart des paramyxovirus ne comportent pas de résidus hydrophobes dans les positions mutées (Figure 15). Néanmoins, dans un contexte d'expression transitoire des protéines hyperfusogènes mutées

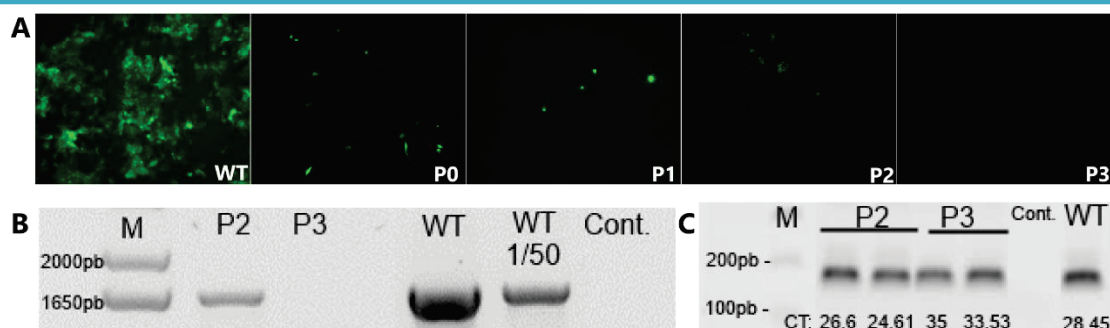


Figure 16 :Déficience de la réplication du virus hMPV CAN98-75 GFP mutant F-HR.

A| Observation de la fluorescence de la protéine GFP après transfection des plasmides pour la génétique inverse de hMPV mutant (P0), puis des infections successives à partir du surnageant de P0 (P1), de P1 (P2) et de P2 (P3), comparé avec une infection par le virus WT. Alors que la protéine GFP codée par le génome viral est produite après la transfection des plasmides de génétique inverse, elle disparaît progressivement. **B|** Détection du gène F par PCR spécifique après des RT PCR effectuées à partir du milieu de culture de cellules infectées par le virus mutant F-HR aux étapes P2 et P3, comparé à une infection avec le virus WT dont le milieu récupéré a été dilué à 1/50 ou non et à un contrôle de milieu de cellules non infectées. Le gène F n'est plus détecté lors de l'étape P3. **C|** Une PCR quantitative a aussi été effectuée sur les mêmes ADN obtenus en B|. Le gène N a été détecté dans les cultures initiales et dans les cultures de virus mutant. Par contre il n'y a aucune indication d'une réplication virale, car les cycles seuils (CT) augmentent lors des infections successives.

à la surface d'une cellule, cette activation précoce constituerait un atout car la protéine se retrouve à proximité directe d'une autre membrane cellulaire. De cette proximité immédiate dès l'expression à la surface de la cellule et de l'activation immédiate de la protéine F, il résulterait une activité de fusion membranaire plus rapidement.

Afin d'étayer notre hypothèse, il serait utile d'évaluer l'impact de ces mutations hyperfusogènes dans la reconnaissance du ou des récepteur(s) de la GP F à la surface des cellules cibles. La caractérisation de ces récepteurs doit préalablement être réalisée.

Néanmoins, ces protéines F mutées semblent constituer des outils intéressants pour le développement de stratégies vaccinales alternatives. En effet, les virus recombinants mutés et produits par génétique inverse ne semblent que très faiblement infectieux. Il serait ainsi pertinent d'en déterminer le titre en particule virale, la quantité de GP F exprimée à leur surface et de caractériser leurs propriétés antigéniques supposées. Des approches de biologie moléculaire quantitative (RTqPCR) et de cryomicroscopie, par exemple, pourraient permettre de répondre à ces questions, à l'image des études réalisées au laboratoire sur les virus influenza (Moules *et al.* 2011).

Ces protéines F hMPV recombinantes sont aussi particulièrement intéressantes pour une stratégie d'optimisation de vecteur oncolytique, comme exposée dans l'article 3. En effet, leur activité autonome hyperfusogène à la surface de lignées cellulaires, mais également leurs propriétés immunogènes supposées dans une population séropositive, font de ces protéines recombinantes des outils de choix pour cette approche thérapeutique.

4 Article 3 : Des vecteurs adénoviraux réplicatifs exprimant une protéine fusion optimisée de parainfluenza de type 5 (PIV-5) permettant une suppression efficace de cellules tumorales

4.1 Introduction

Dans cette étude nous avons utilisé une protéine de F modifiée et hyperfusogène en tant qu'outil moléculaire dans un vecteur adénoviral réplicatif.

Les vecteurs oncolytiques basés sur des virus, notamment adénovirus, sont des solutions nouvelles et innovantes dans les traitements ciblé des tumeurs cancéreuses. Ils sont cependant peu capables de se diffuser au sein des tumeurs, ce qui restreint leur efficacité.

Nous avons synthétisé dans notre étude un vecteur adénoviral de type 5 (AdV-5) réplicatif transportant un transgène *F* PIV-5 (rAd.Fus). Nous avons permis l'expression d'une protéine F de PIV-5 recombinante mutée hyperfusogène (Fus8 et Fus10.2) dans les cellules ciblées (Terrier *et al.* 2009). Les mutations au sein de ces protéines F leur confèrent 1) un phénotype hyperfusogène et 2) une autonomie vis-à-vis de la glycoprotéine HN pour leur activation.

Nous avons démontré dans cette étude que le vecteur rAd.Fus était hautement cytotoxique pour des cellules tumorales de mélanome, pancréatiques et pulmonaires comparé au vecteur contrôle sans transgène *F*, même à faible dose. Le vecteur rAd.Fus10.2 est de plus capable d'empêcher l'évolution et la prise de masse de tumeurs sur des souris immunodéficientes et sur des hamsters dorés immunocompétents.

Cet article a été soumis à un journal international à comité de lecture en langue anglaise.

4.2 Article soumis pour publication

4.2.1 *Enhanced tumor cell killing through replication-competent adenoviral vectors expressing engineered Parainfluenza type 5 fusion membrane glycoproteins.*

Olivier Terrier^{1,*}, François Durupt^{1,3*}, Daniela Grases^{2*}, Manel Cascallo², Jean-Christophe Le Bayon¹, Luc Thomas³, Bruno Lina¹, Rob C. Hoeben⁴, Ramon Alemany², Manuel Rosa-Calatrava¹.

1. Laboratoire de Virologie et Pathologie Humaine EA4610 VirPath, Equipe VirCell, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France

2. Translational Research Laboratory, IDIBELL-Institut Català d'Oncologia, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

3. Service de Dermatologie, Centre Hospitalier Lyon Sud, Université Lyon I, Lyon, France

4. Department of Molecular Cell Biology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

* Both authors contributed equally to this work.

4.2.2 *Abstract*

Improvement in the efficacy of oncolytic adenoviral vectors constitutes an unavoidable step before further therapeutic applications. Different kinds of transgenes have been evaluated in oncolytic adenoviruses to enhance their cytotoxicity, modify tumor microenvironment or to induce an efficient immune response against the tumor cells. Among this transgene arsenal, viral fusogenic membrane glycoproteins (FMGs) constitute weapons of choice. We have previously engineered a library of Parainfluenza virus type 5 FMG mutants, harboring differential combinations of mutations involved in autonomy and fusogenicity (PIV Fus9 and Fus10.2) and we have demonstrated that replication-competent adenoviral vector could efficiently express these engineered PIV5 FMG mutant candidates (rAd.Fus8 and rAd.Fus10.2) (Terrier *et al.* 2009, Durupt *et al.* 2012). The aim of this work was to evaluate these vectors in terms of production, *in vitro* fusogenic and cytotoxic activities, and *in vivo* anti-tumoral properties. Our results indicate that these vectors can be efficiently produced despite their good fusogenic properties. When compared to rAd. Δ E3 control vector, rAd.Fus constructs have demonstrated enhanced oncolytic potency *in vitro*. In addition, the rAd.Fus10.2 exhibited enhanced antitumoral efficacy following intratumoral administration *in vivo* both in mice and immunocompetent Syrian hamster models. In conclusion, rAd.Fus vectors appear as promising steps for the future development of efficient armed oncolytic adenoviral vectors for cancer therapy.

4.2.3 *Introduction*

Oncolytic adenoviral vectors are considered as promising agents for the treatment of cancer. However, a significant therapeutic advantage conferred by these vectors has not been clearly demonstrated to date, notably due several drawbacks, such as insufficient potency and restraint distribution within the tumor mass¹. Therefore, improvements in the efficacy of these oncolytic vectors constitute unavoidable steps before further beneficial applications for cancer patients.

Current engineered vectors are derived from the Adenovirus serotype 5 backbone, which is improved by several types of modifications, such as (i) retargeting of the viral capsid proteins in order to selectively transduce cancer cells; (ii) insertion of tumor-specific promoters upstream the E1 region to restrict the viral replication to tumor cells, and (iii) expression of a key transgene to arm the virus². Different kinds of transgenes have been evaluated in oncolytic adenoviruses to enhance their cytotoxicity, modify tumor microenvironment or to induce an efficient immune response against the tumor cells³. Among this transgene arsenal, viral fusogenic/antigenic membrane glycoproteins (FMGs) constitute weapons of choice.

FMGs consist of a large group of viral proteins that are harbored at the surface of enveloped viruses. These glycoproteins play a role in viral entry into target cells by inducing fusion of the virus envelope with the plasma membrane of the cells⁴. Some of them are also able to induce cell-to-cell fusion in transduced cells, leading to the formation of giant multinucleated cells (syncytia). FMGs could be of interest to arm oncolytic adenoviruses as some of them are highly cytotoxic and harbor a potent bystander effect^{5,6}. Moreover, *in vivo* studies have shown that FMGs can induce a strong immune response that reduces the volume of distant untreated tumors and protects mice from a re-challenge with tumor cells^{5,7-10}.

Several FMGs have already been tested as transgenes in adenoviral vectors, such as HIV gp120, Gibbon Ape Leukemia Virus (GALV) fusion protein, measles fusion F, and also Respiratory Syncytial Virus (RSV), Vesicular Stomatitis Virus (VSV) and the Parainfluenza type 5 (PIV5) fusion proteins^{7,9-22}.

The use of viral fusogenic transgenes raises several technical problems and drawbacks both in the construction and production of the vectors. First, some FMGs, such as measles and RSV F proteins, require the triggering of another viral partner to induce fusion, and are only active if this partner (H or G, respectively) is co-expressed. Therefore, the construction of such vectors requires the insertion of both genes into the adenoviral genome, which size is limited.

Second, the high toxicity of some fusogenic proteins can hamper an efficient production of adenoviral vectors by (i) interfering with pH dependent endosomal decapsulation and viral genome delivery, (ii) or inducing high toxicity to producer cells.

To date, only two types of fusogenic replication-competent vectors have demonstrated significant enhanced oncolytic potency; one expressing the HIV *env* genes downstream the E3 promoter, requiring the CD4 expression on targeted cells, and the other one encoding the native or the hyperfusogenic-form of the GALV fusion protein under the control of the major late promoter (MLP) or modified endogenous E1a promoter^{11,19,22}.

The fusion protein of the Parainfluenza virus type 5 (PIV5 F) is a class I fusion protein. Compared with other viral FMGs that promote fusion in the endosomes at an acidic pH (<6), PIV5 F advantageously induces fusion at a neutral pH at the plasma membrane level. This process occurs after binding of the virus to its sialic acid receptor via the hemagglutinin-neuraminidase (HN) and subsequent activation of F by HN. The mechanism of fusion relies on sequential conformational changes of F, which lead to the insertion of the hydrophobic fusion peptide into the host cell membrane, followed by the refolding of F, bringing the 2 lipidic bilayers in contact with each other^{23,24}. Moreover, PIV5 F fusion protein harbors an advantageous broad tropism as it is cleaved by ubiquitous intracellular proteases²⁵.

In a previous study, we have engineered a library of PIV5 F mutants, harboring differential combinations of mutations previously described in the literature involved in autonomy and fusogenicity, together with new original mutations that optimized such properties²⁶. Two mutants (Fus8 and Fus10.2, **Figure 1A**) presented a hyperfusogenic phenotype, with different characteristics in terms of cell surface expression, syncytia morphology and kinetic of the fusion process. These mutants also acquired an autonomous phenotype, which means they could induce major cell-to-cell fusion without requirement of HN co-expression. In addition, we have recently demonstrated that replication-competent adenoviral vector could efficiently express an engineered PIV5 F candidate, exhibiting its expected fusogenic properties²¹. Based on these results, we then hypothesized that the specific characteristics of PIV5 Fus8 and Fus10.2 mutants could possibly confer an advantage over other fusogenic proteins to arm oncolytic vectors.

The aim of this work was to evaluate novel replication-competent adenoviral vectors expressing these hyperfusogenic PIV5 F mutants, in terms of efficient viral production, *in vitro* fusogenic and cytotoxic activities and *in vivo* anti-tumoral properties.

4.2.4 Results

4.2.4.1 Construction and production of replication-competent fusogenic adenoviruses

The AdEasyI system (E1 and E3 deletion) was used to construct a replication-competent adenoviral backbone by insertion of the entire wild-type E1 region through bacterial homologous recombination. The obtained construct (pAd.E1+.ΔE3) was then used to generate hyperfusogenic and replication-competent adenoviruses through a second homologous recombination. Two engineered autonomous and hyperfusogenic mutants of the Parainfluenza virus type 5 F protein, referred to as Fus8 or Fus10.2²⁶ were inserted downstream a CMV promoter and upstream a polyadenylation signal into the E3-deleted region (*Fus cassette*). The description of these mutants and their functional properties are depicted in **Figure 1A**. The *Fus* cassette was inserted in antisense to the *fiber* gene to not interfere with its expression. The structural organization of the modified E3 region of the vectors is shown in **Figure 1B**. The two fusogenic genomes (pAdE1+.*Fus8* and pAdE1+.*Fus10.2*) and the control backbone (pAd.E1+.ΔE3) were transfected on 911 helper cells. Recombinant adenoviruses (rAd.ΔE3, rAd.Fus8 and rAd.Fus10.2) were amplified on PER.C6 cells and purified by CsCl gradients. Although large syncytial clumps were induced, especially by rAd.Fus10.2 (**Figure 1C**), thick bands of viruses were observed at expected density level after cesium chloride ultracentrifugation, then indicating a amplification of well-shaped viral particles. Moreover, high titer stocks were measured on A549 cells (**Figure 1D**), thereby showing that cell fusion did not impair effective viral production. Interestingly, yields of production of rAdFus vectors were even 50 folds higher than to that was measured for the control rAd.ΔE3 virus. In accordance with our previous study²¹, these data demonstrated the full functionality of these newly fusogenic replication-competent adenoviruses.

4.2.4.2 Fusogenic vectors induce fusion of tumor cells

Fusogenic activity of the vectors was first tested on the human lung adenocarcinoma A549 cell line. Expression of *Fus* genes at different time points was confirmed by immunofluorescence studies using anti F antibody on A549 cells, as previously described²⁶. Due to their regulation through the CMV promoter, the expression of the fusogenic genes was detected early and persistent during the whole infection (data not shown and **Figure 2A and 2B**). In order to assess the fusogenic properties of the vectors, A549 cells were infected at MOI of 0.1 and 5 and fixed 40 hours post-infection (hpi) and were analyzed for syncytia formation

and Fus expression by immunostaining and phase-contrast analysis (**Figure 2**). In all experiments, we reported representative syncytia formation in each entire monolayer of infected cells. Fluorescent staining demonstrated efficient viral expression of *Fus8* and *Fus10.2* and showed their similar immunodetection, as observed in **Figure 2A**, left panel. *Fus*-induced syncytia were clearly visible under phase-contrast microscopy. Staining of plasma membranes with Alexa-488 labelled wheat germ agglutinin (WGA) allowed good visualization of the syncytia. Significant differences in the fusogenic phenotypes were observed, as the number and the size of syncytia induced by rAd.Fus10.2 were significantly higher than those induced by rAd.Fus8 (Figure 2A, rAd.FUS8 *versus* rAd.Fus10.2).

To further validate the fusogenic properties of our vectors, we used a quantitative cell-cell fusion assay using a co-culture system, as we previously described²⁶. A549 cells were transfected with a plasmid expressing the luciferase gene driven by the HIV1-long terminal repeat (LTR) promoter and then infected with the fusogenic replication-competent vectors. Secondly, these cells were co-cultured with HuH7-Tat cells constitutively expressing the HIV-1 Tat activator²⁷. Expression of luciferase was expected only from the virally induced syncytia, where the transactivation of the LTR promoter by the Tat activator could occur. For each time point, results were expressed as percentages of luciferase activity (RLU) compared to that found with infection with rAd.ΔE3. A background fusion activity was observed for the rAd.ΔE3 control virus, most likely due to basal transactivation of LTR promoter by E1 transcription factors. Accordingly to syncytia assay, a significant increase of luciferase activity was observed in the case of infections (24 hpi) with rAd.Fus10.2, at 24hpi compared to the non fusogenic rAd.ΔE3, with a significant gain in fusion up to 40 % (**Figure 2A**, right panel, p-value <0.005). At 36 hpi, the levels of increased fusion activity raised to 40 to 80% for both rAd.Fus8 and rAd.Fus10.2, respectively, thus indicating that fusion induced by the *Fus* genes is a progressive process depending of the time course of infection. All these results were in accordance with our previously published results with Fus8 and Fus10.2 transient expression²⁶.

Similar results were obtained with another tumor cell line, the SK-MEL-28 melanoma cell line. Immunofluorescence studies showed strong expression of *Fus* genes and clear syncytia formation of cells infected by rAd.Fus8 and rAd.Fus10.2 vectors (**Figure 2B**, left panel). Syncytia appeared to be larger on cells infected by rAd.Fus10.2 and a more pronounced lytic effect seems to be obtained on SkMel28 cell line, with the presence of numerous cellular debris (**Figure 2B**, left panel). Quantitative fusion assays confirmed the effective fusion activity

of rAd.Fus8 and rAd.Fus10.2 with more pronounced gain of luciferase activity (up to 3 to 4,5 fold, respectively) than in the case of infection with the rAd. Δ E3 control virus, at 24hpi (**Figure 2B**, right panel, p-value <0.05). Moreover, for rAd.Fus10.2 infection, the fusion was significantly higher at 36 hours post-infection (**Figure 2B**, right panel, p-value <0.005). Altogether, these results have demonstrated a good fusogenic capacity of rAd.Fus vectors, notably marked for the rAd.Fus10.2 vector.

4.2.4.3 rAd.Fus vectors show enhanced cytolytic potency in vitro

It has been previously shown that expression of fusogenic proteins is cytotoxic for the transduced cells and can trigger a bystander effect, inducing cell death even in non-transduced cells *via* their incorporation into syncytia^{5,6}. However, the data concerning this cytotoxicity is mainly focused on fusogenic GALV and measles H/F fusion proteins, but only few information is available about PIV5 F glycoprotein.

To evaluate cytotoxicity of rAd.Fus8 and rAd.Fus10.2 vectors, quantitative viability assays were then performed in a panel of representative tumor cell lines, including human (A549 and SKMel-28), murine (CMT 64) and hamster (HP-1) cells (**Figure 3**). The level of cytotoxicity of rAd.Fus vectors varied according the cell lines and appeared to be more marked for melanoma cells (SK-MEL-28), probably depending on cell permissiveness for Ad. Moreover, for all cell lines evaluated, the expression of *Fus* genes brought a significant gain in cell killing compared to the control vector rAd. Δ E3 at 6 days post-infection. For example, the amount of rAd.Fus8 and rAd.Fus10.2 required to reduce the cell viability by more 50% was always 3 times lower at least compared with the control vector rAd. Δ E3 in SK-Mel-28, HP-1 and A549 cells (**Figure 3**, p <0.05).-Interestingly, cytotoxicity assays performed on murine CMT 64 cells which are known to be poorly permissive to adenoviral replication, indicated a stronger and significant oncolytic effect of rAd.Fus vectors compared to the control vector rAd. Δ E3, which did not showed cytotoxicity, even at very high MOI (Figure 3, p<0.05).

Overall, these results suggest that expression of hyperfusogenic glycoproteins Fus, significantly increases the cytotoxicity of the replication-competent adenovirus on all various tumor cell lines analyzed, and brings a gain of viral oncolytic property even at very low MOIs, notably for rAd.Fus10.2 vector.

4.2.4.4 rAd.Fus10.2 exhibits enhanced antitumoral efficacy following intratumoral administration in vivo

To analyze whether the enhanced tumor cell killing displayed by rAdFus vectors *in vitro* would translate into an enhanced antitumoral effect *in vivo*, mice bearing SK-MEL-28 tumors (average size of 200 mm³) were treated with a single intratumoral injection of PBS, rAd.ΔE3, rAd.Fus8 or rAd.Fus10.2 (1 x 10⁸ TU/tumor). Tumor volume was monitored for twelve weeks post-injection. Tumor progression was significantly reduced by the three replication-competent viruses compared with PBS-treated tumors ($p \leq 0.05$ from day 32 post-injection, **Figure 4A**) and untreated animals were sacrificed at day 65 post-virus inoculation as consequence of uncontrolled tumor growth. Tumors treated with rAd.Fus8 and rAd.ΔE3 showed partial regressions by the end of the study (day 90). Importantly, the Fus-expressing vector, rAd.Fus10.2, exhibited a vigorous antitumor efficacy, and tumor volume was statistically lower compared with its non-fusogenic counterpart, rAd.ΔE3, from day 82 post-virus inoculation (*- $p < 0.05$, **Figure 4A**).

To study whether the observed best efficacy in this model was related to spread of rAd.Fus10.2 in the tumor mass, we carried out immunohistochemical staining for adenoviral capsid proteins in SK-MEL-28 tumor sections. The results from samples obtained at day 90 after treatment revealed patches of positive cells within the rAd-injected tumor masses that were not present in untreated tumors (**Figure 4B**, PBS control *versus* rAd.ΔE3/rAd.Fus10.2). Moreover, observations reveal broader areas of viral replication within tumors treated with rAd.Fus10.2, compared with tumors injected with rAd.ΔE3. Furthermore, in accordance with our previous study in the CAM tumor assay model²¹, SK-MEL-28 tumors treated with rAd.Fus10.2 show large necrotic areas surrounded by fibrotic tissue, less visible in the case of rAd.ΔE3 (black arrows, **Figure 4B** rAd.ΔE3 *versus* rAd.Fus10.2). No sign of necrosis was observed in untreated tumors. These results suggested that the broader anti-tumoral activity could be correlated with expression of fusogenic rAd.Fus10.2 vector.

4.2.4.5 *rAd.Fus10.2 exhibits enhanced antitumoral efficacy following intratumoral administration in vivo in a immunocompetent model*

To further evaluate the significance of the enhanced antitumoral effect of rAd.Fus10.2, we performed a second *in vivo* experiment in a more biological relevant animal model, the Syrian hamsters (**Figure 5A**). Indeed, this model has been described as immunocompetent model wherein human adenovirus is able to replicate and without any known defect for fusogenic function of FMGs²².

Hamsters with sub-cutaneous pancreatic HP-1 tumors were treated intratumorally with PBS, rAd. Δ E3 or rAd.*Fus*10.2 at $9,5 \times 10^8$ TU/tumor. Tumor volume was monitored for five weeks post-injection. In this case, tumors treated with rAd. Δ E3 did not display any antitumoral activity at any time point, compared with PBS-treated tumors (**Figure 5A**). By contrast tumors treated with the rAd.*Fus*10.2 vector showed significant lower tumor volumes with respect to untreated tumors or to tumors treated with rAd. Δ E3 from day 12 post-infection until the end of the experiment ($p < 0,05$, **Figure 5A**).

Immunohistochemical staining for adenoviral capsid proteins in HP-1 tumor sections obtained at final stages after treatment revealed larger patches of adenoviral capsid positive cells within tumors treated with rAd.*Fus*10.2, compared with tumors injected with rAd. Δ E3. Necrotic areas seem to be more extended as well (**Figure 5A**). Finally, strong infiltration of inflammatory cells was observed in tumor sections of both the two rAd treatment groups unlike control PBS group.

Altogether, these results indicated that rAd.*Fus* vectors are compatible with viral oncolysis in immunocompetent animal models and confirm that expression of the *Fus 10.2* gene induce a significant reduction in tumor growth.

4.2.5 Discussion

In this study, we have constructed and evaluated replication-competent adenoviral vectors expressing engineered hyperfusogenic genes derived from the fusion protein of the Parainfluenza virus type 5. Despite cell fusion during the viral production, high titer stocks of intact viral particles have been obtained. The Fus-triggered fusion even seemed to be correlated with higher yields of production (**Figure 1C and 1D**). The vectors were able to induce cell fusion forming large syncytia, and showed increased cytotoxicity *in vitro* on various tumor cell lines compared to the control rAd.ΔE3 virus.

Several fusogenic adenoviral vectors have been constructed to date but most of them were replication-deficient^{7-9,14,16,28}. Some FMGs require the expression of a binding partner to induce fusion (*e.g.* F and H proteins from measles virus). Thus, the insertion of both genes in the viral genome does not allow enough size for the E1 region driving virus replication. In studies involving such vectors, replication-deficient fusogenic vectors were trans-complemented by a replication-competent vector in *in vitro* and *in vivo* experiments^{17,28}. Moreover, in several other studies, the fusion process was considered as a hurdle to the viral replication. Different strategies have been used to circumvent fusion during the viral production, such as the use of cell lines deficient in the cellular receptor used by the FMG¹¹, insertion of a cleavable linker inactivating the fusion protein in the helper cell line¹⁴, the use of fusion inhibitors¹⁵ or the silencing of the fusogenic gene by specific promoters during the viral production¹². However, the regulation of the fusogenic gene by the adenovirus major late promoter (MLP) seemed to be an efficient strategy, as expression of the FMG occurs at the late stages of the viral cycle and does not impair the production yield^{15,19,22}. Using this strategy, Guedan *et al* constructed the only replication-competent fusogenic adenoviral vector produced at high titers whilst fusion occurred during viral amplification^{19,22}. In our study, early expression of the *Fus* genes through CMV promoter was not detrimental to viral production, allowing high titer stocks of the fusogenic vectors. It has been showed that FMGs from different viral origins harbored distinct fusogenic and cytotoxic properties, which varied themselves according to the cell lines tested⁶. The comparison of replication-competent adenoviral vectors expressing different FMGs would be useful to assess whether all FMGs are compatible with efficient viral production.

In this study, fusogenic vectors demonstrated enhanced cytotoxicity compared to the control rAd.ΔE3 vector on a panel of tumor cells including melanoma, pancreatic and lung cells. This increase in cytotoxicity at day 6 post-infection was more evident when the MOI was

low. These data are interesting as one of the main hurdles in cancer gene therapy is the low transduction of tumor cells in the tumor mass. With this in mind, oncolytic vectors able to kill tumor cells at low MOI, such as rAd.Fus8 and rAd.Fus10.2 in this study, could be considered as promising tools in cancer gene therapy. Moreover, compared to other cytotoxic transgenes such as cytosine deaminase or Herpes thymidine kinase, no addition of pro-drug is needed. The increase of cytotoxicity observed at low MOIs is probably related to the bystander effect of the FMGs, which as been assessed by other groups, out of the context of replication-competent vectors^{5,6,13}. It has been shown that GALV and measles FMGs were able to kill all cells of a culture dish with a transfection efficiency of only 1%²⁹. Similar results were obtained using a replication-deficient adenoviral vector expressing PIV5 F on vulvar squamous carcinoma cells¹³. However, the mechanisms by which FMGs kill tumor cells remain unclear. The molecular mechanism inducing cell death could be permabilization of the plasma membrane during the fusion process, as pores are visible in electronic microscopy studies¹³. However, inconsistent results have been published concerning the necrotic or apoptotic death of fused cells. In the early transient-expression experiments with the FMGs of the measles virus and GALV on sarcoma cells, there was no sign of apoptosis even when cell death was obvious. Moreover, positive signs of necrosis were observed, such as release of lactate dehydrogenase in the culture medium and ATP depletion of fused cells^{29,30}. However, other studies have shown signs of apoptosis in glioma or lung carcinoma cells expressing GALV-FMG^{6,31}. The hypothesis was the induction of intracellular apoptosis signals by fusion. Overall, the mechanisms of cell death induced by FMGs are not fully elucidated and appear to be different according to the cell line and the FMG used.

When dealing with replication-competent adenoviral vectors, the fact that FMGs induce the formation of syncytia involving transduced and non-transduced cells, as shown in our immunofluorescence studies, is of critical importance. It has been shown that the viral DNA is present only in few nuclei within the syncytia after an infection at low MOI with a fusion-competent adenovirus^{15,19,22}. Hence, the viral DNA does not spread from nucleus to nucleus within the syncytium and replication takes place only in the nucleus of the cells transduced before fusion occurred. However, it has also been shown that the viral proteins are expressed in the whole syncytium¹⁵ and that fusion allows the spread of the adenoviral gene products from cell to cell¹¹. Thus, the viral particles are released from the whole syncytium after the viral burst. The viruses used in this study were E3 deleted, which implies that the adenoviral death protein (ADP) was not expressed. ADP is involved in the acceleration of cell death after

Adenovirus replication and also in the viral burst which releases the viral progeny out of the infected cell³². Consecutively, the construction of replication-competent vectors expressing both a fusogenic gene and the ADP could be of interest, as the viral progeny would burst from the whole syncytium, increasing the spread of the virus among tumor cells.

The two Ad.Fus vectors evaluated in this study harbored two engineered hyperfusogenic genes with distinct properties in terms of fusion activity, cell-surface expression and kinetics of fusion²⁶. None of these genes was detrimental to efficient vector production with intact capsid content. Between the two proteins assayed in this work, Fus10.2 is the FMG that displayed higher fusogenic phenotype. Moreover, our *in vivo* results using human melanoma tumors in *nude* mice also confirmed the superior ability of Fus10.2 to enhance the antitumoral activity of a replication competent adenovirus.

In vivo studies in immuno-competent animals have shown other major properties of FMGs. Several authors have previously demonstrated that FMGs behave as major antigenic determinants and induce strong anti-tumor immune response, able to eradicate untreated distant tumors and to protect mice from tumor re-challenge^{7-10,16,29}. PIV5 F is also known to demonstrate strong immunogenic properties³³. Although such effects can not be properly studied in the immuno-deficient model of human tumors in nude mice, Syrian golden hamster provides an alternative model where complete immune responses is compatible with semi-permissive replication of human adenovirus³⁴. Moreover contrary to GALV, PIV5 F is able to induce syncytia in hamster cells. Our results demonstrate that the expression of Fus10.2 from a replication-competent adenovirus is able to increase its antitumoral potency against a hamster tumor in an immunocompetent hamster. Further works will evaluate the relative impact of the immune response induced by the expression of Fus10.2, with respect to the impact of the enhancement of the cytotoxicity of the virus itself.

The E2F-1 promoter has been used and engineered to confer a high level of tumor specificity for a novel class of oncolytic adenovirus (ICOVIR15)^{35,36}. Recently, we have shown that expression the hyperfusogenic form of GALV in such construct (ICOVIR16) markedly improved the antitumoral potency of these vectors²². Based on the results presented in this study, a similar strategy will be used to transpose Fus10.2 in the ICOVIR-15 background and evaluate the anti-tumoral properties of this novel ICOVIR-Fus.

In conclusion, rAd.Fus vectors appears as promising steps for the future development of efficient oncolytic adenoviral vectors for cancer therapy.

4.2.6 *Materials and methods*

4.2.6.1 *Cell lines*

Human A549 (lung adenocarcinoma), 911 (embryonic retinoblasts) and SK-MEL-28 melanoma cells were obtained from the ATCC.. Producer PER.C6 cells were obtained from Crucell (Leiden, the Netherlands). Hamster pancreatic tumor cell line HP-1³⁷ was obtained from Dr. Ruben Hernandez-Alcoceba (FIMA, Pamplona, Spain). Murine non-small cell lung carcinoma CMT-64 cells were obtained from Gunnel Halldén (Queen Mary University of London, UK). All cells were grown in Dulbecco's modified Eagle minimal medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1% glutamine, 1% penicillin, and 1% streptomycin.

4.2.6.2 *Generation of replication-competent and hyperfusogenic adenoviruses*

Recombinant replication-competent adenoviruses were generated by two homologous recombinations in the E1 and E3 regions. The pShuttle plasmid containing wild type E1A and E1B regions was digested by *PmeI* and *MfeI*. The 7829bp fragment containing the wild type E1 region was transformed into electro-competent *E. coli* BJ5183 cells (Stratagene) together with the AdEasyI plasmid (Stratagene) for homologous recombination. The resulting plasmid (pAdE1+.ΔE3) was then amplified in GeneHogs competent cells (Invitrogen). The E3 transfer plasmid pMRC700 contains a multiple cloning site downstream a CMV promoter and upstream the SV40 polyadenylation signal, in the deleted E3 region flanked by the *fiber* gene in 5' and by the L4 unit in 3'. The E3 transfer plasmids pMRC.CMVFus8 and pMRC.CMVFus10.2 were constructed by cloning the fusogenic *Fus* genes from the pcDNA3.1*Fus* plasmids described elsewhere²⁶ into the multiple cloning site using a *NotI* and *XhoI* double digestion. A second homologous recombination in *E. coli* BJ5183 cells was then performed using pMRC.CMVFus plasmids linearised by *SalI* and pAdE1+.ΔE3 linearised by *SrfI*. The generated plasmids were designed as pAdE1+.*Fus8* and pAdE1+.*Fus10.2* and amplified in GeneHogs competent cells. Incorporation of E1 and *Fus* genes was confirmed by multiple digestions of the plasmids, PCR amplification and DNA sequencing. Plasmids were cut with *PacI* to remove bacterial cassette and 3μg were transfected on 911 helper cells in a 6-well culture plate after DNA purification. Cytopathic effect was observed after 5 days and cells were harvested after 10 days. Viruses rAd.ΔE3, rAd.Fus8 and rAd.Fus10.2 were further amplified on PER.C6 cells, purified on cesium chloride gradients, dialyzed in 5% sucrose buffer, quantified by PicoGreen as described elsewhere³⁸ and titrated by plaque assays and anti-DBP staining 16 hours post-infection on A549 cells³⁹.

4.2.6.3 *Syncytia assay and confocal microscopy*

A549 and SK-MEL-28 cells grown in 24-well culture plates were infected by rAd.ΔE3, rAd.Fus8 and rAd.Fus10.2 at a MOI of 10, incubated at 37°C for 40h. Infected cells were fixed with 1% (v/v) paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS), washed twice, and allowed to immobilize on coverslips overnight. They were incubated with monoclonal F1a antibody against PIV-5 F⁴⁰ (kindly provided by Richard Randall, University of St. Andrews, Fife, Scotland) at 1/10 in PBS for 3 hours, washed and labelled with anti-mouse IgG-Alexa 633 secondary antibody (Invitrogen) at 1/200 in PBS for 30 min. After washes, cells were incubated for 10 min with DAPI (1/1000) mixed to wheat germ agglutinin-Alexa 488 (1/200 in PBS, Invitrogen), and then mounted on microscopic slides with Fluoromount G (Clinisciences). Series of fluorescent optical section images (Z stacks) were acquired with a TCS SP2 confocal microscope (Leica).

4.2.6.4 *Quantitative fusion assays*

For quantitative fusion assays, A549 and SK-MEL-28 “donor” cells (2.5×10^5 cells/well seeded in 6-well plates 24 hrs prior infection) were transfected with 50 ng of an HIV-1 long terminal repeat (LTR)-luciferase reporter plasmid and infected by rAd.ΔE3, rAd.Fus8 and rAd.Fus10.2 at a MOI of 1^{27} . Twelve hours post-transfection, “donor” cells were detached with PBS-EDTA 0.5mM, counted, and reseeded at the same concentration (10^5 cells/well) in 6-well culture plate. HuH7-Tat “indicator” cells (4×10^5 cells per well), detached with EDTA and washed, were then added to the infected and transfected “donor” cells. The luciferase activity was measured 12 and 24 hrs later (*i.e.* 24 and 36 hours post-infection) using a luciferase assay kit according to the manufacturer’s instructions (Promega).

4.2.6.5 *Cytotoxicity assays*

Cytotoxicity assays were performed by seeding 10^4 SK-MEL-28, HP-1, A549 and CMT64 cells in 96-well plates in DMEM with 5% FBS. Cells were infected with 1/3 serial dilutions of the replication-competent vectors (rAd.ΔE3, rAd.Fus8 and rAd.Fus10.2) starting at very low MOI until MOI 180 (TU/cell). At day 6 post-infection, cells were collected, and survival was assessed by Trypan blue exclusion assay (SK-MEL-28 and HP-1 cells) or total protein content (bicinchoninic acid assay, Pierce Biotechnology, A549 and CMT-64 cells). Results were expressed in percentage of cell viability. Statistical comparison of the survival rates was performed using the Student’s *t* test.

4.2.6.6 *In vivo efficacy studies*

Animal studies were performed at the IDIBELL facility (AAALAC unit 1155) and all experimental protocols were approved by the IDIBELL's Ethical Committee for Animal Experimentation. To evaluate the intratumoral efficacy of the fusogenic adenovirus in mice, human melanoma SK-Mel-28 tumors were established subcutaneously by injection of $8,5 \times 10^6$ cells into the flanks of male Balb/C *nu/nu* mice. Once tumors reached 200 mm^3 in volume, animals were randomly distributed into treatment groups ($n = 10$ tumors per group) and treated with a single intratumoral injection of PBS or 1×10^8 TU/tumor of rAd. $\Delta E3$, rAd.Fus8 or rAd.Fus10.2 in $25 \mu\text{L}$ PBS. To evaluate the efficacy of rAd.Fus10.2 in an immune competent model, hamster pancreatic HP-1 tumors were induced in the flanks of female 5 weeks old immune competent Syrian (golden) hamsters (*Mesocricetus auratus*) by s.c. inoculation of $2,5 \times 10^6$ cells. Once tumor reached 250 to 300 mm^3 hamsters were randomized ($n = 10$ tumors per group) and a single intratumoral injection was performed with PBS, rAd. $\Delta E3$ or rAd.Fus10.2 at $9,5 \times 10^8$ TU/tumor in $25 \mu\text{L}$ PBS. In each animal model, tumor size, as well as animal body weight were recorded three times weekly, and tumor volume was calculated according to the equation $V (\text{mm}^3) = \pi/6 \times W \times L^2$, where W and L are the width and the length of the tumor, respectively. The significance of differences in tumor volume between treatment groups was assessed by a two-tailed Student's unpaired t-test. The statistical significance was set at $p < 0.05$.

4.2.6.7 *Intratumoral adenovirus and syncytia detection*

Animals from each group were euthanized at day 14 and 92 post-administration (mice) or at day 14 and 27 post-administration (hamster) and tumors were collected, weighted, and was fixed in 4% formaldehyde for 24 hours and embedded in paraffin. For immunohistochemical analysis, paraffin-embedded sections of SK-MEL-28 and HP-1 tumors were treated with an anti-adenovirus antibody (Ab6982. Abcam; Cambridge, UK). Immunohistochemical staining was performed with EnVision (DAKO; Hamburg, Germany), according to the manufacturer's instructions.

4.2.7 *References*

- 1 Alemany R, Balagué C, Curiel DT. Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 723–7.
- 2 Alemany R. Designing adenoviral vectors for tumor-specific targeting. *Methods Mol Biol Clifton Nj* 2009; 542: 57–74.
- 3 Cody JJ, Douglas JT. Armed replicating adenoviruses for cancer virotherapy. *Cancer Gene Ther* 2009; 16: 473–88.
- 4 Harrison SC. Viral membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* 2008; 15: 690–8.
- 5 Bateman A, Bullough F, Murphy S, Emiliusen L, Lavillette D, Cosset FL, et al. Fusogenic membrane glycoproteins as a novel class of genes for the local and immune-mediated control of tumor growth. *Cancer Res* 2000; 60: 1492–7.
- 6 Lin E-H, Salon C, Brambilla E, Lavillette D, Szecsi J, Cosset F-L, et al. Fusogenic membrane glycoproteins induce syncytia formation and death in vitro and in vivo: a potential therapy agent for lung cancer. *Cancer Gene Ther* 2010; 17: 256–65.
- 7 Hoffmann D, Bayer W, Wildner O. In situ tumor vaccination with adenovirus vectors encoding measles virus fusogenic membrane proteins and cytokines. *World J Gastroenterol Wjg* 2007; 13: 3063–70.
- 8 Hoffmann D, Bayer W, Wildner O. Local and distant immune-mediated control of colon cancer growth with fusogenic membrane glycoproteins in combination with viral oncolysis. *Hum Gene Ther* 2007; 18: 435–50.
- 9 Hoffmann D, Bayer W, Wildner O. Therapeutic immune response induced by intratumoral expression of the fusogenic membrane protein of vesicular stomatitis virus and cytokines encoded by adenoviral vectors. *Int J Mol Med* 2007; 20: 673–81.
- 10 Hoffmann D, Grunwald T, Bayer W, Wildner O. Immune-mediated anti-neoplastic effect of intratumoral RSV envelope glycoprotein expression is related to apoptotic death of tumor cells but not to the size of syncytia. *World J Gastroenterol Wjg* 2008; 14: 1842–50.
- 11 Li H, Haviv YS, Derdeyn CA, Lam J, Coolidge C, Hunter E, et al. Human immunodeficiency virus type 1-mediated syncytium formation is compatible with adenovirus replication and facilitates efficient dispersion of viral gene products and de novo-synthesized virus particles. *Hum Gene Ther* 2001; 12: 2155–65.
- 12 Brade AM, Szmitko P, Ngo D, Liu F-F, Klamut HJ. Heat-directed tumor cell fusion. *Hum Gene Ther* 2003; 14: 447–61.
- 13 Gómez-Treviño A, Castel S, López-Iglesias C, Cortadellas N, Comas-Riu J, Mercadé E. Effects of adenovirus-mediated SV5 fusogenic glycoprotein expression on tumor cells. *J Gene Med* 2003; 5: 483–92.
- 14 Allen C, McDonald C, Giannini C, Peng KW, Rosales G, Russell SJ, et al. Adenoviral vectors expressing fusogenic membrane glycoproteins activated via matrix

- metalloproteinase cleavable linkers have significant antitumor potential in the gene therapy of gliomas. *J Gene Med* 2004; 6: 1216–27.
- 15 Horn GP, Vongpunsawad S, Kornmann E, Fritz B, Dittmer DP, Cattaneo R, et al. Enhanced cytotoxicity without internuclear spread of adenovirus upon cell fusion by measles virus glycoproteins. *J Virol* 2005; 79: 1911–7.
 - 16 Hoffmann D, Bangen J-M, Bayer W, Wildner O. Synergy between expression of fusogenic membrane proteins, chemotherapy and facultative virotherapy in colorectal cancer. *Gene Ther* 2006; 13: 1534–44.
 - 17 Hoffmann D, Wildner O. Comparison of herpes simplex virus- and conditionally replicative adenovirus-based vectors for glioblastoma treatment. *Cancer Gene Ther* 2007; 14: 627–39.
 - 18 Hoffmann D, Heim A, Nettelbeck DM, Steinstraesser L, Wildner O. Evaluation of twenty human adenoviral types and one infectivity-enhanced adenovirus for the therapy of soft tissue sarcoma. *Hum Gene Ther* 2007; 18: 51–62.
 - 19 Guedan S, Gros A, Cascallo M, Vile R, Mercade E, Alemany R. Syncytia formation affects the yield and cytotoxicity of an adenovirus expressing a fusogenic glycoprotein at a late stage of replication. *Gene Ther* 2008; 15: 1240–5.
 - 20 Hoffmann D, Bayer W, Heim A, Potthoff A, Nettelbeck DM, Wildner O. Evaluation of twenty-one human adenovirus types and one infectivity-enhanced adenovirus for the treatment of malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 988–98.
 - 21 Durupt F, Koppers-Lalic D, Balme B, Budel L, Terrier O, Lina B, et al. The chicken chorioallantoic membrane tumor assay as model for qualitative testing of oncolytic adenoviruses. *Cancer Gene Ther* 2012; 19: 58–68.
 - 22 Guedan S, Grases D, Rojas JJ, Gros A, Vilardell F, Vile R, et al. GALV expression enhances the therapeutic efficacy of an oncolytic adenovirus by inducing cell fusion and enhancing virus distribution. *Gene Ther* 2012; 19: 1048–57.
 - 23 Lamb RA, Jardetzky TS. Structural basis of viral invasion: lessons from paramyxovirus F. *Curr Opin Struct Biol* 2007; 17: 427–36.
 - 24 Chang A, Dutch RE. Paramyxovirus fusion and entry: multiple paths to a common end. *Viruses* 2012; 4: 613–36.
 - 25 Karron R, Collins P. Parainfluenza viruses. In: *Fields virology*. Fields BN, Knipe DM, Howley PM: New-York, 2007, pp 1497–526.
 - 26 Terrier O, Durupt F, Cartet G, Thomas L, Lina B, Rosa-Calatrava M. Engineering of a parainfluenza virus type 5 fusion protein (PIV-5 F): development of an autonomous and hyperfusogenic protein by a combinational mutagenesis approach. *Virus Res* 2009; 146: 115–24.
 - 27 Lavillette D, Pécheur E-I, Donot P, Fresquet J, Molle J, Corbau R, et al. Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. *J Virol* 2007; 81: 8752–65.

- 28 Hoffmann D, Wildner O. Enhanced killing of pancreatic cancer cells by expression of fusogenic membrane glycoproteins in combination with chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 2013–22.
- 29 Bateman AR, Harrington KJ, Kottke T, Ahmed A, Melcher AA, Gough MJ, et al. Viral fusogenic membrane glycoproteins kill solid tumor cells by nonapoptotic mechanisms that promote cross presentation of tumor antigens by dendritic cells. *Cancer Res* 2002; 62: 6566–78.
- 30 Higuchi H, Bronk SF, Bateman A, Harrington K, Vile RG, Gores GJ. Viral fusogenic membrane glycoprotein expression causes syncytia formation with bioenergetic cell death: implications for gene therapy. *Cancer Res* 2000; 60: 6396–402.
- 31 Galanis E, Bateman A, Johnson K, Diaz RM, James CD, Vile R, et al. Use of viral fusogenic membrane glycoproteins as novel therapeutic transgenes in gliomas. *Hum Gene Ther* 2001; 12: 811–21.
- 32 Tollefson AE, Scaria A, Hermiston TW, Ryerse JS, Wold LJ, Wold WS. The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *J Virol* 1996; 70: 2296–306.
- 33 Paterson RG, Lamb RA, Moss B, Murphy BR. Comparison of the relative roles of the F and HN surface glycoproteins of the paramyxovirus simian virus 5 in inducing protective immunity. *J Virol* 1987; 61: 1972–7.
- 34 Thomas MA, Spencer JF, La Regina MC, Dhar D, Tollefson AE, Toth K, et al. Syrian hamster as a permissive immunocompetent animal model for the study of oncolytic adenovirus vectors. *Cancer Res* 2006; 66: 1270–6.
- 35 Rojas JJ, Cascallo M, Guedan S, Gros A, Martinez-Quintanilla J, Hemminki A, et al. A modified E2F-1 promoter improves the efficacy to toxicity ratio of oncolytic adenoviruses. *Gene Ther* 2009; 16: 1441–51.
- 36 Rojas JJ, Guedan S, Searle PF, Martinez-Quintanilla J, Gil-Hoyos R, Alcayaga-Miranda F, et al. Minimal RB-responsive E1A promoter modification to attain potency, selectivity, and transgene-arming capacity in oncolytic adenoviruses. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 2010; 18: 1960–71.
- 37 Batra SK, Metzgar RS, Worlock AJ, Hollingsworth MA. Expression of the human MUC1 mucin cDNA in a hamster pancreatic tumor cell line HP-1. *Int J Pancreatol Off J Int Assoc Pancreatol* 1992; 12: 271–83.
- 38 Murakami P, McCaman MT. Quantitation of adenovirus DNA and virus particles with the PicoGreen fluorescent Dye. *Anal Biochem* 1999; 274: 283–8.
- 39 Mittereder N, March KL, Trapnell BC. Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J Virol* 1996; 70: 7498–509.
- 40 Randall RE, Young DF, Goswami KK, Russell WC. Isolation and characterization of monoclonal antibodies to simian virus 5 and their use in revealing antigenic differences between human, canine and simian isolates. *J Gen Virol* 1987; 68 (Pt 11): 2769–80.

4.2.8 *Figures*

Cet article scientifique présente 5 figures. Chaque figure est présentée dans une double page ci-après.

Figure 1. Construction of replication-competent hyperfusogenic adenoviral vectors (AdFus). **A.** Schematic representation of the F PIV5 protein. The 2 subunits (F1 and F2), the fusion peptide (FP), the cleavage site (CS), the heptad-repeat domains (HR) and the transmembrane region (TM) are depicted. Mutations involved in the autonomous phenotype of FUS mutants are shown in green, mutations destabilising the pre-fusion conformation are shown in red, and mutations stabilizing the post-fusion state are shown in blue. **B.** Schematic representation of the adenoviruses used in this study. The control vector (rAd.ΔE3) is a replication-competent adenovirus serotype 5 containing the wild-type E1 region and deleted in the E3 region. Hyperfusogenic adenoviruses (rAd.Fus8 and rAd.Fus10.2) were constructed by insertion of an expression cassette consisting of a CMV promoter, the Fus gene (Fus8 or Fus10.2 respectively) and the human beta-globin polyadenylation signal (polyA), into the E3 deleted region between the L4 unit and the fiber gene. **C.** Syncytia occurring in PERC.6 cells during the viral amplification of rAd.Fus8 and rAd.Fus10.2. **D.** Isolation of intact viral particles after double cesium-chloride gradient centrifugation (left to right: rAd.ΔE3, medium: rAd.Fus8 and rAd.Fus10.2). Titers of the viral preps are expressed in viral particles per milliliter (vp/mL).

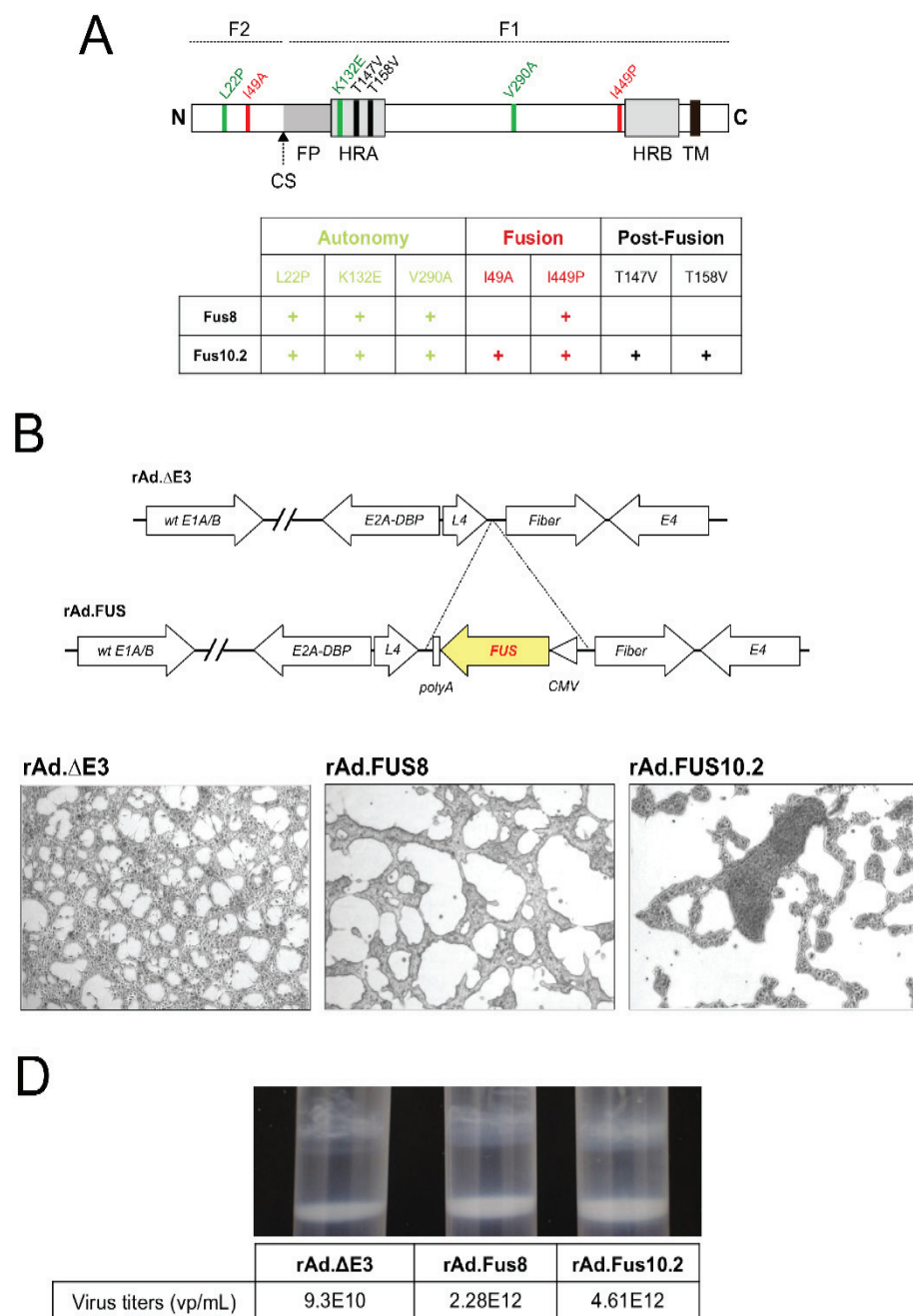
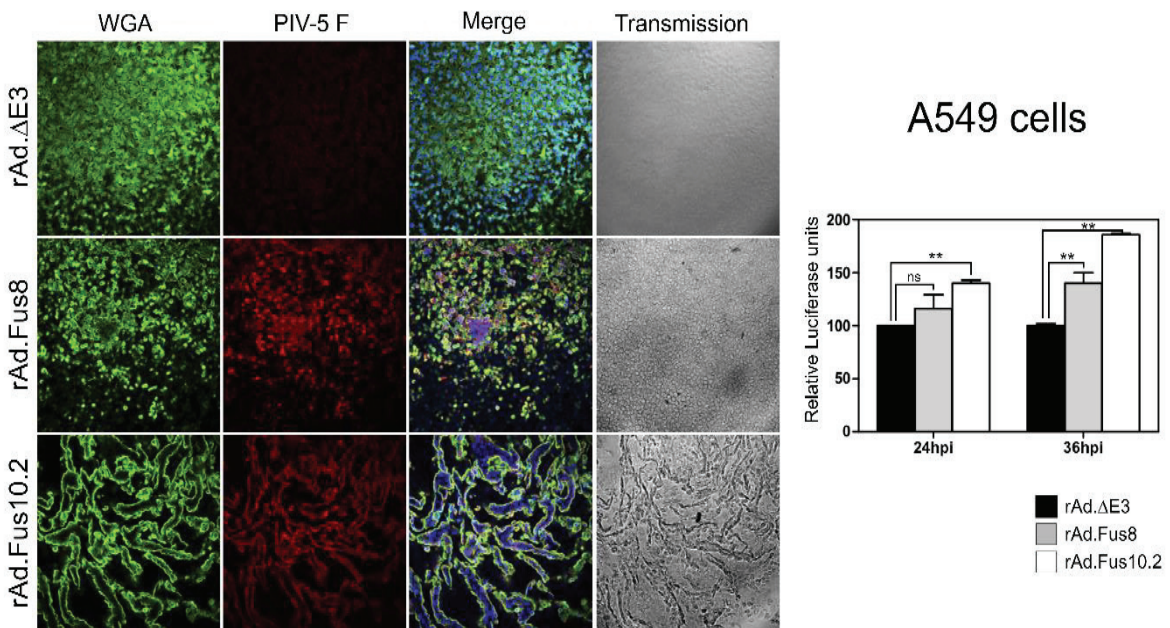


Figure 1

Figure 2. Hyperfusogenic vectors induce fusion in A549 cells. **A. Left panel:** Immunofluorescence study of A549 cells infected by rAdFus8 and rAdFus10.2. A549 cells were infected by rAd.Fus8 and rAd.Fus10.2 at MOI of 1. Cells were fixed 40 hpi and stained with wheat-germ agglutinin 488 (green), anti PIV5 F (red) and DAPI (blue). **Right panel.** Quantitative cell fusion assay. A549 cells were infected with rAd.ΔE3, rAd.Fus8 and rAd.Fus10.2 vectors at MOI of 1 and transfected by a LTR-luciferase reporter plasmid. Twelve hours later, cells were resuspended and overlaid onto HuH7-Tat cells, as described in the Materials and methods section. Luciferase activity was measured 36 and 48 h post-infection. Quantification of fusion (RLU) is expressed as a percentage of the luciferase activity measured post-infection for the rAd.ΔE3 vector. Results are shown as means $\pm$ standard deviation of three independent experiments. **B. Left and right panel.** Immunofluorescence study and quantitative cell fusion assay performed on SkMel28 (same experimental conditions as in A). **,significant ($p < 0.005$) by two-tailed unpaired Student's t-test compared to rAd.ΔE3. ns, $P > 0.05$.

A



B

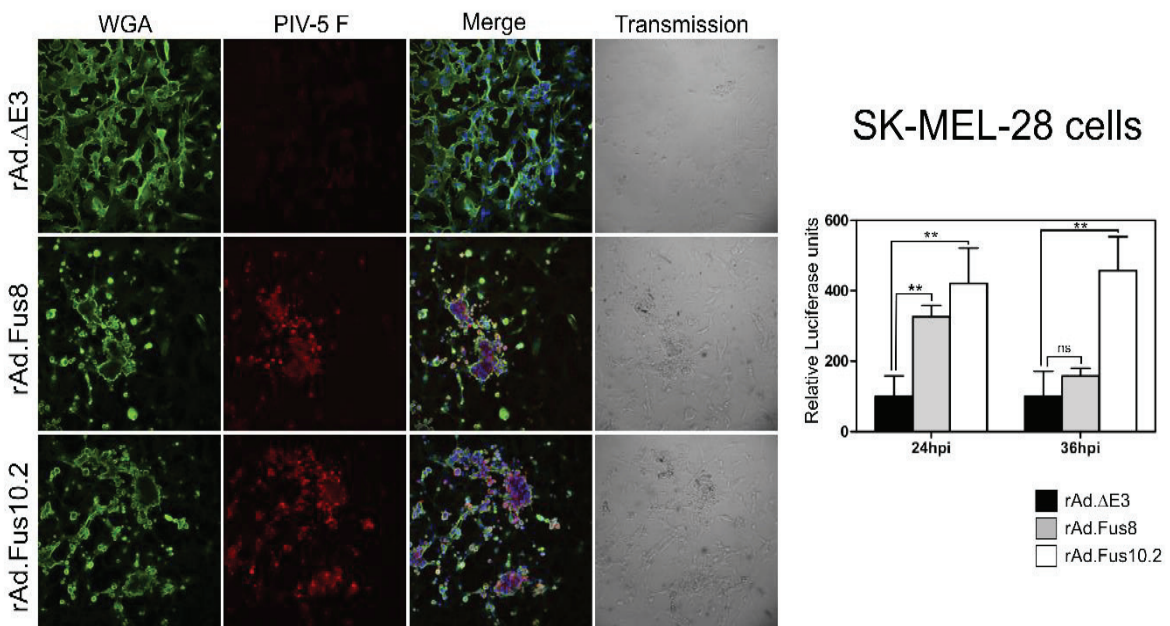


Figure 2

Figure 3. Hyperfusogenic oncolytic adenoviruses significantly bring more cytotoxicity on tumor cells compared to control rAd. Δ E3 vector. Cytotoxicity assays of various tumor cell lines infected by the replication-competent vectors rAd. Δ E3, rAd.Fus8 and rAd.Fus10.2. Survival of cells is expressed in percentage of cell viability. Statistical comparison of the survival rates was performed using the Student's t test (* $p < 0.05$). Bars indicate standard deviation.

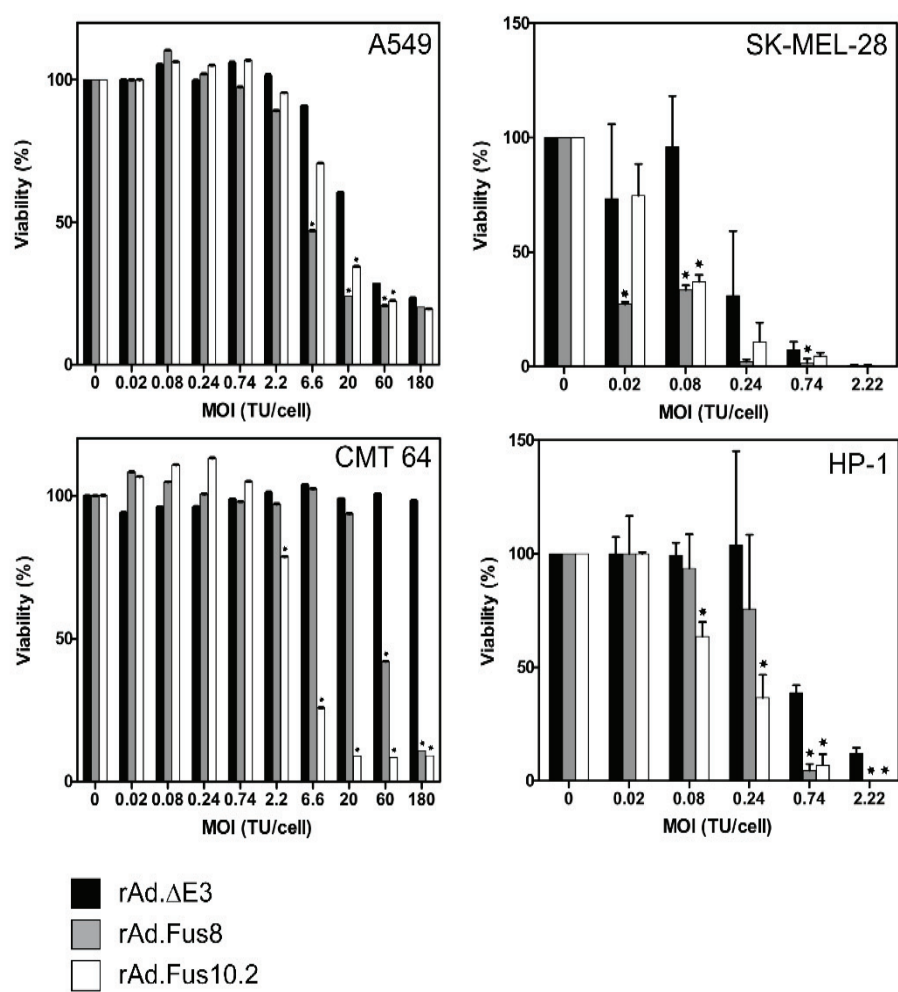
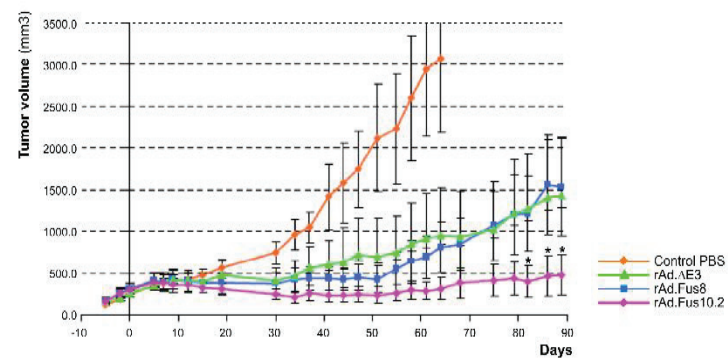


Figure 3

Figure 4. Oncolytic viruses expressing fusogenic proteins have enhanced antitumoral activity *in vivo*. Human melanoma SK-Mel-28 tumors were established subcutaneously by injection of $8,5 \times 10^6$ cells into the flanks of male Balb/C *nu/nu* mice. Once tumors reached 200 mm^3 in volume, animals were randomly distributed into treatment groups ($n = 10$ tumors per group) and treated with a single intratumoral dose of 1×10^8 TU of rAd. Δ E3 (green), rAd.Fus8 (blue) or rAd.Fus10.2 (purple) or phosphate-buffered saline (PBS) (red). (A) Percentage of tumor volume $\pm$ SE is plotted*, significant ($p < 0.05$) by two-tailed unpaired Student's t-test compared to with mice injected with rAd. Δ E3. (B) Representative anti-adenovirus immunohistochemistry of SK-Mel-28 xenograft tumors obtained at day 90 after intratumoral administration of PBS (a) or 1×10^8 TU rAd. Δ E3 (b) , rAd.Fus8 (c) or rAd.Fus10.2 (d). Necrotic areas are indicated by black arrows.

SK-MEL-21 Tumors - Balb/C *nu/nu* mice

A



B

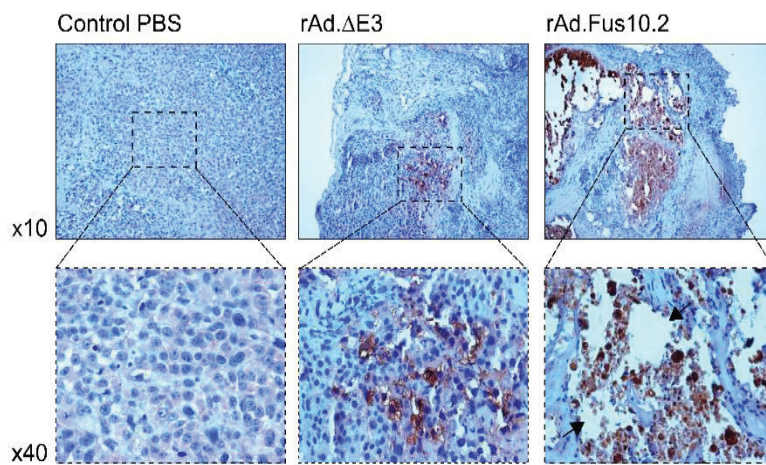


Figure 4

Figure 5. Oncolytic viruses expressing fusogenic proteins have enhanced antitumoral activity in immuno-competent animals. Hamster with subcutaneous xenografts HP1 (n = 10 tumors/group) were randomized and treated with a single intratumoral dose of 1×10^8 TU of rAd. Δ E3 (solid triangles) , rAd.Fus8 (solid squares) or rAd.Fus10.2 (solid diamonds) or phosphate-buffered saline (PBS) (solid circles). (A) Percentage of tumor volume $\pm$ SE is plotted. *,significant ($p < 0.05$) by two-tailed unpaired Student's t-test compared to with mice injected with rAd. Δ E3. (B) Representative anti-adenovirus immunohistochemistry of HP1 xenograft tumors obtained at day 92 after intratumoral administration of PBS (a) or 1×10^8 TU rAd. Δ E3 (b) , rAd.Fus8 (c) or rAd.Fus10.2 (d)

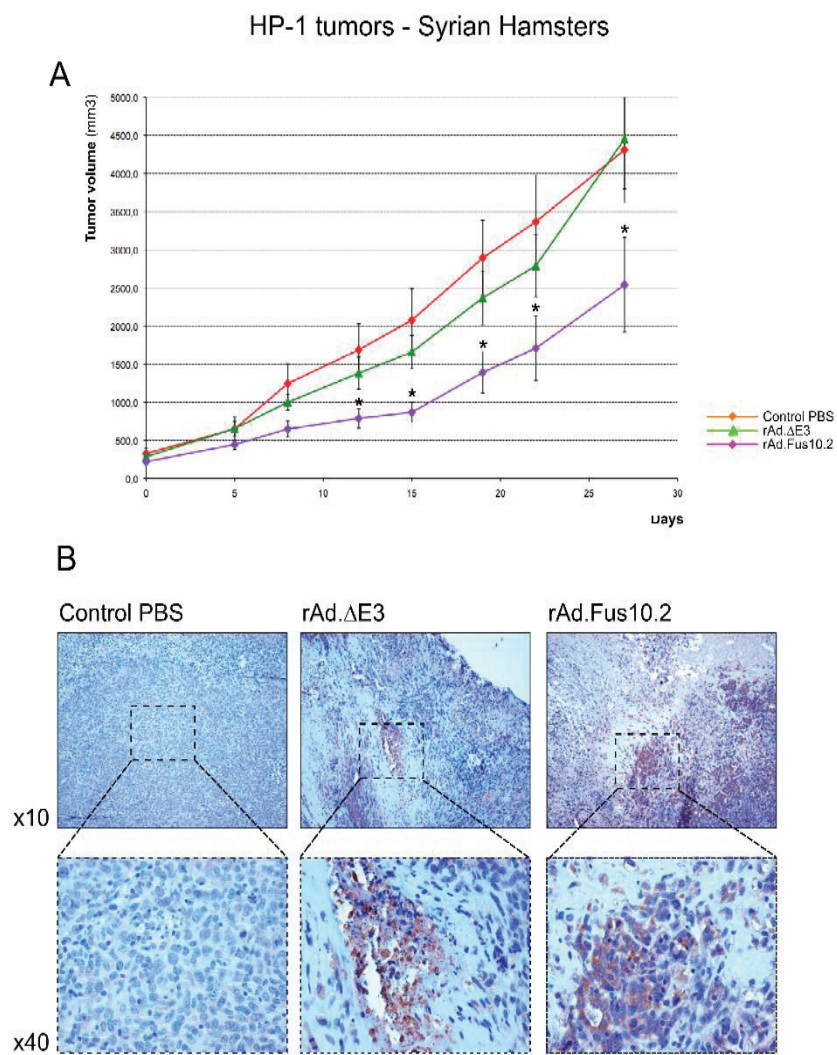


Figure 5

4.3 Discussion et perspectives

Les vecteurs oncolytiques basés sur des virus, notamment adénovirus, constituent des approches technologiques intéressantes pour le traitement des tumeurs. Cependant, ces vecteurs souffrent de certaines limitations majeures et notamment, celle de leur faible dissémination au sein des tumeurs solides, ce qui restreint leur efficacité thérapeutique.

L'expression à la surface des cellules tumorales de la glycoprotéine F hyperfusogène de PIV-5 précédemment développée et évaluée (Terrier *et al.* 2009) pourrait potentiellement constituer une solution à ce problème. Il a par ailleurs été démontré que ce type de GP fusogène pouvait améliorer la cytotoxicité des vecteurs adénoviraux et induire une meilleure réponse immune contre la tumeur (Bateman *et al.* 2000, Lin *et al.* 2010).

Dans notre étude, nous avons construit un vecteur adénoviral réplcatif de type 5 (AdV-5) équipé de transgènes *F* PIV-5 (rAd.Fus), permettant l'expression de protéines F de PIV-5 recombinantes hyperfusogènes. La combinaison de mutations introduites (L22P, K132E, V290A) dans la protéine F recombinante Fus8 sont associée à un phénotype indépendant de l'activité de la protéine HN homotypique et à un accroissement de la capacité à induire des syncytiums *in vitro* (I449P). La protéine recombinante Fus10.2 comporte quant à elle des mutations supplémentaires (mutations T147V et T158V) qui favorisent la fusion cellulaire via l'augmentation de l'hydrophobicité de la face interne du domaine HRA, qui favorise le repliement de la protéine.

Bien que ce type de vecteur adénoviral exprimant une glycoprotéine permettant la fusion membranaire ait déjà été construit, la plupart se sont révélés incapables de se répliquer efficacement (Allen *et al.* 2004, Hoffmann *et al.* 2006, Hoffmann and Wildner 2006, Hoffmann *et al.* 2007, Hoffmann *et al.* 2007). L'expression du gène *F* de PIV-5, sous promoteur CMV ne semble pas provoquer un tel problème dans le cas de nos constructions et nous avons pu ainsi produire des vecteurs adénoviraux fusogènes avec de hauts titres de particules infectieuses. Il conviendrait de comparer d'autres protéines de fusion membranaire dans le même système adénoviral pour déterminer si la répllication efficace est rendue possible par notre construction génomique, et/ou par une plus grande compatibilité vis-à-vis de l'expression de la protéine F de PIV-5 par rapport à d'autres protéines de fusion. L'hypothèse d'une amplification de la production virale grâce à l'expression de nos protéines de fusion n'est pas à exclure, notamment via l'induction connue de l'apoptose par les protéines F, processus cellulaire indispensable à la

libération des virions néo synthétisés en fin de cycle viral. Ces résultats en termes de production sont en faveur du développement

Par ailleurs, nous avons démontré que nos vecteurs rAd.Fus étaient davantage cytotoxiques pour différentes lignées cellulaires tumorales pancréatique, pulmonaire ou issues de mélanome, en comparaison du vecteur contrôle sans transgène *F*. Ces résultats sont d'autant plus significatifs que les vecteurs fusogènes présentent les mêmes propriétés cytotoxiques à faible dose et très encourageant en regard du faible taux de transduction des cellules cancéreuses dans les tumeurs injectées *in vivo*.

En cohérence avec ces résultats *in vitro*, l'administration de nos vecteurs rAd.Fus dans des tumeurs de mélanome humain SK-Mel-28 établies sur des souris Balb/C immunosupprimées a permis d'observer une stabilisation de la masse tumorale et une durée de vie plus importante des animaux injectés par les rAD-Fus. Des résultats similaires ont également été obtenus dans un modèle animal immunocompétent (tumeurs HP-1 établies chez des hamsters). Ces résultats démontrent ainsi la valeur ajoutée des GP de fusion modifiées, en l'occurrence de PIV-5, pour les vecteurs oncolytiques.

Outre les propriétés de fusion et de cytotoxicité des rAd.fus, les résultats obtenus en modèle animal immunocompétent, suggèrent l'implication des propriétés immunogènes de F PIV5. En effet, plusieurs études ont déjà démontrée la stimulation par les GP de fusion de la réponse immune anti-tumorale (Hoffmann *et al.* 2007, Hoffmann *et al.* 2008). Dans le cas des F optimisées, il est cependant nécessaire d'évaluer dans quelle mesure la réponse immunitaire contre les protéines Fus est impliquée dans l'augmentation éventuelle de la réponse contre la tumeur.

Le développement futur de ce vecteur pourrait potentiellement se baser sur la protéine F de hMPV développée et présentée dans l'article 2. Cette protéine hyperfusogène étant naturellement indépendante de sa glycoprotéine d'attachement G elle ne nécessite pas de développement pour la rendre autonome comme pour la protéine F de PIV-5. De plus l'expression de la GP F de hMPV à la surface des cellules tumorales pourrait induire une réponse immune plus efficace que celle associée à PIV-5, et plus rapidement après l'infection l'inoculation du vecteur. En effet le taux d'exposition au virus hMPV est élevé, et le taux d'adultes séropositifs à hMPV peut atteindre près de 95% (Leung *et al.* 2005).

5 Technique : utilisation de nanoparticules fluorescentes pour quantifier la fusion intercellulaire

5.1 Introduction

Au sein des paramyxovirus, la formation de syncytium n'est pas retrouvée *in vivo* à l'exception du virus MeV (Griffin *et al.* 2012). Néanmoins l'observation des syncytiums *in vitro* sur un tapis cellulaire constitue un outil précieux pour mesurer l'infection et plus particulièrement l'activité fusogène des protéines F. L'expression des glycoprotéines virales en surface des cellules infectées est en effet responsable de la fusion des cellules entre elles, formant ainsi des cellules géantes multinucléées (GMC), appelées également syncytium (Henrickson 2003). L'inhibition de la formation de syncytium peut aussi être utilisée pour tester les inhibiteurs de fusion (voir partie dédiée page 36).

La technique la plus utilisée pour quantifier la capacité des protéines F à faire fusionner les membranes cellulaires est le simple comptage des GMC. Cette méthode a pour inconvénient de ne pas prendre en compte plusieurs paramètres tels que la taille des syncytiums, la surface du tapis occupée par les syncytiums et la conformation tridimensionnelle du syncytium. Cette méthode, bien que largement rapportée dans la littérature, ne permet pas d'obtenir une quantification fine de la fusion membranaire. Il existe un système plus élaboré permettant la quantification de la fusion à l'aide d'un gène rapporteur en condition de co-culture cellulaire. Ainsi, une cellule qui exprime constitutivement T7 pourra activer l'expression d'un gène d'intérêt sous promoteur T7 dans un plasmide transfecté dans une deuxième cellule, si ces deux cellules fusionnent. Un exemple d'un tel système est basé sur l'utilisation (i) d'une lignée cellulaire HuH7-Tat exprimant constitutivement le transactivateur tat de HIV-1 et (ii) de la lignée LLC-MK2 que l'on transfecte par des plasmides codant la protéine F d'intérêt et exprimant la luciférase sous le promoteur LTR de HIV-1 (activé par Tat) (Lavillette *et al.* 2007). Ce système est décrit dans l'article 2.

Malgré ces avantages, ce type de méthodologie oblige cependant à utiliser, voire construire, une lignée cellulaire donneuse spécifique, ce qui en complique l'utilisation. Cette technique oblige également à transfecter la lignée cellulaire receveuse avec le plasmide rapporteur et celui codant les protéines d'intérêt. Or, l'utilisation de produits de transfection a

un impact sur la membrane cellulaire et peut interférer avec l'infection et/ou la fusion membranaire induite.

A partir de ce constat, nous avons cherché à développer une technique fiable de quantification de la fusion cellulaire, qui puisse être automatisée et qui soit compatible avec différents types d'infections, au moins en ce qui concerne les paramyxovirus. Dans cette perspective, l'outil « nanoparticules » présentait l'avantage de pénétrer et d'être retenu par les cellules tout en étant associé à une faible cytotoxicité, ce qui en permettait l'utilisation *in vitro*, voir *in vivo* (Connor *et al.* 2005, Vuu *et al.* 2005, De *et al.* 2008).

Nous avons donc mené une étude pilote sur des nanoparticules constituées (i) d'un cœur en oxyde de gadolinium, (ii) d'une première enveloppe de silice intégrant un fluorophore Cy5 (nano-NX2-Cy5Cl) ou fluorescéine (nano-NX2-FICl) et (iii) d'une deuxième comportant des acides carboxyles à la surface. Ces derniers confèrent une charge négative à la nanoparticule qui lui permet de pénétrer à l'intérieur des cellules. Nous avons ainsi évalué ces nanoparticules dans un contexte de fusion cellulaire viro-induite avec l'objectif de (i) d'évaluer leur cytotoxicité, (ii) de définir leur compatibilité avec l'infection et la fusion membranaire cellulaire et enfin (iii) de développer une méthode de quantification de la fusion par imagerie.

5.2 Matériel et méthodes

5.2.1 Nanoparticules

Les nanoparticules fournies par la société nano-H sont constituées d'un cœur en oxyde de gadolinium de 2nm, et de deux enveloppes de silice intégrant un fluorophore Cy5 (nano-NX2-Cy5Cl) ou fluorescéine (nano-NX2-FICl), et d'acides carboxyles.

5.2.2 Intégration des nanoparticules dans les cellules

Un tapis cellulaire de cellules A549 est cultivé à confluence en flasque de 75cm² (BD), puis est rincé au PBS (Gibco, Life) et incubé avec $7,5 \cdot 10^{-3}$ g.L⁻¹ de trypsine (Gibco, Life) dans 1 mL total de PBS. Ensuite, le tapis est dilué à $1 \cdot 10^6$ cellules/mL avec du milieu de croissance (environ 6mL final). 10^6 cellules sont distribuées par tube dans 5 microtubes 1,5mL (eppendorf), et centrifugées à 2000 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant est remplacé par 950μL de milieu de culture sans sérum, et les cellules sont resuspendues. Les cellules sont placées à 37°C, sous agitation et à l'obscurité après l'ajout de 3mM final de nanoparticules NX2 (nano-H). Les cellules sont à nouveau centrifugées et resuspendues dans 950μL de milieu de croissance et rincées 3X au PBS avant leur ensemencement (Labtek, Nunc).

Les cellules en suspension ont été incubées pendant 1H avec 3mM de nano-NX2-Cy5Cl et nano-NX2-FICl, puis ont été réensemencées dans une plaque 6 puits (temps = 0h). Des cellules marquées par chaque type de nanoparticules sont mélangées et cultivées en co-culture, comme indiqué.

5.2.3 Test de cytotoxicité

Le tapis cellulaire est décollé, comme décrit ci-dessus, puis ressuspendu dans 5mL de milieu de croissance (selon les lignées). 0,5mL de 0,4% de Bleu de trypan (Sigma Aldrich) est ajouté à 0,5mL de cellules en suspension. Après 1 minute d'incubation, 500 cellules sont comptées et discriminées. Le taux de viabilité est calculé en divisant le nombre de cellules n'intégrant pas le colorant par le nombre total de cellules.

5.2.4 Infection par hPIV-2

Les cellules marquées par les nanoparticules depuis 24 heures sont rincées au PBS puis incubées avec 100μL de virus dilué à $1,5 \cdot 10^7$ particules infectieuse/mL (MOI=1) pendant 1 heure sous agitation à 37°C. Ensuite, 900μL de milieu de croissance sont ajoutés au milieu de culture cellulaire.

5.2.5 *Observation en microscopie confocale*

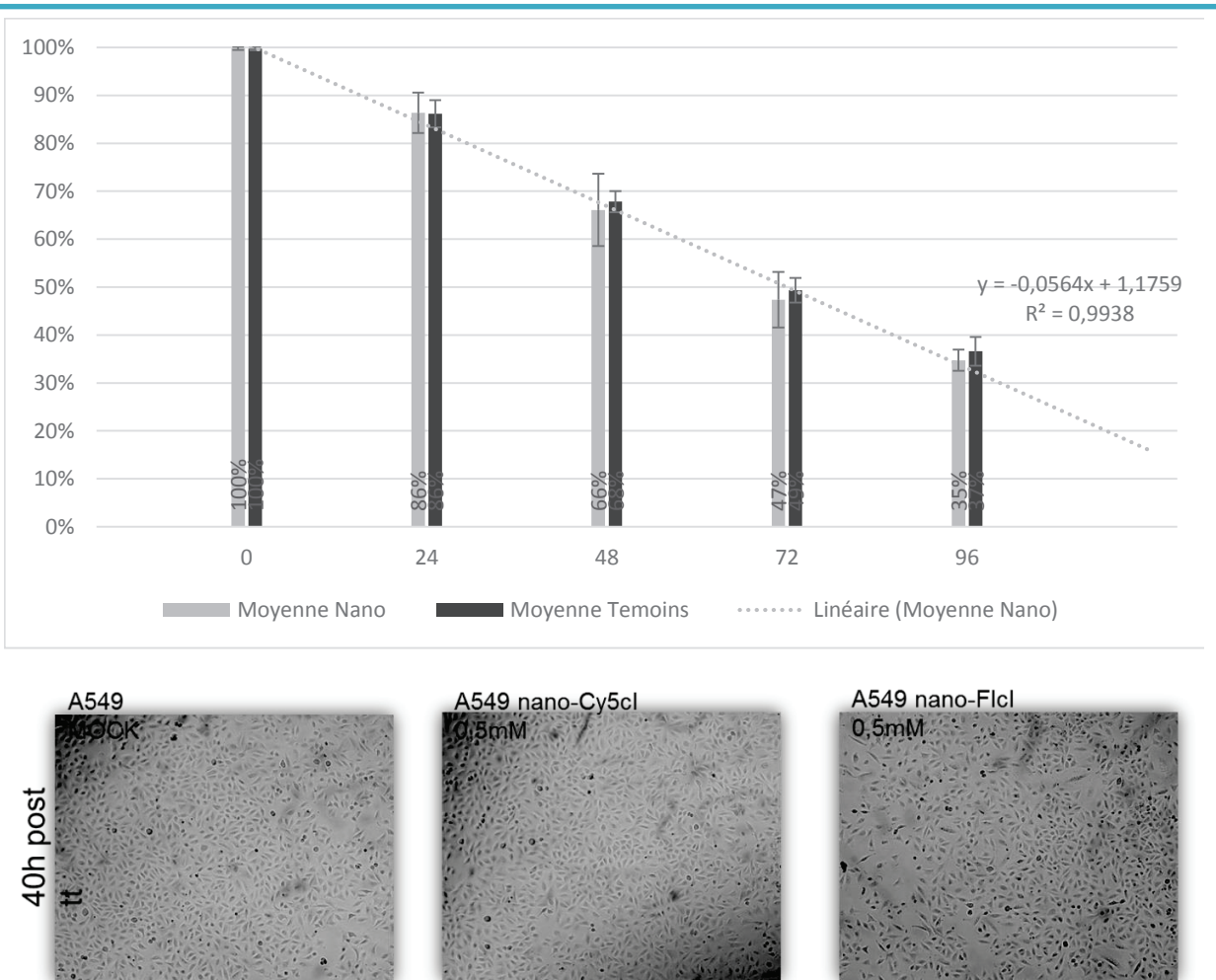
Les cellules ont été préparées et observées selon la méthodologie décrite précédemment (article 1, ci-dessus).

5.3 Résultats

5.3.1 Test de viabilité cellulaire

Le test de fusion intercellulaire que nous voulons évaluer doit interférer le moins possible sur les cellules. Nous avons donc évalué l'induction de la mort cellulaire par les nanoparticules, comparé à des cellules ne comportant pas de nanoparticules.

Les cellules en suspension ont été incubées pendant 1 heure avec 3mM de nano-NX2-Cy5Cl, puis réensemencées dans une plaque 6 puits (temps = 0h). Jusqu'à 96 heures, aucune différence significative n'a été observée entre la mortalité des cellules, sans et avec



nanoparticules, pour les cellules A549 (Figure 17, haut) et LLC-MK2 (mesures non présentées). L'observation d'un tapis cellulaire de cellules A549 (Figure 17, bas) et LLC-MK2 (photos non présentées) 40 heures après l'incubation avec les nano-NX2-Cy5Cl et nano-NX2-FICl ne permet pas de distinguer de différence morphologique significative avec les cellules non incubées (Figure 17, bas).

5.3.2 *Conservation des nanoparticules nano-NX2-Cy5 dans les cellules*

Afin d'utiliser le test de fusion cellulaire pendant une infection, nous avons vérifié la capacité d'induction de syncytiums en présence de nano-NX2-Cy5Cl.

Des cellules LLC-MK2, incubées avec les nanoparticules, ont été infectées par hPIV-2 (MOI=1). 24 heures après la transfection, le tapis cellulaire a été fixé. Nous avons pu observer la présence de grosses cellules multinucléées dans les puits infectés, comparé à ceux non infectés (Figure 18). Les tapis cellulaires incubés avec les nanoparticules présentent également de telles structures de fusion. Ces résultats nous indiquent que la formation de syncytiums semble compatible avec les nanoparticules.

De plus, les nanoparticules sont retrouvées dans toutes les cellules, 48 heures après l'incubation (Figure 18). Nous avons ainsi conclu que les nanoparticules pouvaient être un outil intéressant pour l'observation et l'évaluation de la fusion cellulaire, y compris en condition d'infection.

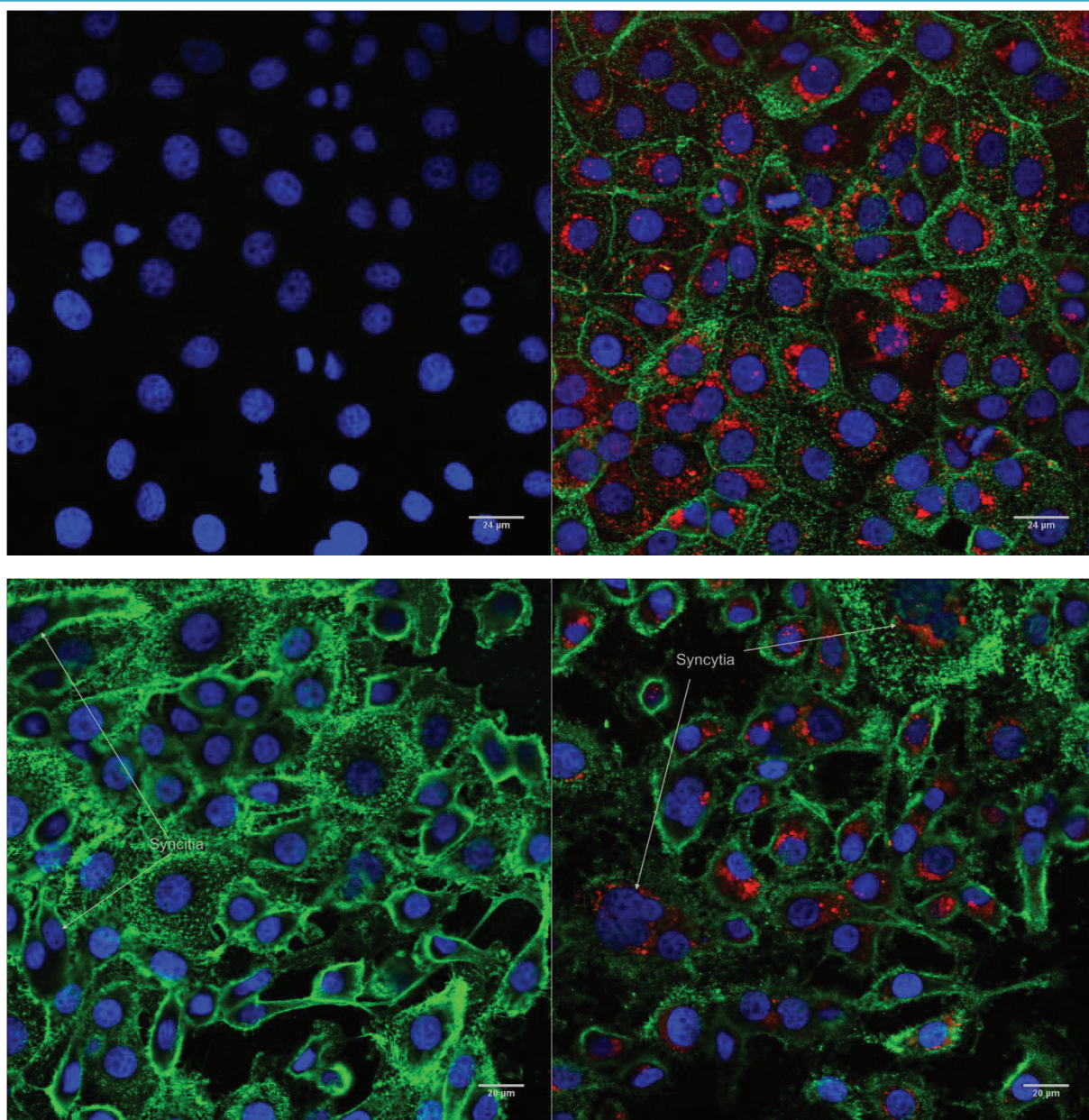


Figure 18 : Formation de syncytiums après l'intégration de nano-NX2-Cy5Cl de cellules LLC-MK2 infectées par hPIV-2

Haut | Cellules LLC-MK2 non infectées marquées au DAPI (bleu) (gauche), et marquées avec des nanoparticules puis DAPI et WGA (vert) (droite). **Bas** | Cellules LLC-MK2 infectée avec MOI-1 hPIV-2 marquées au DAPI (gauche), et marquées avec des nanoparticules (rouge), avant infection par hPIV-2, puis DAPI et WGA (droite).

5.3.3 Nanoparticules nano-NX2-Cy5 et nano-NX2-FICl dans les cellules LLC-MK2

Dans une étape suivante, nous avons cherché à déterminer si les nanoparticules pouvaient être transférées à des cellules environnantes, par exemple par contact et échange ne faisant pas intervenir de fusion membranaire. Nous avons donc incubé séparément des cellules LLC-MK2 avec les nano-NX2-Cy5Cl (rouge) et les nano-NX2-FICl (vert), puis effectué une co-culture des deux populations cellulaires (Figure 19). Nous avons constaté que le signal était très satisfaisant au bout de 24 heures pour les nanoparticules nano-NX2-FICl. Par contre les nano-NX2-Cy5Cl étaient moins stables et avaient tendance à créer des artefacts au fond des plaques de culture (Figure 19). Néanmoins, nous avons constaté qu'aucune cellule ne contenait

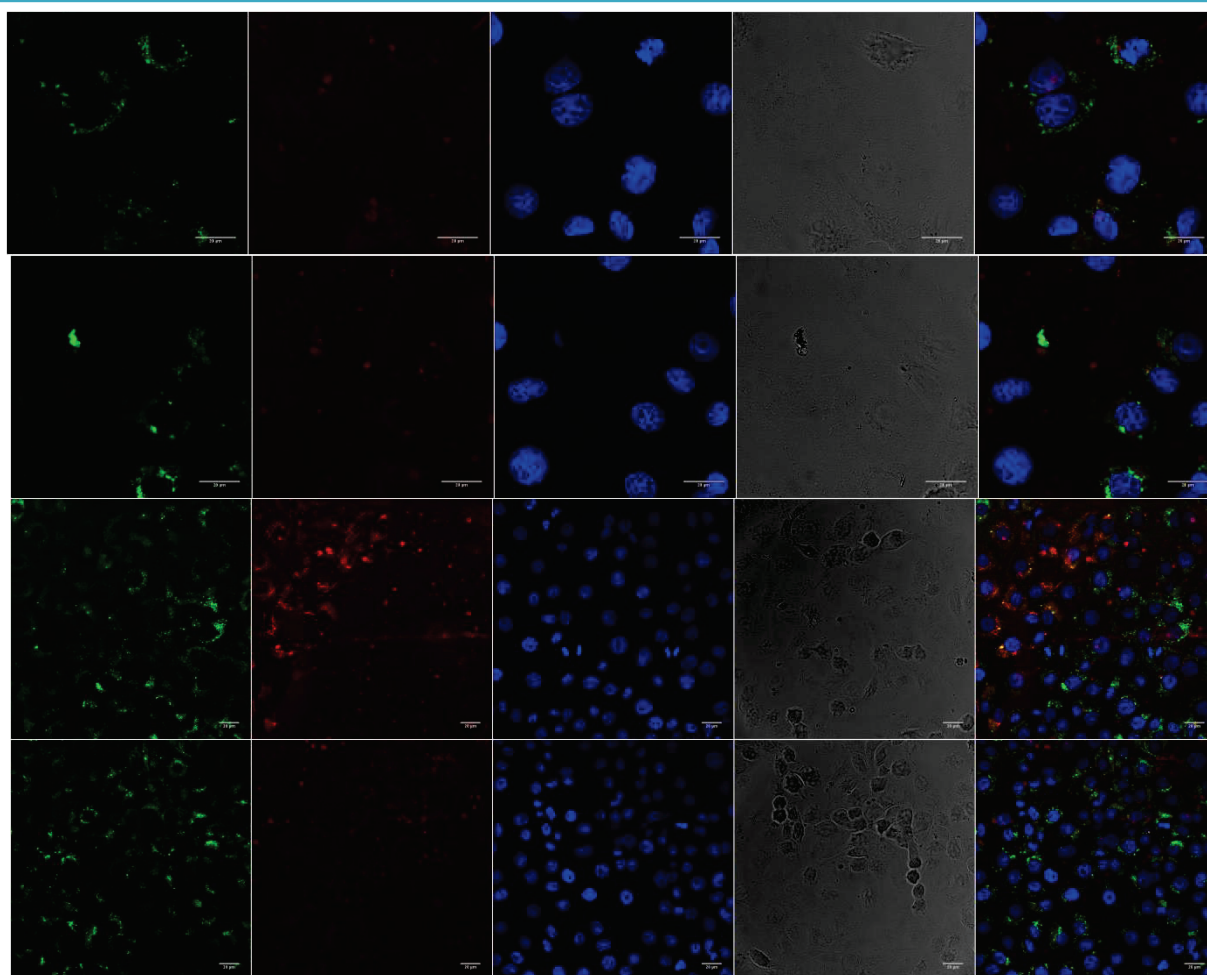


Figure 19 : Conservation des nanoparticules au sein des cellules

Comparaison de cellules LLC-MK2 non infectées et traitées au DAPI, 2mM de nano-NX2-Cy5Cl (rouges) et 2mM de nano-NX2-FICl (vertes) observées au microscope confocal. Les cellules ont été mélangées dans un eppendorf avant d'être mise en coculture.

de nanoparticules de chaque type, ce qui semblait indiquer l'absence de transfert des nanoparticules entre cellules.

Enfin, nous avons évalué la formation de syncytiums dans un contexte d'infection virale d'une co-culture de deux populations de cellules LLC-MK2, contenant chacune soit des nano-NX2-Cy5Cl, soit des nano-NX2-FICl (Figure 20).

Comme attendu, de petites structures syncytiales ont pu être observées et plusieurs d'entre elles comportaient les deux types de nanoparticules (Figure 20). Il est important de noter que ce double marquage avec des nanoparticules, nous permet de visualiser de très petites

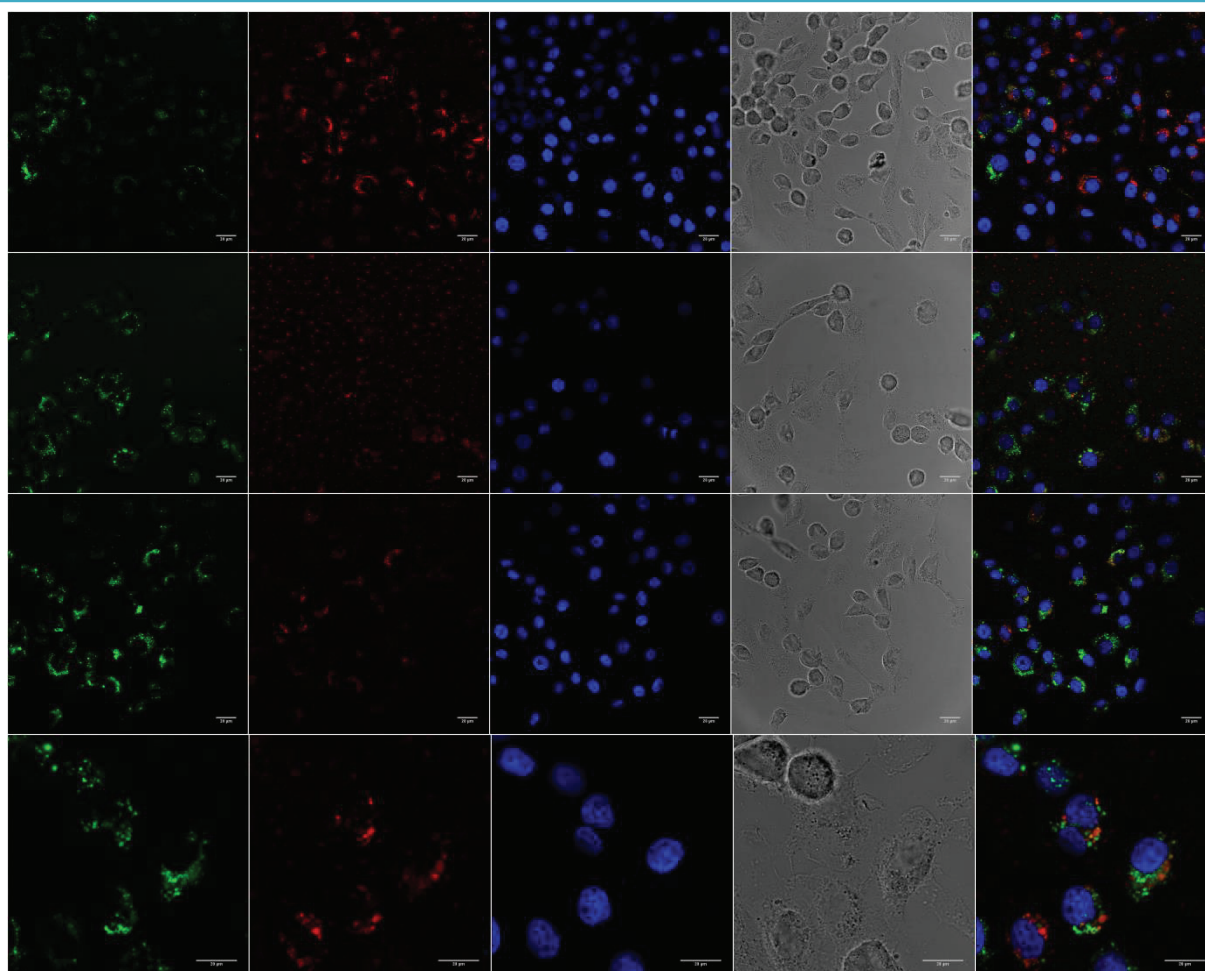


Figure 20 : Observation de syncytiums de cellules LLC-MK2 portant des nanoparticules après infection par hPIV-2

Comparaison de cellules LLC-MK2 infectées et traitées au DAPI, 2mM de nanoparticules rouges et 2mM de nanoparticules vertes observées au microscope confocal. Les cellules ont été mélangées dans un eppendorf avant d'être mise en coculture. La dernière prise de vue est un détail de la prise de vue N°3.

structures syncytiales (2 ou 3 noyaux), qui ne sont pas discriminables en imagerie classique (immunomarquage).

Cette étude pilote révèle ainsi la finesse de la méthode, qu'il reste cependant à optimiser. L'importance d'une répartition homogène des cellules marquées avec chaque type de nanoparticules est notamment un paramètre déterminant. La robustesse des nanoparticules marquées est également un prérequis.

5.4 Exploitation automatisée des résultats

Afin de pouvoir quantifier la fusion membranaire sur la base du co-marquage des syncytiums par les nanoparticules, des images de différents plans par puits ont été effectuées au microscope confocal. Nous avons créé un script avec le logiciel imageJ, afin de pouvoir obtenir une mesure brute révélatrice de la fusion cellulaire induite (Figure 21). Deux images d'un même plan, localisant les nano-NX2-Cy5Cl (rouge) et les nano-NX2-FICl (vert), sont ainsi

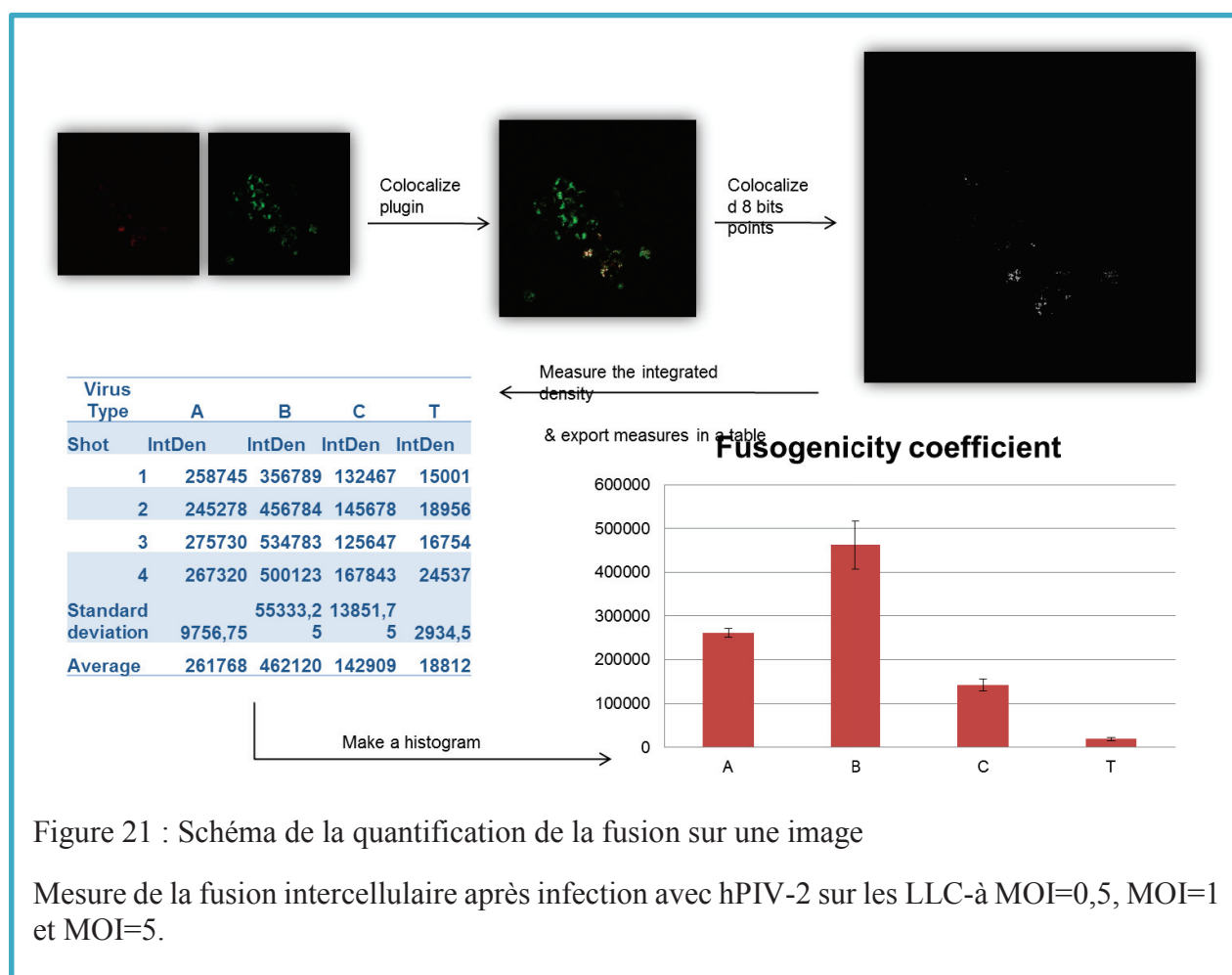


Figure 21 : Schéma de la quantification de la fusion sur une image

Mesure de la fusion intercellulaire après infection avec hPIV-2 sur les LLC-à MOI=0,5, MOI=1 et MOI=5.

alignées. Puis, l'ensemble des points de chaque plan se retrouvant dans les 2 images est extrait. La densité de points lumineux colocalisés est enfin calculée (Figure 21).

Le calcul de fusion membranaire (coefficient de fusogénicité) donne des résultats qui sont en accord avec les observations morphologiques des tapis cellulaires, avec la détection d'une plus grande quantité de syncytiums après l'infection à hPIV-2. Cependant, il est à noter que les cellules infectées à MOI=5 étaient pour beaucoup détachées et donc non exploitables. Ce paramètre d'infection est également à prendre en considération pour l'optimisation de notre méthode.

Les résultats présentés n'ont été obtenus qu'à partir d'un seul plan optique et ne sont donc pas représentatifs. Il est donc nécessaire de capturer la totalité des plans optiques et ceci dans plusieurs puits de culture cellulaire, afin d'être d'obtenir des résultats statistiques robustes. Ce cahier des charges nécessiterait le développement d'une plateforme automatisée.

5.5 Conclusion

La quantification de la fusion intercellulaire est une approche analytique incontournable dans l'évaluation de la fusogénicité des protéines F et plus largement des virus fusogènes. Les techniques disponibles sont le plus souvent qualitatives ou semi-quantitatives, comme l'observation du nombre de syncytiums et/ou le calcul de leur aire. Nous avons pu observer dans cette étude que « l'agglutination » de quelques noyaux marqués par le DAPI, était en fait la résultante de véritables syncytiums. Les méthodes les plus évoluées font appel à un gène rapporteur, sous le contrôle d'un promoteur. L'activation de ce promoteur est permise par un second groupe de cellules, ou un virus, exprimant un activateur du promoteur permettant l'expression du gène rapporteur. Cette méthode a comme inconvénient 1) la fragilité des cellules dans le cadre de la transfection préalable d'un grand nombre de plasmides et/ou 2) une faible flexibilité quant au choix des lignées cellulaires ayant une expression constitutive du gène activateur ou rapporteur et/ou 3) l'utilisation d'un vecteur apportant le gène d'intérêt, ce qui requiert une infection supplémentaire du système et perturbe le comportement cellulaire.

Nous avons démontré dans cette étude pilote que des nanoparticules d'oxyde de gadolinium équipées d'un manteau de silice fluorophore peuvent être utilisées efficacement pour quantifier la fusion membranaire. Elles présentent en effet l'avantage de (i) ne pas induire la

mort cellulaire, (ii) ne pas être relarguées à l'extérieur du cytoplasme et (iii) d'être compatibles avec une infection virale.

Cependant la limite principale de l'utilisation de ces nanoparticules est le coût et la difficulté de mise en œuvre de la technique. Le coût des nanoparticules est non négligeable, mais à cela s'ajoute l'utilisation d'une plateforme de microscopie confocale automatisée, là où les autres techniques ne demandent qu'un microscope à fluorescence ou un lecteur d'absorbance. Cette technique avait été considérée en alternative au test basé sur un rapporteur luciférase sous le contrôle du 3'LTR de HIV-1. Cependant, son coût relativement élevé, la nécessité d'un développement important et d'une plateforme automatisée, m'ont incité à favoriser le test de fusion cellulaire en co-culture, qui s'est avéré, après mise au point du protocole, compatible avec l'étude de la F hMPV.

Néanmoins, les perspectives et travaux futurs proposés dans cette thèse incluent l'évaluation de la fusion cellulaire produite par l'infection par un virus *wt* ou recombinant. Dans ce cas, cette technique qui présente l'avantage de ne pas perturber l'infection est prometteuse et pourrait avantageusement compléter les techniques actuelles existantes.

6 Revue : les développements récents des vaccins recombinants paramyxovirus atténués

6.1 Introduction

J'ai eu l'opportunité au cours de cette thèse de rédiger un article de revue sur le développement de nouveaux vaccins vivants atténués basés sur des paramyxovirus.

Comme présenté dans le chapitre 4 de cette thèse (page 42), il n'y a aucun vaccin disponible aujourd'hui contre les paramyxovirus impliqués dans les maladies respiratoires (PIV, hRSV, hMPV). Nous avons donc passé en revue un ensemble de candidats vaccins dont l'atténuation reposait sur (i) des mutations induites dans des gènes affectant la réplication, (ii) la délétion de gènes ou (iii) l'utilisation de virus animaux, tels que bPIV-3 ou SeV.

Nous avons ainsi proposé un balayage assez exhaustif des stratégies vaccinales et des essais cliniques en cours sur ce type de vaccins.

Cet article de revue a été publié dans le journal international à comité de lecture en langue anglaise **Reviews in Medical Virology**.

Le Bayon, J. C., B. Lina, M. Rosa-Calatrava and G. Boivin (2013). "Recent developments with live-attenuated recombinant paramyxovirus vaccines." Rev Med Virol **23**(1): 15-34.

6.2 Article de revue

R E V I E W



Recent developments with live-attenuated recombinant paramyxovirus vaccines

Jean-Christophe Le Bayon^{1,2}, Bruno Lina^{1,3}, Manuel Rosa-Calatrava^{1**} and Guy Boivin^{2*}

¹Laboratoire de Virologie et Pathologie Humaine, VirPath EMR 4610/Equipe VirCell, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1 – Hospices Civils de Lyon, Faculté de médecine RTH Laennec, Lyon, France

²Research Center in Infectious Diseases, CHUQ-CHUL and Université Laval, Québec City, QC, Canada

³Laboratoire de Virologie, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon, Lyon, Bron Cedex, France

SUMMARY

There is no vaccine currently approved for paramyxovirus-induced respiratory diseases in humans, despite their major clinical importance. We review the development and evaluation of new vaccine strategies based on live-attenuated chimeric and recombinant vaccines against human respiratory syncytial virus, human metapneumovirus and human parainfluenza viruses types 1 to 3, which are significant causes of upper and lower tract respiratory diseases. Most promising strategies are based on virus attenuation through (i) mutations in key genes involved in replication; (ii) deletion of accessory genes; or (iii) the use of a corresponding animal viral vector, such as bovine parainfluenza type 3 and Sendai virus, as a background for the expression of a viral glycoprotein. Indeed, the fusion (F), or attachment (HN/H/G) glycoproteins are the most immunogenic antigens in paramyxoviruses. For each strategy, we will review the immunogenicity (increase in neutralising antibody titres) and the protection conferred by the most promising recombinant vectored vaccines and list ongoing clinical trials. We will conclude by discussing the most important challenges regarding the introduction of such vaccines into immunisation programmes. Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

Received: 21 December 2011; Revised: 14 March 2012; Accepted: 22 March 2012

PARAMYXOVIRUSES

Classification and virological features

Belonging to the order *Mononegavirales*, the *Paramyxoviridae* family comprises a large panel of pathogenic viruses of humans and animals causing

a significant impact on public health and the economy. Within this family, several viruses are responsible for respiratory diseases in humans, with severe lower respiratory tract infections more commonly seen in young children, the elderly or immunocompromised patients [1–3].

*Correspondence to: G. Boivin, CHUQ (CHUL), Room RC-709, 2705 Laurier Blvd, Québec City (QC), G1V 4G2 Canada.

E-mail: guy.boivin@crchul.ulaval.ca

**Correspondence to: M. Rosa-Calatrava, Virpath EMR4610/équipe VirCell, Faculté de médecine RTH Laennec, Bat B 2ème étage, 9-11 rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon CEDEX 08.

E-mail: manuel.rosa-calatrava@univ-lyon1.fr

Abbreviations used in text

AGM, African green monkey; aMPV, avian metapneumovirus; att, attenuated; bPIV-3, bovine parainfluenza type 3; bRSV, bovine respiratory syncytial virus; C, C protein; CDV, canine distemper virus; CR, cotton rat; CS, cleavage site; F, fusion glycoprotein; FDA, food and drug administration; FI-hRSV, formalin-inactivated alum-precipitated hRSV; FP, fusion peptide; G, binding glycoprotein; H, hemagglutinin binding glycoprotein; HeV, Hendra virus; hMPV, human metapneumovirus; HN, hemagglutinin neuraminidase binding glycoprotein; hPIV-1, human parainfluenza type 1; hPIV-2, human parainfluenza type 2; hPIV-3, human parainfluenza type 3; hPIV-4, human parainfluenza type 4; hPIVs, human parainfluenza viruses; HRA, heptad repeat A domain; HRB, heptad repeat B domain; hRSV, human respiratory syncytial virus; L, large polymerase; LRT, lower respiratory tract; M, matrix protein; M2-1, M2-1 protein; M2-2, M2-2 protein; MeV, measles virus; MuV, mumps virus; N, nucleocapsid protein; NCT, ClinicalTrials.gov Identifier; NDV, Newcastle disease virus; NiV, Nipah virus; NS1, non-structural protein 1; NS2, non-structural protein 2; P, phosphoprotein; PIV-5, parainfluenza type 5; RIG-1, retinoic acid-inducible gene 1 protein; RM, rhesus monkey; RdRp, RNA-dependent RNA polymerase; SeV, Sendai virus; SH, small hydrophobic glycoprotein; SP, signal peptide; TM, transmembrane domain; URT, upper respiratory tract; VLP, virus-like particle; WT, wild-type.

Phylogenetic analyses distinguish two viral sub-families (Figure 1). The *Pneumovirinae* subfamily includes the human respiratory syncytial virus (hRSV) and the human metapneumovirus (hMPV), which belong to two separate genera, that is, *Pneumovirus* and *Metapneumovirus*, respectively. The second subfamily, the *Paramyxovirinae*, is larger, and this review will focus on parainfluenza viruses (hPIVs), which are responsible for major respiratory diseases. HPIVs types 1 and 3 belong to the *Respirovirus* genus whereas hPIV-2 and hPIV-4 belong to the *Rubulavirus* genus.

Paramyxoviruses contain a non-segmented single-stranded RNA genome of negative polarity, and they replicate entirely in the cytoplasm. Their genomes vary from 15 Kb to 19 Kb in length and encode from eight (hPIV-1, hPIV-2 and hPIV-4) to twelve (Sendai virus (SeV)) viral proteins. There are six proteins common to all paramyxoviruses, including two glycoproteins involved in viral entry: the attachment glycoprotein variably called HN, H or G among the different species, and the fusion (F) protein. The matrix (M) protein coats the internal part of the viral envelope and plays an important role in viral assembly and budding. Three proteins are also associated

in a helicoidal complex with the RNA genome: the nucleocapsid (N), the phosphoprotein (P) and the large polymerase (L) proteins. This complex, together with M2 proteins for *Pneumovirinae*, is called the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) (Figure 2) [1].

Other proteins are specific for certain paramyxoviruses. In addition to the two major glycoproteins, the small-hydrophobic (SH) protein is present on the envelope of hMPV and hRSV and also exists in some *Rubulaviruses* such as parainfluenza type 5 (PIV-5) and mumps virus (MuV). The role of the SH protein is not well understood, and its deletion does not drastically affect viral replication *in vitro* or *in vivo* [4–7]. It appears, however, that the lack of SH expression in PIV-5 and MuV promotes cell apoptosis during infection [8,9].

Cellular entry of paramyxoviruses occurs in two steps. Following the virion anchorage at the cell surface, a pH-independent fusion occurs between the viral envelope and the cellular membrane. This process is mediated by the envelope glycoproteins. On the other hand, it appears that some hMPV strains may need a low-pH to induce fusion via an unknown mechanism [10,11].



Figure 1. Phylogenetic tree of representative members of the *Paramyxoviridae* family. The *Paramyxovirinae* sub-family includes human parainfluenza virus type 2 (hPIV-2), parainfluenza virus type 5 (PIV-5), mumps virus (MuV), human parainfluenza virus type 4 (hPIV-4), Newcastle disease virus (NDV), Sendai virus (SeV), human parainfluenza type 1 (hPIV-1), human parainfluenza type 2 (hPIV-3), bovine parainfluenza type 3 (bPIV-3), Nipah Virus (NiV), Hendra virus (HeV), canine distemper virus (CDV) and measles virus (MeV); the *Pneumovirinae* sub-family includes avian metapneumovirus (aMPV), human metapneumovirus (hMPV), bovine respiratory syncytial virus (bRSV) and human respiratory syncytial virus (hRSV). Genetic analysis was based on F protein sequence from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) using Geneious v5.5 software. The scale represents the number of amino acid substitutions per site

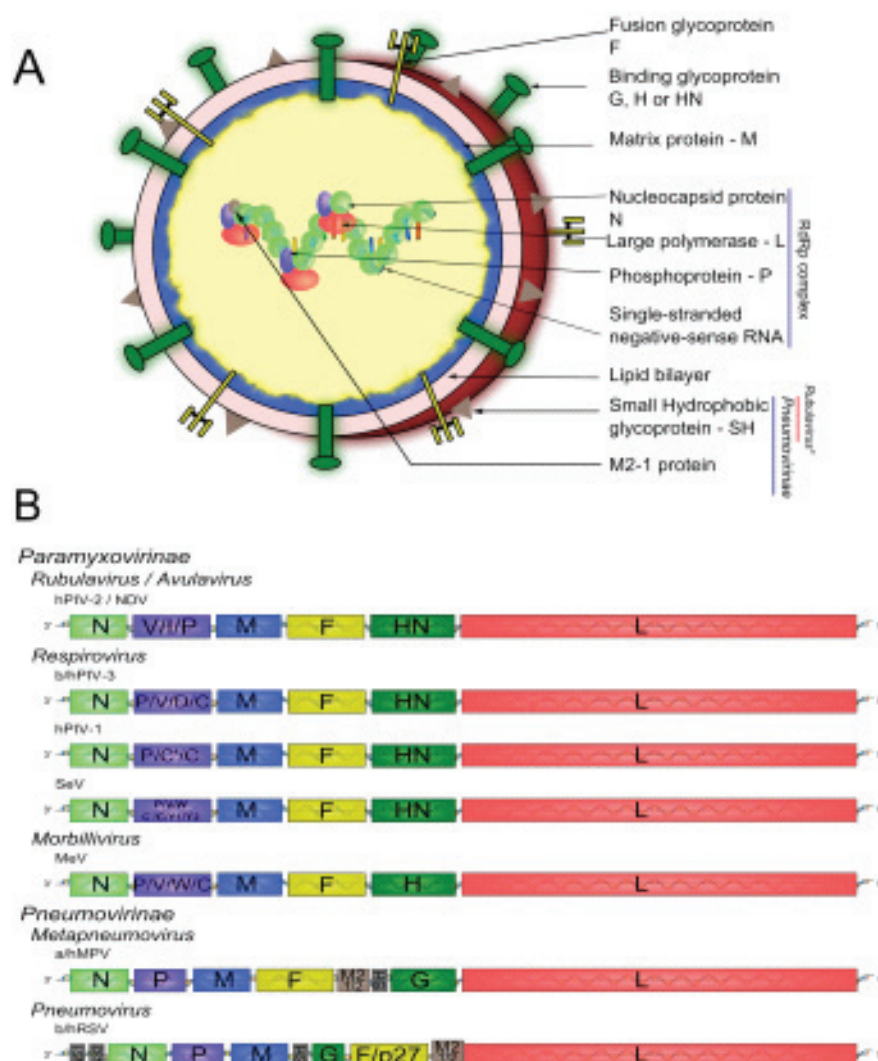


Figure 2. Molecular composition of paramyxoviruses A Schematic representation of a paramyxovirus virion.* The SH protein is present in members of the *Pneumovirinae* and some *Rubulaviruses* (such as PIV-5 and MuV). B Schematic representation of the genomic organisation of selected paramyxoviruses. In *Paramyxovirinae* members, accessory proteins V, I, D, C, W, Y1 or Y2 are translated from ORFs and mRNA editing of the *P* gene. Some proteins are specific to *Pneumovirinae* members such as M2-1 or M2-2, and more specifically to *Pneumoviruses*, such as the non-structural proteins 1 and 2 (NS1 and NS2). Not to scale

For hPIVs, the HN protein first binds to sialoconjugated cell surface receptors and, subsequently, the F protein promotes membrane fusion. The cellular receptors of hMPV and hRSV have not been completely determined. It appears that glycosaminoglycans, such as heparan sulphate and nucleolin, play an important role in hRSV entry [12]. Additionally, it must be noted that the $\alpha v \beta 1$ integrin and heparan sulphate were recently identified as receptors for hMPV [13,14]. In fact, the F protein of *Pneumoviruses* seems to be involved in both

attachment and fusion processes as hRSV and hMPV recombinant strains without G are able to efficiently infect and replicate within cells *in vitro* [15] and also *in vivo* [13].

Similarly, to other class I viral proteins [16], the F protein is synthesised as a precursor (F0) that must be proteolytically cleaved at polybasic residues to generate a biologically active form as disulfide-linked F1 and F2 polypeptides. For hRSV, there are two cleavage sites, which release an additional p27 peptide (Figure 3) [17]. The F1 polypeptide form

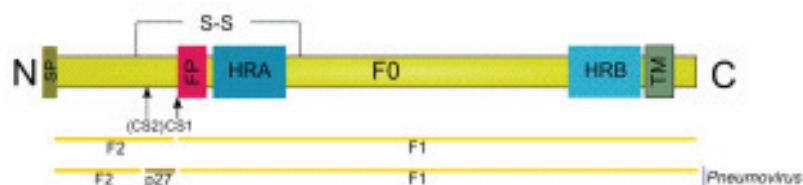


Figure 3. Schematic representation of the paramyxovirus fusion (F) protein. Upon activation, the F0 precursor is cleaved into two subunits F1 and F2 at the cleavage site 1 (CS1) linked by a disulfide bridge (S-S), just before the fusion peptide domain (FP). For *Pneumoviruses*, a second cleavage site (CS2) releases the p27 protein. HRA, Heptad repeat A domain; HRB, Heptad repeat B domain; TM, transmembrane domain; N, N-terminal exoplasmic end; C, C-terminal cytoplasmic end; SP, signal peptide. Not to scale

has an exposed fusion peptide, whose function is to be inserted into the target membrane [18]. This trans-membrane glycoprotein is expressed on the viral surface as a homotrimer, with the C-terminal domain inside the virus particle. For hPIVs, HN is thought to be implicated in the functional activation of the F protein [19], possibly by direct interactions [20]. Previous work on hPIV-2, PIV-5 and on the Newcastle disease virus (NDV), a paramyxovirus causing diseases in poultry and related to hPIV-2, revealed some of the peptidic domains involved in F/HN interactions, but the nature of implicated residues remains to be elucidated. The F2 subunit is part of both the pre-fusion and post-fusion F trimers, but its specific role remains to be identified [16,21–25]. The activated form of the trimeric F protein undergoes a series of conformational changes leading to the merge of the two lipid membranes [16]. This folding is achieved by the formation of a highly stable six-helix bundle comprising a trimeric coiled-coil structure in which three HR-A domains can bind three HR-B domains in antiparallel orientation. This conformational structure constitutes the final post-fusion form of the F protein [18].

After the fusion of viral and cellular membranes, the nucleic acid is released into the cytoplasm where the negative-sense RNA is directly transcribed by its own viral RdRp complex (Figure 4). Transcription begins linearly from a single point (nucleotide) at the 3' extremity of the RNA genome and stops at the end of each gene to induce polyadenylation of neosynthesised mRNA. This process is called stop-start transcription and is dependent on the efficiency of the downstream gene regulation instruction. There is a gradient of transcription from the genes at the 3' extremity, which are the most abundantly transcribed, because of less efficient RdRp re-initiation after each gene. The M2 gene, present in the *Pneumovirinae*, codes for two

overlapping ORFs. M2-1 is an essential transcriptional elongation factor [26] whereas M2-2 accumulation seems to have a role in the switch between transcription and replication of the viral genome [27,28]. Early in the replication process, a leader positive-sense RNA transcript is also produced. A signal, which may be directed by the accumulation of N protein into the cytoplasm and also by M2-2 concentration for *Pneumoviruses*, switches the polymerase activity to replication with the synthesis of an intermediate positive RNA strand. The last step of the infectious cycle consists of viral assembly of the neosynthesised genome and proteins into virions during the budding process at the surface of the cellular membrane.

NS1 and NS2 are non-structural proteins encoded by the hRSV genome. They appear to modulate the cellular immune response to hRSV as NS1 and NS2 have been found to be suppressors of type I and type III interferon induction [29,30] and cytotoxic T-cell responses [31].

Epidemiology and clinical manifestations

Human respiratory syncytial virus, hMPV and hPIVs are major contributors to acute respiratory tract infections in children younger than 5 years of age. Most of the children are infected by these pathogens in young age although only a small subset requires hospitalisation. Hospitalisation rates have been reported to be 26/1000 in children <1 year old for hRSV in the USA between 1996–2006 with no significant difference between study years [32] compared with 4.9 and 6.1/1000 for hMPV in children <6 month old in the USA and Spain, respectively [33,34]. For hPIV-3, hospitalisation rates vary greatly on a yearly basis, from 1.6/1000 in children <6 months old [33] up to 12.2/1000 in children between 1 and 2 years of age [35].

Mortality attributable to these viruses is rare in developed countries and mainly occurs in premature

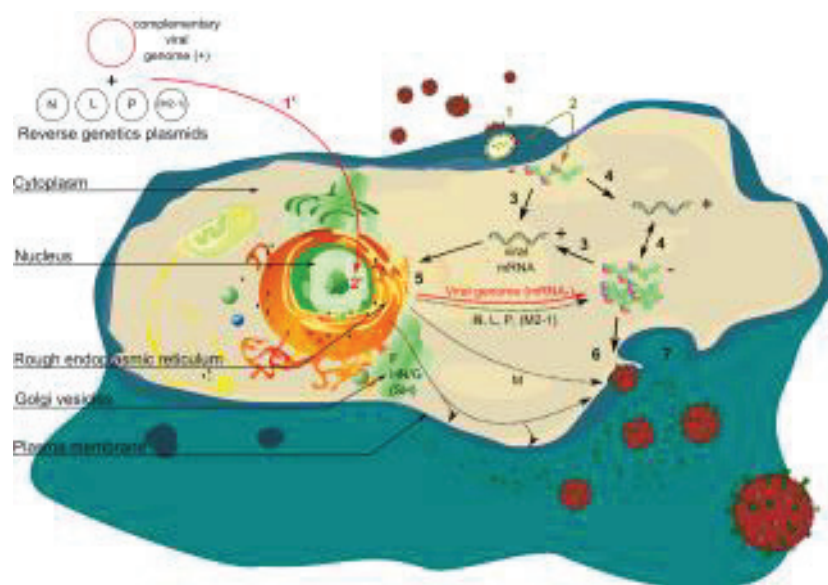


Figure 4. Replication cycle of paramyxoviruses and reverse genetics system. After binding of glycoproteins to cell receptors (1), the F protein leads to the fusion of virus envelope and host cell membrane, releasing the viral genomic nucleocapsid (negative-stranded RNA) into the cytoplasm (2). Transcription to positive mRNA of the viral genes is ensured by the RdRp complex (including M2-1 for *Pneumovirinae*) (3). Replication of the genome, via the creation of a positive RNA genome template is also ensured by the RdRp (4). After translation (5), F and G proteins (and SH for *Pneumovirinae* and some *Rubulaviruses*) go through the Golgi apparatus to be expressed on the cell membrane surface. The newly formed nucleocapsid and the M protein are assembled at the inner membrane (6) and bud to form the viral progeny (7). Reverse genetics systems [5]. The complementary viral genome (positive-stranded) under the control of an adequate promoter is transfected into the nucleus (1') with plasmids coding for RdRp complex proteins (N, L, P – and M2-1 for *Pneumovirinae*). The negative stranded viral genome is released into the cytoplasm and complexed with RdRp (2'), and then the replication process follows the steps of a natural infection

children and in those with serious cardio-pulmonary underlying diseases or immuno-suppression [36]. In temperate countries, most of these viruses circulate during the typical winter and spring flu seasons with the exception of hPIV-3, which can circulate year long. One distinction between hPIVs, hMPV and hRSV is the peak age for bronchiolitis in hospitalised children, which varies significantly by virus (mean age of 10.6 months, 7 months and 2.5 months, respectively) [37,38]. HPIV-1 and hPIV-2 infections are often associated with severe croup involving the larynx and the upper trachea [39], whereas hRSV, hMPV and hPIV-3 are more often associated with bronchiolitis, bronchitis and pneumonia [40,41].

There are several risk factors for these paramyxovirus infections, and they have been particularly well described in the case of hRSV. For instance, the presence of underlying medical illnesses such as cardiac and chronic lung diseases as well as Down's syndrome significantly increases hRSV

mortality rates [42]. Prematurity is another well-known risk factor for developing respiratory complications. Also, male infants appear to have a two-fold greater risk for bronchiolitis. Finally, infants who have not been breast-fed tend to develop more frequent lower respiratory tract diseases [43]. It was calculated that the attributable cost for hRSV hospitalisation in the USA was \$4517 for premature babies compared with \$2135 for full-term infants <12 months old [44].

Adults and older children are commonly reinfected by paramyxoviruses because the natural infection does not induce lifelong immunological protection [40,45,46]. Reinfections are commonly benign, producing upper respiratory tract symptoms, but they may have an important role in the dissemination of the viruses. However, the elderly population is particularly prone to severe reinfections. Using a mathematical model, it has been shown that, between 1990 and 1998, only 346 US

patients <4 years old died of hRSV disease on an annual basis compared with 12 548 deaths in adults >50 years old [47]. Such high numbers are equivalent to the crude mortality reported during some mild influenza epidemics [35].

The major mode of dissemination of respiratory paramyxoviruses appears to be by large droplets [48]. Transmission may require close contact with infected individuals, but can also occur through contact with fomites. The mean incubation period is estimated to be between 3 and 7 days for hRSV, 4 and 6 days for hMPV and 2 and 6 days for hPIVs [49].

Immune response during natural infection

An early innate response is mediated through the detection of viral components by pattern recognition receptors such as toll-like receptors (TLR)-3, TLR-4 or retinoic acid-inducible gene 1 protein (RIG-1) [50] in the respiratory epithelium, which promotes the nuclear factor-kappa B (NF- κ B) signalling pathway. This pathway leads to cytokine and chemokine production and to the recruitment of neutrophils, eosinophils, NK and CD4⁺ T cells into infected lungs. The early immune response to hRSV infection including the local cytokine response has been recently reviewed elsewhere [51]. Notably, hMPV infection results in different levels of inflammatory cytokines and activation of innate immune response than hRSV [52].

The most immunogenic viral components are the F, HN/G and SH proteins. For hMPV, it has been shown that only F protein induces high levels of antibodies whereas G and SH are weakly immunogenic [53]. It has also been shown that lasting immunity is provided by F and HN neutralising antibodies for hPIVs [54]. Although the levels of antibodies correlate with subsequent protection, specific T cell-induced immunity appears critical to clear paramyxovirus infections. A Th1-biased cellular response is generally induced by hRSV infection in humans [55,56]

Current therapeutic and prophylactic modalities

Ribavirin is a nucleoside analogue with broad spectrum activity against many viruses including paramyxoviruses. However, its toxicity and its association with teratogenicity in rodent models as well as questionable cost-effectiveness have restricted its use to the treatment of severe hRSV

disease in premature or transplant patients [57]. The drug is also active *in vitro* against hMPV and hPIVs but, in the absence of results from randomised clinical trials, its use should be limited to severe infections in immunocompromised patients [58–61].

In 1998, the Food and Drug Administration (FDA) authorised the first humanised mAb targeting the F protein of hRSV [62] under the name of palivizumab (SynagisTM, MedImmune). Palivizumab has been shown to reduce hRSV hospitalisations by 45%–55% in high risk children [63–65], but not the duration of hospitalisation. Monthly administrations of this monoclonal antibody during the hRSV season are recommended based on the risk factors mentioned previously. Optimal indications, however, based on cost-effectiveness considerations have not been completely defined [57,66]. Future directions in treatment and prevention of hRSV infections likely include (i) second-generation monoclonal antibodies; (ii) potent antiviral compounds; and (iii) selected anti-inflammatory agents. Motavizumab (Numax, MedImmune) is a derivative of palivizumab with greater affinity for the F protein [67]. Although clinical trials have shown increased efficacy in preventing paediatric hospitalisations compared with palivizumab [68,69], its availability remains uncertain because the FDA advisory committee rejected its use as a prophylactic agent due to hypersensitivity reactions [70,71].

Similarly, mAbs targeting the hMPV F protein have shown excellent activities *in vitro* and in animal models but have not yet entered clinical trials [72,73].

Only ribavirin and immunoglobulins have been used in humans to treat severe hPIVs, hRSV and hMPV infections, emphasising the need to further investigate other prophylactic and therapeutic strategies. Among the latter, we note the pre-clinical activity of fusion inhibitors [74,75] and small interfering RNA molecules [76,77].

NON-RECOMBINANT VIRAL VACCINES

An ideal vaccine should induce a very good, long-term protection against infection while also meeting safety requirements. Several conventional vaccine strategies against paramyxoviruses causing respiratory diseases have been investigated, including inactivated, live-attenuated and subunit vaccines. These vaccines can also be administered intra-nasally to better mimic the natural route of infection.

Inactivated vaccines

Inactivated vaccines consist of complete viral particles usually inactivated by formalin or heating. The main advantages of this type of vaccines, which are commonly used for influenza mass immunisation, consist of their good stability, ease of production and biological safety because of the absence of viral replication.

In the late 1960s, a formalin-inactivated alum-precipitated hRSV (FI-hRSV) vaccine was evaluated in clinical trials [78–80]. Unexpectedly, vaccinated children exhibited enhanced morbidity upon infection. Kim and collaborators reported that 80% of the vaccinated children developed an acute respiratory disease following natural hRSV infection and had to be hospitalised, as compared with 5% of children who received a control vaccine [80].

A Th2-biased T cell-memory response, induced after FI-hRSV vaccination, resulted in an excessive eosinophil recruitment and likely caused lung injury [81]. One hypothesis is that this paradoxical effect was due to formaldehyde hypersensitivity [82]. Recent work, however, demonstrated that poor toll-like receptor activation resulted in lack of antibody maturation with very weak recognition of hRSV epitopes when a natural infection occurred [83]. This enhanced disease following immunisation was also observed in different animal models of hPIV-3 [84] and hMPV [85–87] infection. For all these reasons, research on inactivated paramyxovirus vaccines has been abandoned for now, at least in the context of seronegative individuals.

Live-attenuated vaccines (non-recombinant vaccines)

These vaccines were traditionally generated by several passages of viral seeds in cells and/or allantoic systems. The theoretical advantage of such vaccines is to induce a better immune response with regard to inactivated viruses, because the seed is actively replicating and thus mimics the natural infection but without disease development. Conversely, there is a risk of *in vivo* reversion and recovery of viral pathogenicity. Thus, such vaccines cannot be used in pregnant women and immunocompromised individuals.

Despite availability of live-attenuated vaccines for some paramyxoviruses – for example, measles, mumps and NDV [88–93] – none are licenced against hPIVs, hRSV or hMPV.

Some live-attenuated hRSV and hPIVs vaccines have been evaluated in clinical trials: cpRSV (cpts-248/404) and hPIV3 cp45 vaccines. Although hPIV3 cp45 seems to be well-tolerated and immunogenic [94], cpRSV caused some side effects and seems to be insufficiently attenuated [95]. Phase I clinical trials for hPIV3 cp45 are currently in progress (NCT01021397 and NCT01254175).

To reduce the risk of reversion and to increase immunogenicity of attenuated viral strains, additional mutations and/or gene deletions can be specifically introduced into the viral genome by reverse genetics. The resulting virus is called a recombinant virus and such vaccines will be discussed in depth in a subsequent section.

Subunit vaccines

A subunit vaccine is made from a full or partial viral protein. For a stable and sustained response, subunit vaccines frequently contain adjuvants. This type of vaccine is easy to produce and avoids the risks associated with the use of a live virus, and could be used also in pregnant women. Maternal immunisation against influenza was shown as a successful strategy to protect the infant, by inducing the transfer of maternal antibodies [96]. The most immunogenic protein among paramyxoviruses is mainly the F glycoprotein, although the attachment protein is also highly immunogenic for some viruses, such as MeV. Thus, most subunit vaccines tested so far have been based on the F protein (with or without other proteins such as HN/G). Many encouraging animal studies using hRSV, hMPV and hPIV-3 F proteins have been completed [97–101]. A phase I clinical trial, sponsored by Novavax, is currently evaluating a hRSV-F particle vaccine in healthy adults (NCT01290419) [102]. For hMPV, however, unadjuvanted F subunit vaccines were not associated with long-term protection in non-human primates [103].

Limits of current vaccines and future needs

Because of the disappointing results obtained with the inactivated FI-hRSV vaccine, research on respiratory paramyxovirus vaccines has been considerably hampered. Whereas subunit and live-attenuated vaccines are promising, they have some disadvantages related to short-term protection and safety. Another problem with paramyxoviruses (especially hRSV) is that the target population for vaccination consists of infants,

who have poor adaptive responses and possess interfering maternal antibodies [71].

Better and safer vaccines may be developed by different innovative approaches, such as (i) modifications of genomic and peptidic sequences of vaccines and (ii) carriage of the immunogenic protein of interest by a non-human viral vector vaccine. In the following section, we describe such recombinant and/or chimeric live-attenuated vaccines for hRSV, hMPV and hPIVs only focusing on paramyxovirus-based vectors.

RECOMBINANT VIRAL VACCINES (GENERALITIES)

Engineering the paramyxovirus genomes: recombinant and chimeric viral particles

The evolution of molecular biology technology now allows direct modifications of the viral genome. The paramyxovirus genome can accept up to 5 Kb of additional genomic sequences [104], as well as several deletions. Of note, some paramyxoviruses require a 6N length genome (rule of six) to replicate [105–108].

By using a set of plasmids transfected into permissive cells, replicative virions can be easily produced. Reverse genetics systems for paramyxoviruses are briefly described in Figure 4. In brief, the complete cDNA genome, along with plasmids coding for the RdRp complex, is transfected into permissive cells [5]. Inclusion of the viral genome into an amplifiable plasmid constitutes a prerequisite for directed genetic manipulations.

Paramyxovirus vectors

The main paramyxovirus vectors used so far have been based on animal or human respiroviruses such as SeV, bovine parainfluenza type 3 (bPIV-3) and hPIV-3; pneumoviruses and metapneumoviruses such as hRSV, hMPV and their avian alter-ego (bovine respiratory syncytial virus (bRSV) and avian metapneumovirus (aMPV)); rubulaviruses such as hPIV-2; avulaviruses such as NDV and morbilliviruses such as MeV. For all vectors, three objectives are pursued: (i) attenuation of the viral vaccine strain *in vivo*; (ii) protection conferred by vaccine against replication in the upper and lower respiratory tracts (URT/LRT); and (iii) efficient production of vaccine seeds.

The use of non-human vectors such as SeV, bPIV-3 and NDV seeks to avoid pre-existing immune responses against the vector, which would significantly decrease vaccine efficacy. These vectors are also considered attenuated for humans, as they can infect a human host, but cannot produce major diseases. Nevertheless, as they are host-restricted, the ability of these vectors to efficiently target and infect human cells has to be well evaluated.

Other human viral vectors need to be attenuated. This could be achieved through a *ts* mutation, obtained after several *in vitro* passages to adapt virus replication at a lower or higher temperature than the typical replication temperature needed for an effective human infection. One other way is to delete an accessory protein to *attenuate* (*att*) the virulence or to mutate an indispensable gene. This last option presents a risk of reversion to the wild-type (WT) genome, and several mutations are thus generally needed. Consequently, the genomic stability has to be closely verified for this type of vaccine.

All potential live-attenuated vaccines reviewed below have been administrated by the intranasal route (sometimes combined with intratracheal inoculation) to mimic the natural route of paramyxovirus infections.

VECTORED REPLICATION-COMPETENT HPIVS VACCINES (TABLE 1)

Live-attenuated recombinant hPIVs vaccines

The rHPIV1 84/del170/942 is a recombinant hPIV-1 vaccine candidate currently in phase I clinical trials. It carries (i) two mutations and one deletion within the C protein (R84G, Δ 168–169 and F170S), corresponding to one mutation and one deletion in the P protein (E87G and Δ 172–173) because of C and P overlapping ORFs; (ii) one *ts* mutation in the L protein (Y942A); and (iii) one mutation in HN [109–112]. The mutations and the C ^{Δ 168–169} deletion were chosen for enhancement of genetic stability, that is, to prevent the risk of reversion to the WT virus. The recombinant virus is able to replicate efficiently in cells and remains easy to produce for vaccine purposes. It also induces a good production of mucosal antibodies in the nasopharynx and trachea of African green monkeys (AGMs). The vaccine was found to be attenuated in AGM and conferred high levels of protection 28 days after virus challenge, with reduced mean

Table 1. Live-vectored hPIVs vaccines

Name	Target	Vector	Genome modification	Animal study model	Attenuation: reduction in viral titres ^a (log ₁₀)		Immunogenicity: increase in HAI Ab titres ^b (reciprocal log ₂)		Protection: reduction in viral titres ^c (log ₁₀)		Clinical trial	Relevant publications
					URT	LRT	28 days pv	URT	LRT			
rHPIV1 84/de1170/942	hPIV-1	hPIV-1	C: R84G – Δ168-169 F170S – P: E87G – Δ172-173 – L: Y942A – HN: T553A	AGM	3	3.3	u.d.l. (≤1)	2.8	2.1		Phase I NCT00641017	[111]
rV94(15C)/948L/Δ1724	hPIV-2	hPIV-2	T15C in 3' genomic promoter – L: Y948L Δ1724-1725	AGM	0.9	3.4	1.3–2.3	≥3.1	≥4.1		Phase I NCT01139437	[113]
rB/HPIV3	hPIV-3	bPIV-3	<i>F</i> and <i>HN</i> replaced by hPIV-3 counterparts	RM	1.6	0.8	4.8–6.8	2	3.5		Phase I NCT00366782	[121]
MEDI-534	hRSV hPIV-3	bPIV-3	hRSV <i>F</i> inserted between <i>N</i> and <i>P</i> – substitution of <i>F</i> and <i>HN</i> by hPIV-3 counterparts	RM [124] AGM [123] Hamster [125]	3	1	4.1–6.1 AGM	>3.2	>3.1		Phase I–II NCT00686075	[123–125]
rSeV-hPIVs F/HN	hPIVs (1, 2, 3)	SeV	hPIV <i>F</i> or <i>HN</i> between <i>F</i> and <i>HN</i> genes	CR	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	~3–4			[130]
NDV-BC/HN	hPIV-3	NDV	<i>HN</i> hPIV-3 inserted between <i>P</i> and <i>M</i> genes	AGM RM	n.r.	n.r.	6.8–8.8 (AGM) 6.6–8.6 (RM)	n.d.	n.d.			[135]

URT, upper respiratory tract; LRT, lower respiratory tract; HAI, hemagglutination inhibition; Ab, Antibodies; n.d., not done; n.r., not relevant when vector and WT target are not closely related; u.d.l., under detection limit; pv, post-vaccination; hPIV-1, human parainfluenza type 1; hPIV-2, human parainfluenza type 2; b/hPIV-3, human parainfluenza type 3; hRSV, human respiratory virus; SeV, Sendai virus; NDV, Newcastle disease virus; AGM, African green monkey; RM, Rhesus monkey.

^areduction in vector titre compared with WT target titre;

^bincrease in Ab titres compared with mock immunised controls. The range corresponds to the increase from the lower detection limit and 0, respectively; and

^creduction in viral titres compared with mock immunised control.

viral titres in the URT and the LRT [111]. Although other less attenuated constructions seem to induce better antibody responses and better protection in AGM, a trial with this vaccine is currently ongoing in seronegative children (6–36 months).

A recombinant hPIV-2 vaccine is also currently in a phase I clinical trial among seropositive children [113]. The rV94(15C)/948L/ Δ 1724 vaccine is *ts* and *att* through mutation Y948L and deletion Δ 1724–1725 within the L protein, as this protein was previously shown to be a key target for virus attenuation [114–116]. Furthermore, this vaccine had an adventitious mutation, T15C, in the 3' leader region of the viral genome, shown as an *att* mutation *in vitro* [117]. These mutations highly reduced the viral load in the URT and the LRT of AGM, with a mean peak post-challenge virus titre under the detection limit, despite the fact that this mutant was not the best for inducing HAI antibodies.

bPIV-3 vectored hPIV-3 vaccines

A bPIV-3 strain has been tested as a potential hPIV-3 vaccine for humans since the early 1990s [118–120]. In phase II clinical trial, vaccination was performed at 2, 4, 6 and 12–15 months of age [120]. The vaccine was found to be safe and relatively well tolerated, except for pyrexia after the second immunisation. However, it was only moderately immunogenic: before the 4th inoculation, only 46%–61% of children seroconverted for hPIV-3 (47% in the placebo group had experienced hPIV-3 natural infection and showed hPIV-3 seroconversion). Nevertheless, this viral platform could be used as a potential vector for hPIV3, as well as hRSV and other respiratory viruses.

The rB/HPIV3 vaccine is based on a bPIV-3 virus with the *F* and *HN* genes substituted by their hPIV-3 counterparts [121,122]. This viral platform generated antibody titres between those seen following an hPIV-3 infection and a bPIV-3 infection in hamsters and rhesus monkeys (RM). This vaccine conferred excellent protection in RM, even better than that induced by hPIV-3 immunisation with reduced mean peak virus titres after challenge. A phase I clinical trial is in progress in seronegative children.

MEDI-534 is an rB/HPIV3 vector with the hRSV *F* protein (A2 subgroup) added to the genome between the *N* and *P* gene [123–125]. This vector is able to induce specific neutralising antibody titres against hPIV-3, although the results are more contrasted for the hRSV A2 strain. However,

MEDI-534 conferred a good protection against hRSV A2 and hPIV-3 challenges, and the virus replication was shown to be highly restricted in healthy adults [126] with a safety profile similar to placebo in children from 1 to 9 years [127] as well as in 6 to 24 month old children [128]. A Phase II clinical study is currently ongoing in infants 2–24 months of age.

SeV and NDV vectored hPIVs vaccines

The genome of the murine virus SeV is highly similar to that of hPIV-1 (Figure 1) and could be considered as its animal equivalent. SeV was used as a xenotropic vaccine for hPIV-1 and was found to be safe in healthy human adults [129], and the phase I clinical trial is currently ongoing in children 1 to 6 years of age (NCT00186927).

A recombinant Sendai virus (rSeV) vector was recently evaluated with the insertion of exogenous *F* or *HN/G* genes between the SeV *F* and *HN* genes to obtain a bivalent vaccine; the supplementary *F* or *HN/G* proteins were provided by hPIV-2, hPIV-3 or hRSV [130–133]. In the cotton rat (CR) model, the rSeV-hPIV-2-HN vaccine was able to induce high titres of anti-hPIV-2 antibodies in serum. Of note, SeV alone was also able to induce an antibody response against hPIV-1. One of the particularities of this vaccine is that long-lasting protection was shown in CR at 11 months post-immunisation, with no detectable virus in lungs. A mixed vaccine immunisation strategy, with the combination of rSeV-hPIV-3-HN, rSeV-hRSV-F and hPIV-2-HN, provided a protection of CR against challenges with hPIV-1, hPIV-2, hPIV-3 and hRSV.

Newcastle disease virus is commonly implicated in poultry diseases but is also able to infect highly exposed humans causing conjunctivitis [134]. Two recombinant vectors, based on two different NDV strains, were engineered to express the hPIV-3 HN protein [135]. These vectors were shown to be immunogenic against hPIV-3 even after 56 days in AGM and RM. It had been shown that the NDV-vectored vaccine needed to be inoculated in the LRT (trachea) for an effective immunisation of AGM [136].

VECTORED REPLICATION-COMPETENT HRSV (TABLE 2) AND HMPV (TABLE 3) VACCINES

Recombinant hRSV vaccines

Following the development of hRSV reverse genetics systems in the late 1990s, many vaccine strategies based on genome modifications have been evaluated.

Table 2. Live-vectored hRSV vaccines

Name	Target	Vector	Genome modification	Attenuation:		Immunogenicity:		Protection:		Clinical trial	Relevant publications
				Animal study model	reduction in viral titres ^a (log ₁₀)	increase in Ab titres ^b (reciprocal log ₂)	increase in NT viral titres ^c (log ₁₀)	reduction in viral titres ^c (log ₁₀)			
rA2ΔNS1	hRSV	hRSV A2 strain	ΔNS1	Chimp	URT 3.4 LRT 4.1	28 days pv 6.5–9.8	URT 3.3 LRT 3			Planned [71]	[137]
rA2ΔM2-2	hRSV	hRSV A2 strain	ΔM2-2	Chimp	URT 3.5 LRT 4.3	5.8–9.1	URT 2.7 LRT 2.6			Planned [71]	[137]
MEDI-559^d	hRSV	hRSV A2 strain	L: Q831L – Y1321N – M2 start gene mutation – ΔSH	Mice [6]	>2.9	7–10.3	2.5	>3.4		Phase I–II Mice	[6,7]
MEDI-534	hRSV hPIV-3	bPIV-3	hRSV F inserted between N and P – substitution of F and HN by hPIV-3 counterparts	Chimp [7]	Chimp	Chimp	Mice			NCT00767416	
			hRSV F inserted between N and P – substitution of F and HN by hPIV-3 counterparts	AGM	n.r.	1.8–4 (subtype A) 1.4–3.4 (subtype B)	>3.2	>4.5		Phase I–II NCT00686075	[123]
SeVRSV	hRSV	SeV	hRSV F inserted between F and HN genes	AGM	n.r.	3.5–9.7	25%–50% ^e	100% ^e			[133]
NDV-F	hRSV	NDV	hRSV F inserted between P and M genes	Mice	n.r.	n.d.	n.d.	~1			[148]
MVAIK/RSV/F	hRSV	MeV AIK-C strain	hRSV-A2 F inserted between P and M genes	CR	n.r.	~2.5 (subtype A) ~2 (subtype B)	n.d.	>2.3 (subtype A) ~0.5 (subtype B)			[149]

URT, upper respiratory tract; LRT, lower respiratory tract; HAI, hemagglutination inhibition; Ab, antibodies; n.d., not done; n.r., not relevant when vector and WT target are not closely related; u.d.l., under detection limit; pv, post-vaccination; b/hPIV-3, human parainfluenza type 3; hRSV, human respiratory virus; SeV, Sendai virus; NDV, Newcastle disease virus; MeV, measles virus; Chimp, chimpanzee; AGM, African green monkeys; CR, cotton rat.

^areduction in vector titre compared with WT target titre;

^bincrease in Ab titres compared with mock immunised controls. The range corresponds to the increase from the lower detection limit and 0, respectively;

^creduction in viral titres compared with mock immunised control;

^dor rA2cp248/404/1030ΔSH; note that only mutant rA2cp248/404/ΔSH was evaluated in BALB/c mice and chimpanzees, and mutant rA2cp248/404/1030 was found attenuated in [116];

^e% of AGM protected.

Table 3. Live-vectored hMPV vaccines

Name	Target	Vector	Genome modification	Animal study model	Attenuation: reduction in viral titres ^a (log ₁₀)		Immunogenicity: increase in NT Ab titres ^b (reciprocal log ₂)		Protection: reduction in viral titres ^c (log ₁₀)		Clinical trial	Relevant publications
					URT	LRT	URT	LRT	URT	LRT		
rhMPV/ ΔM2-2	hMPV	hMPV	ΔM2-2	AGM	2.2	3.6	4–6.8		3.1	4.5		[141]
rhMPV-ΔG	hMPV	hMPV	ΔG	AGM	0.8	3.5	4.5–7.3		3.3	4.5		[141]
rHMPV-Pa	hMPV	hMPV	Substitution of <i>P</i> by aMPV <i>P</i>	AGM	1.7	2.7	3.5–5		>1.3	>2.9	Phase I NCT01255410	[144]
b/h PIV3/ hMPV F2	hMPV hPIV-3	bPIV-3 hPIV-3	hMPV-A1 <i>F</i> inserted between <i>N</i> and <i>P</i> – substitution of <i>F</i> and <i>HN</i> by hPIV-3 counterparts	AGM	n.r.	n.r.	7.1 (subtype A) 1.7 (subtype B)		2.4	>4.3		[147]

URT, upper respiratory tract; LRT, lower respiratory tract; HAI, hemagglutination inhibition; Ab, antibodies; n.d., not done; n.r., not relevant when vector and WT target are not closely related; u.d.l., under detection limit; pv: post-vaccination; hMPV, human metapneumovirus; b/hPIV-3, human parainfluenza type 3; AGM, African green monkey.

^areduction in vector titre compared with WT target titre;

^bincrease in Ab titres compared with mock immunised control. The range corresponds to the increase from the lower detection limit and 0, respectively; and

^creduction in viral titres compared with mock immunised control.

One of them was to delete accessory genes to create an attenuated vaccine; recombinants hRSV-A2 strain Δ SH, Δ NS2, Δ NS1 or Δ M2-2 were thus generated [6,7,137]. The hRSV Δ SH or Δ NS2 vectors were found to be inadequately attenuated compared with the cpRSV (cpts248/404) vaccine described before in this review, and thus only the Δ NS1 or Δ M2-2 candidates have entered clinical trials [71]. These two recombinant vectors were able to induce neutralising antibody titres similar to those seen following natural hRSV-A2 infection and were immunoprotective with a decrease of $\sim 3 \log_{10}$ of mean viral titres in the URT and the LRT of chimpanzees after virus challenge [137].

The MEDI-559 or rA2cp248/404/1030 Δ SH [138,139] is a recombinant vaccine based on cpRSV (cpts248/404), which harbours two missense mutations in the *L* gene (248: Q831L/1030: Y1321N), one in the M2 gene start-signal (404) and a deletion of SH. The mutants rA2cp248/404/1030 and rA2cp248/404/ Δ SH were evaluated separately in BALB/c mice and chimpanzees [6,7,116], and both were found to be attenuated and protective in the URT and the LRT of mice and primates. This vector has been shown safe and immunogenic in children from 1 to 24 months of age [140]. However, the reversion of one mutation in the *L* gene has been observed and the stability of this vector should be monitored. A phase I–II clinical trial with this vaccine is currently ongoing.

Recombinant hMPV vaccines

The main strategies used for the development of recombinant hRSV vaccines were adapted for hMPV. For instance, attenuation was achieved through deletion of some accessory genes. The rhMPV- Δ M2-2 and rhMPV- Δ G vaccines were obtained by deletion of non-essential genes [141]. These vaccines were well attenuated, except for a reduction of only $0.8 \log_{10}$ for rhMPV- Δ G in the URT. They were also shown to protect against hMPV challenge, with a reduction of $\sim 3 \log_{10}$ in viral titres in the URT and of $4.5 \log_{10}$ in the LRT of AGM 28 days post-challenge. Of note, a high prevalence of adventitious mutations was observed in the absence of the M2-2 protein [27], which may limit the use of the rhMPV- Δ M2-2 vaccine. It has been also shown that a recombinant hMPV strain lacking the G (rhMPV- Δ G) increases IFN response as well as IRF and NF- κ B-dependent gene transcription pathways [142]. On the other hand, a soluble recombinant G protein

was immunogenic, but not protective, against hMPV challenge in CRs [143]. These results consolidate the notion that the hMPV G protein could be deleted with a weak effect on immunogenicity.

The rhMPV-Pa is a promising hMPV vaccine expressing the P protein from aMPV instead of its own P protein [144]. It induced the production of neutralising antibodies similar to those seen after natural hMPV infection and was shown to greatly reduce hMPV replication after viral challenge with non-detectable levels of viruses in the URT and the LRT of AGM. Furthermore, the rhMPV-Pa was well attenuated and was not able to replicate at high levels in the trachea and nasopharynx of AGM. This reduced ability to replicate *in vivo* led to a phase I clinical trial, which is currently ongoing in seropositive children. However, hMPV and hMPV-Pa were found to be poorly infectious in healthy adults (NCT01109329) [145,146], emphasising the importance of preferably immunising seronegative children.

PIV-3 vectored hRSV/hMPV vaccines

MEDI-534 [126] is a hRSV vaccine in phase II clinical trials that includes the hRSV F (A2 subgroup), and hPIV-3 F/HN proteins with a bPIV-3 vector. This vaccine candidate was previously described in this review for its protection against hPIV-3 infection. High titres of hRSV neutralising antibodies were induced against both viral groups, and a good protection was observed with a reduction $> 3 \log_{10}$ of viral loads in the URT and LRT in AGM. However, the protection seems to be restricted to the hRSV A subgroup only.

The b/h PIV3/hMPV F2 vaccine is constructed on the same basis as the MEDI-534 vaccine, but with an hMPV F (A1 subgroup) protein instead of the hRSV F one [147]. This vaccine was able to induce neutralising antibodies against hPIV-3, and the homotypic hMPV A group strain but with much lower titres against heterotypic subgroup B strain. Vaccinated AGMs were protected against challenge with the homologous hMPV strain, with a reduction of $2.4 \log_{10}$ in mean viral titres in the URT and undetectable titres in the LRT.

SeV and NDV vectored hRSV vaccines

The recombinant vector SeVRSV expresses the hRSV F protein –inserted between SeV *F* and *HN* genes – [130,131,133] and has been shown to elicit hRSV-specific antibodies as well as T-cell responses.

A good protection against the heterotypic hRSV subgroup B strain was also observed in CR, with no detectable virus titres in the LRT and reduced viral load in the URT.

A vaccine candidate against hRSV was also developed with an NDV vector [148], albeit with the limitations described before. Despite the fact that mice were not totally protected upon challenge, this study showed a correlation between CD8⁺ T-cell induction and protection.

MV vectored hRSV vaccines

Another hRSV vaccine candidate was developed on the basis of the recombinant measles vaccine strain AIK-C [149] with the hRSV *F* gene (A2) inserted between the *P* and *M* genes. Neutralising antibodies were induced against both groups, and a good protection was reported in CR against the hRSV-A group, with a reduction in mean lung viral titres >2.3 log₁₀. Cross protection upon challenge was relatively weak for the heterotypic B group with only 0.5 log₁₀ reduction in lung viral load.

DISCUSSION

Short overview of other innovative strategies

In addition to the previous strategies, there are other innovative vaccine avenues that were not described in this review. For instance, the use of virus-like particles (VLPs) expressing major viral antigens at their surface, such as the *F* proteins, is one of the promising research areas in vaccine development [150,151]. VLPs are viral envelopes or capsids that are not able to replicate into the host because of the lack of genetic material. Because of this fact, they are also considered safer than live-attenuated vaccines and are already used widely for hepatitis B and human papilloma virus vaccines. Other non-paramyxovirus vectors such as the replication-deficient adenovirus (AdV) platform can also be used for vaccine development [152].

Animal models and clinical trials

Most animal models described for testing paramyxovirus vaccines consist of Syrian hamsters, CR, BALB/c mice or non-human primates (AGM, RM and chimpanzee). However, as animal models are less permissive to human respiratory paramyxovirus infections than naive humans, it has been difficult to precisely evaluate the degree of

attenuation of vaccine candidates before clinical trials [153].

Vaccine delivery, mass production and target populations

In all pre-clinical studies reviewed here, the potential vaccines were administered by the intranasal route sometimes combined with intratracheal inoculation. As mentioned, intratracheal delivery of NDV vector to the LRT is necessary for this type of vaccines [136]. Obviously, the intratracheal route remains impractical for clinical trials, but the use of improved aerosolised vaccines designed to reach the lower respiratory tract could be an option [136,154].

The ability to easily produce vectors is critical at the industrial level to reduce costs. The MEDI-534 development programme highlights this point. In this vector construct, the hRSV *F* gene was cloned at the 1st or at the 2nd position in the genome (b/h PIV3/hRSV-F1 or b/h PIV3/hRSV-F2, respectively) [125]. Although there were some indications for better immunogenicity and protection in favour of the b/h PIV3/hRSV-F1 vaccine, the researchers selected the 2nd construct for further development because it had better replication *in vitro* and could thus be more easily produced. In that respect, the use of the NDV vector could be an advantage because industry knows how to produce it at large scale in chicken embryonated eggs. However, vaccine production in eggs may also be a disadvantage because of albumin intolerance reported by some individuals.

One of the main issues with the respiratory paramyxoviruses is that individuals can be reinfected throughout their lives. Increasing the durability of the immune response could be potentially achieved with the development of new adjuvants and alternate routes of immunisation. Several reviews on influenza vaccines focus on this topic [155,156].

Finally, the target population for paramyxovirus immunisation is a challenging problem. As reviewed by Schmidt *et al.* [157], infants <4 months of age, who are the most vulnerable to these viral infections (especially hRSV), fail to induce a strong immune response with the need for two or more immunisations. This weak immune response is partly caused by the presence of passively transferred maternal antibodies. An alternative approach would be to vaccinate pregnant women to allow for transplacental transfer of protective antibodies, although safety

issues would preclude the use of live-attenuated vaccines. Similarly, vaccination of the elderly is important, but this strategy would be probably best achieved with the use of non-replicating vaccines because of the presence of pre-existing antibodies. In that context, subunit vaccines with or without adjuvants could be a logical option. Ultimately, the

development of bi, tri, or tetravalent chimeric vaccines by reverse genetics may significantly reduce costs and reduce severe paramyxovirus infections.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no competing interest.

REFERENCES

- Lamb RA, Parks GD. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology* Fifth ed, Knipe DM, Howley PM (eds). Philadelphia, 2007; 1449–1496.
- Collins PL, Crowe JE. Respiratory syncytial virus and metapneumovirus. In *Fields Virology* 5th Edition ed, Knipe DM, Howley PM (eds). Philadelphia, 2007; 1601–1646.
- Karron RA, Collins PL. Parainfluenza viruses. In *Fields Virology* 5th Edition ed, Knipe DM, MHP (eds). Philadelphia, 2007; 1497–1526.
- He B, Leser GP, Paterson RG, et al. The paramyxovirus SV5 small hydrophobic (SH) protein is not essential for virus growth in tissue culture cells. *Virology* 1998; **250**: 30–40.
- Feuillet F, Lina B, Rosa-Calatrava M, et al. Ten years of human metapneumovirus research. *Journal of Clinical Virology* 2012; **53**: 97–105.
- Bukreyev A, Whitehead SS, Murphy BR, et al. 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* 1997; **71**: 8973–8982.
- Whitehead SS, Bukreyev A, Teng MN, et al. Recombinant respiratory syncytial virus bearing a deletion of either the NS2 or SH gene is attenuated in chimpanzees. *Journal of Virology* 1999; **73**: 3438–3442.
- Lin Y, Bright AC, Rothermel TA, et al. Induction of apoptosis by paramyxovirus simian virus 5 lacking a small hydrophobic gene. *Journal of Virology* 2003; **77**: 3371–3383.
- Wilson RL, Fuentes SM, Wang P, et al. Function of small hydrophobic proteins of paramyxovirus. *Journal of Virology* 2006; **80**: 1700–1709.
- Herfst S, Mas V, Ver LS, et al. Low-pH-induced membrane fusion mediated by human metapneumovirus F protein is a rare, strain-dependent phenomenon. *Journal of Virology* 2008; **82**: 8891–8895.
- Schowalter RM, Chang A, Robach JG, et al. Low-pH triggering of human metapneumovirus fusion: essential residues and importance in entry. *Journal of Virology* 2009; **83**: 1511–1522.
- Tayyari F, Marchant D, Moraes TJ, et al. Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nature Medicine* 2011; **17**: 1132–1135.
- Cseke G, Maginnis MS, Cox RG, et al. Integrin alphavbeta1 promotes infection by human metapneumovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; **106**: 1566–1571.
- Chang A, Masante C, Buchholz UJ, et al. Human metapneumovirus (HMPV) binding and infection are mediated by interactions between the HMPV fusion protein and heparan sulfate. *Journal of Virology* 2012; **86**: 3230–3243.
- Teng MN, Whitehead SS, Collins PL. Contribution of the respiratory syncytial virus G glycoprotein and its secreted and membrane-bound forms to virus replication in vitro and in vivo. *Virology* 2001; **289**: 283–296.
- Yin HS, Wen X, Paterson RG, et al. Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation. *Nature* 2006; **439**: 38–44.
- Zimmer G, Conzelmann KK, Herrler G. Cleavage at the furin consensus sequence RAR/KR(109) and presence of the intervening peptide of the respiratory syncytial virus fusion protein are dispensable for virus replication in cell culture. *Journal of Virology* 2002; **76**: 9218–9224.
- Russell CJ, Luque LE. The structural basis of paramyxovirus invasion. *Trends in Microbiology* 2006; **14**: 243–246.
- Connolly SA, Leser GP, Jardetzky TS, et al. Bimolecular complementation of paramyxovirus fusion and hemagglutinin-neuraminidase proteins enhances fusion: implications for the mechanism of fusion triggering. *Journal of Virology* 2009; **83**: 10857–10868.
- Takimoto T, Taylor GL, Connaris HC, et al. Role of the hemagglutinin-neuraminidase protein in the mechanism of paramyxovirus-cell membrane fusion. *Journal of Virology* 2002; **76**: 13028–13033.
- Melanson VR, Iorio RM. Addition of N-glycans in the stalk of the Newcastle disease virus HN protein blocks its interaction with the F protein and prevents fusion. *Journal of Virology* 2006; **80**: 623–633.
- Tsurudome M, Ito M, Nishio M, et al. Hemagglutinin-neuraminidase-independent fusion activity of simian virus 5 fusion (F) protein: difference in conformation between fusogenic and nonfusogenic F proteins on the cell surface. *Journal of Virology* 2001; **75**: 8999–9009.
- Tsurudome M, Ito M, Nishio M, et al. Identification of regions on the fusion protein of human parainfluenza virus type 2 which are required for haemagglutinin-neuraminidase proteins to promote cell fusion. *Journal of General Virology* 1998; **79** (Pt 2): 279–289.
- Gardner AE, Martin KL, Dutch RE. A conserved region between the heptad repeats of paramyxovirus fusion proteins is critical for proper F protein folding. *Biochemistry* 2007; **46**: 5094–5105.
- Swanson K, Wen X, Leser GP, et al. Structure of the Newcastle disease virus F protein in the post-fusion conformation. *Virology* 2010; **402**: 372–379.
- Fearn R, Collins PL. Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential

- transcription. *Journal of Virology* 1999; **73**: 5852–5864.
27. Schickli JH, Kaur J, Macphail M, *et al.* Deletion of human metapneumovirus M2-2 increases mutation frequency and attenuates growth in hamsters. *Virology Journal* 2008; **5**: 69.
 28. Bermingham A, Collins PL. 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* 1999; **96**: 11259–11264.
 29. Bossert B, Marozin S, Conzelmann KK. Nonstructural proteins NS1 and NS2 of bovine respiratory syncytial virus block activation of interferon regulatory factor 3. *Journal of Virology* 2003; **77**: 8661–8668.
 30. Spann KM, Tran KC, Chi B, *et al.* Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages [corrected]. *Journal of Virology* 2004; **78**: 4363–4369.
 31. Kotelkin A, Belyakov IM, Yang L, *et al.* The NS2 protein of human respiratory syncytial virus suppresses the cytotoxic T-cell response as a consequence of suppressing the type I interferon response. *Journal of Virology* 2006; **80**: 5958–5967.
 32. Stockman LJ, Curns AT, Anderson LJ, *et al.* Respiratory syncytial virus-associated hospitalizations among infants and young children in the United States, 1997–2006. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2012; **31**: 5–9.
 33. Williams JV, Edwards KM, Weinberg GA, *et al.* Population-based incidence of human metapneumovirus infection among hospitalized children. *Journal of Infectious Diseases* 2010; **201**: 1890–1898.
 34. Cilla G, Onate E, Perez-Yarza EG, *et al.* Hospitalization rates for human metapneumovirus infection among 0- to 3-year-olds in Gipuzkoa (Basque Country), Spain. *Epidemiology and Infection* 2009; **137**: 66–72.
 35. Chiu SS, Chan KH, Chen H, *et al.* Virologically confirmed population-based burden of hospitalization caused by respiratory syncytial virus, adenovirus, and parainfluenza viruses in children in Hong Kong. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2010; **29**: 1088–1092.
 36. Leader S, Kohlhase K. Recent trends in severe respiratory syncytial virus (RSV) among US infants, 1997 to 2000. *Journal of Pediatrics* 2003; **143**: S127–132.
 37. Welliver RC. Respiratory syncytial virus and other respiratory viruses. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2003; **22**: S6–10; discussion S10–12.
 38. Welliver RC, Wong DT, Sun M, *et al.* Parainfluenza virus bronchiolitis. Epidemiology and pathogenesis. *American Journal of Diseases of Children* 1986; **140**: 34–40.
 39. Henrickson KJ, Kuhn SM, Savatski LL. Epidemiology and cost of infection with human parainfluenza virus types 1 and 2 in young children. *Clinical Infectious Diseases* 1994; **18**: 770–779.
 40. Glezen WP, Frank AL, Taber LH, *et al.* Parainfluenza virus type 3: seasonality and risk of infection and reinfection in young children. *Journal of Infectious Diseases* 1984; **150**: 851–857.
 41. Boivin G, De Serres G, Cote S, *et al.* Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerging Infectious Diseases* 2003; **9**: 634–640.
 42. Paes BA, Mitchell I, Banerji A, *et al.* A decade of respiratory syncytial virus epidemiology and prophylaxis: translating evidence into everyday clinical practice. *Canadian Respiratory Journal* 2011; **18**: e10–19.
 43. Garcia CG, Bhore R, Soriano-Fallas A, *et al.* Risk factors in children hospitalized with RSV bronchiolitis versus non-RSV bronchiolitis. *Pediatrics* 2010; **126**: e1453–1460.
 44. Leader S, Yang H, Devincenzo J, *et al.* Time and out-of-pocket costs associated with respiratory syncytial virus hospitalization of infants. *Value in Health* 2003; **6**: 100–106.
 45. Marx A, Gary HE Jr., Marston BJ, *et al.* Parainfluenza virus infection among adults hospitalized for lower respiratory tract infection. *Clinical Infectious Diseases* 1999; **29**: 134–140.
 46. Glezen WP, Taber LH, Frank AL, *et al.* Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *American Journal of Diseases of Children* 1986; **140**: 543–546.
 47. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, *et al.* Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *Journal of the American Medical Association* 2003; **289**: 179–186.
 48. Hall CB, Douglas RG Jr., Geiman JM. Possible transmission by fomites of respiratory syncytial virus. *Journal of Infectious Diseases* 1980; **141**: 98–102.
 49. Lessler J, Reich NG, Brookmeyer R, *et al.* Incubation periods of acute respiratory viral infections: a systematic review. *The Lancet Infectious Diseases* 2009; **9**: 291–300.
 50. Liao S, Bao X, Liu T, *et al.* Role of retinoic acid inducible gene-I in human metapneumovirus-induced cellular signalling. *Journal of General Virology* 2008; **89**: 1978–1986.
 51. Bueno SM, Gonzalez PA, Riedel CA, *et al.* Local cytokine response upon respiratory syncytial virus infection. *Immunology Letters* 2011; **136**: 122–129.
 52. Laham FR, Israele V, Casellas JM, *et al.* Differential production of inflammatory cytokines in primary infection with human metapneumovirus and with other common respiratory viruses of infancy. *Journal of Infectious Diseases* 2004; **189**: 2047–2056.
 53. Skiadopoulos MH, Biacchesi S, Buchholz UJ, *et al.* Individual contributions of the human metapneumovirus F, G, and SH surface glycoproteins to the induction of neutralizing antibodies and protective immunity. *Virology* 2006; **345**: 492–501.
 54. Spriggs MK, Murphy BR, Prince GA, *et al.* Expression of the F and HN glycoproteins of human parainfluenza virus type 3 by recombinant vaccinia viruses: contributions of the individual proteins to host immunity. *Journal of Virology* 1987; **61**: 3416–3423.
 55. Hussell T, Spender LC, Georgiou A, *et al.* Th1 and Th2 cytokine induction in pulmonary T cells during infection with respiratory syncytial virus. *Journal of General Virology* 1996; **77**(Pt 10): 2447–2455.
 56. Hussell T, Baldwin CJ, O'garra A, *et al.* CD8+ T cells control Th2-driven pathology during pulmonary respiratory syncytial virus infection. *European Journal of Immunology* 1997; **27**: 3341–3349.
 57. Krilov LR. Respiratory syncytial virus disease: update on treatment and prevention. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 2011; **9**: 27–32.

58. Chakrabarti S, Collingham KE, Holder K, *et al.* Parainfluenza virus type 3 infections in hematopoietic stem cell transplant recipients: response to ribavirin therapy. *Clinical Infectious Diseases* 2000; **31**: 1516–1518.
59. Nichols WG, Corey L, Gooley T, *et al.* Parainfluenza virus infections after hematopoietic stem cell transplantation: risk factors, response to antiviral therapy, and effect on transplant outcome. *Blood* 2001; **98**: 573–578.
60. Safdar A. Immune modulatory activity of ribavirin for serious human metapneumovirus disease: early i.v. therapy may improve outcomes in immunosuppressed SCT recipients. *Bone Marrow Transplantation* 2008; **41**: 707–708.
61. Wyde PR, Chetty SN, Jewell AM, *et al.* Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin in vitro. *Antiviral Research* 2003; **60**: 51–59.
62. Johnson S, Oliver C, Prince GA, *et al.* Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus. *Journal of Infectious Diseases* 1997; **176**: 1215–1224.
63. Feltes TF, Cabalka AK, Meissner HC, *et al.* Palivizumab prophylaxis reduces hospitalization due to respiratory syncytial virus in young children with hemodynamically significant congenital heart disease. *Journal of Pediatrics* 2003; **143**: 532–540.
64. Meissner HC, Long SS. Revised indications for the use of palivizumab and respiratory syncytial virus immune globulin intravenous for the prevention of respiratory syncytial virus infections. *Pediatrics* 2003; **112**: 1447–1452.
65. The IMPact-RSV Study Group. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. *Pediatrics* 1998; **102**: 531–537.
66. Wang D, Bayliss S, Meads C. Palivizumab for immunoprophylaxis of respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis in high-risk infants and young children: a systematic review and additional economic modelling of subgroup analyses. *Health Technology Assessment* 2011; **15**: iii–iv, 1–124.
67. Wu H, Pfarr DS, Johnson S, *et al.* Development of motavizumab, an ultra-potent antibody for the prevention of respiratory syncytial virus infection in the upper and lower respiratory tract. *Journal of Molecular Biology* 2007; **368**: 652–665.
68. Carbonell-Estrany X, Simoes EA, Dagan R, *et al.* Motavizumab for prophylaxis of respiratory syncytial virus in high-risk children: a noninferiority trial. *Pediatrics* 2010; **125**: e35–51.
69. Feltes TF, Sondheimer HM, Tulloh RM, *et al.* A Randomized controlled trial of motavizumab versus palivizumab for the prophylaxis of serious respiratory syncytial virus disease in children with hemodynamically significant congenital heart disease. *Pediatric Research* 2011; **70**: 186–191.
70. Lowry F. FDA Panel Nixes Licensing Request for Motavizumab. *Medscape News*. <http://www.medscape.com/viewarticle/722903> [June 3, 2010].
71. Collins PL, Melero JA. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. *Virus Research* 2011; **162**: 80–99.
72. Hamelin ME, Couture C, Sackett M, *et al.* The prophylactic administration of a monoclonal antibody against human metapneumovirus attenuates viral disease and airways hyperresponsiveness in mice. *Antiviral Therapy* 2008; **13**: 39–46.
73. Hamelin ME, Gagnon C, Prince GA, *et al.* Prophylactic and therapeutic benefits of a monoclonal antibody against the fusion protein of human metapneumovirus in a mouse model. *Antiviral Research* 2010; **88**: 31–37.
74. Deffrasnes C, Hamelin ME, Prince GA, *et al.* Identification and evaluation of a highly effective fusion inhibitor for human metapneumovirus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008; **52**: 279–287.
75. Roymans D, De Bondt HL, Arnould E, *et al.* Binding of a potent small-molecule inhibitor of six-helix bundle formation requires interactions with both heptad-repeats of the RSV fusion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; **107**: 308–313.
76. Deffrasnes C, Cavanagh MH, Goyette N, *et al.* Inhibition of human metapneumovirus replication by small interfering RNA. *Antiviral Therapy* 2008; **13**: 821–832.
77. Devincenzo J, Lambkin-Williams R, Wilkinson T, *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; **107**: 8800–8805.
78. Fulginiti VA, Eller JJ, Sieber OF, *et al.* Respiratory virus immunization. I. A field trial of two inactivated respiratory virus vaccines; an aqueous trivalent parainfluenza virus vaccine and an aluminum-precipitated respiratory syncytial virus vaccine. *American Journal of Epidemiology* 1969; **89**: 435–448.
79. Kapikian AZ, Mitchell RH, Chanock RM, *et al.* An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. *American Journal of Epidemiology* 1969; **89**: 405–421.
80. Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, *et al.* Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *American Journal of Epidemiology* 1969; **89**: 422–434.
81. Openshaw PJ, Culley FJ, Olszewska W. Immunopathogenesis of vaccine-enhanced RSV disease. *Vaccine* 2001; **20** Suppl 1: S27–31.
82. Moghaddam A, Olszewska W, Wang B, *et al.* A potential molecular mechanism for hypersensitivity caused by formalin-inactivated vaccines. *Nature Medicine* 2006; **12**: 905–907.
83. Delgado ME, Coviello S, Monsalvo AC, *et al.* Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease. *Nature Medicine* 2009; **15**: 34–41.
84. Ottolini MG, Porter DD, Hemming VG, *et al.* Enhanced pulmonary pathology in cotton rats upon challenge after immunization with inactivated parainfluenza virus 3 vaccines. *Viral Immunology* 2000; **13**: 231–236.
85. Hamelin ME, Couture C, Sackett MK, *et al.* Enhanced lung disease and Th2 response

- following human metapneumovirus infection in mice immunized with the inactivated virus. *Journal of General Virology* 2007; **88**: 3391–3400.
86. Yim KC, Cragin RP, Boukhvalova MS, *et al.* Human metapneumovirus: enhanced pulmonary disease in cotton rats immunized with formalin-inactivated virus vaccine and challenged. *Vaccine* 2007; **25**: 5034–5040.
 87. De Swart RL, Van Den Hoogen BG, Kuiken T, *et al.* Immunization of macaques with formalin-inactivated human metapneumovirus induces hypersensitivity to hMPV infection. *Vaccine* 2007; **25**: 8518–8528.
 88. Katz SL, Milovanovic MV, Enders JF. Propagation of measles virus in cultures of chick embryo cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1958; **97**: 23–29.
 89. Katz SL, Kempe CH, Black FL, *et al.* Studies on an attenuated measles-virus vaccine. VIII. General summary and evaluation of the results of vaccine. *The New England Journal of Medicine* 1960; **263**: 180–184.
 90. Buynak EB, Hilleman MR. Live attenuated mumps virus vaccine. 1. Vaccine development. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1966; **123**: 768–775.
 91. Hilleman MR, Weibel RE, Buynak EB, *et al.* Live attenuated mumps-virus vaccine. IV. Protective efficacy as measured in a field evaluation. *The New England Journal of Medicine* 1967; **276**: 252–258.
 92. Buynak EB, Weibel RE, Whitman JE, *et al.* Combined live measles, mumps, and rubella virus vaccines. *Journal of the American Medical Association* 1969; **207**: 2259–2262.
 93. Hitchner SB, Johnson EP. A virus of low virulence for immunizing fowls against Newcastle disease; avian pneumoencephalitis. *Veterinární Medicina* 1948; **43**: 525–530.
 94. Belshe RB, Newman FK, Tsai TF, *et al.* Phase 2 evaluation of parainfluenza type 3 cold passage mutant 45 live attenuated vaccine in healthy children 6–18 months old. *Journal of Infectious Diseases* 2004; **189**: 462–470.
 95. Wright PE, Karron RA, Belshe RB, *et al.* Evaluation of a live, cold-passaged, temperature-sensitive, respiratory syncytial virus vaccine candidate in infancy. *Journal of Infectious Diseases* 2000; **182**: 1331–1342.
 96. Zaman K, Roy E, Arifeen SE, *et al.* Effectiveness of maternal influenza immunization in mothers and infants. *The New England Journal of Medicine* 2008; **359**: 1555–1564.
 97. Brideau RJ, Oien NL, Lehman DJ, *et al.* Protection of cotton rats against human parainfluenza virus type 3 by vaccination with a chimeric FHN subunit glycoprotein. *Journal of General Virology* 1993; **74**(Pt 3): 471–477.
 98. Homa FL, Brideau RJ, Lehman DJ, *et al.* Development of a novel subunit vaccine that protects cotton rats against both human respiratory syncytial virus and human parainfluenza virus type 3. *Journal of General Virology* 1993; **74**(Pt 9): 1995–1999.
 99. Lehman DJ, Roof LL, Brideau RJ, *et al.* Comparison of soluble and secreted forms of human parainfluenza virus type 3 glycoproteins expressed from mammalian and insect cells as subunit vaccines. *Journal of General Virology* 1993; **74**(Pt 3): 459–469.
 100. Cseke G, Wright DW, Tollefson SJ, *et al.* Human metapneumovirus fusion protein vaccines that are immunogenic and protective in cotton rats. *Journal of Virology* 2007; **81**: 698–707.
 101. Swanson KA, Settembre EC, Shaw CA, *et al.* Structural basis for immunization with postfusion respiratory syncytial virus fusion F glycoprotein (RSV F) to elicit high neutralizing antibody titers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; **108**: 9619–9624.
 102. NOVAVAX Launches Phase I Clinical Trial to Evaluate its Novel Vaccine Against Respiratory Syncytial Virus (RSV). <http://www.novavax.com/download/releases/1-4-11%20RSV%20Phase%20trial%20FINAL2.pdf> [January 14, 2011].
 103. Herfst S, Schrauwen EJ, De Graaf M, *et al.* Immunogenicity and efficacy of two candidate human metapneumovirus vaccines in cynomolgus macaques. *Vaccine* 2008; **26**: 4224–4230.
 104. Walpita P, Flick R. Reverse genetics of negative-stranded RNA viruses: a global perspective. *FEMS Microbiology Letters* 2005; **244**: 9–18.
 105. Pelet T, Delenda C, Gubbay O, *et al.* Partial characterization of a Sendai virus replication promoter and the rule of six. *Virology* 1996; **224**: 405–414.
 106. Calain P, Roux L. The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *Journal of Virology* 1993; **67**: 4822–4830.
 107. Durbin AP, Siew JW, Murphy BR, *et al.* Minimum protein requirements for transcription and RNA replication of a minigenome of human parainfluenza virus type 3 and evaluation of the rule of six. *Virology* 1997; **234**: 74–83.
 108. Samal SK, Collins PL. RNA replication by a respiratory syncytial virus RNA analog does not obey the rule of six and retains a nonviral trinucleotide extension at the leader end. *Journal of Virology* 1996; **70**: 5075–5082.
 109. Bartlett EJ, Amaro-Carambot E, Surman SR, *et al.* Human parainfluenza virus type I (HPIV1) vaccine candidates designed by reverse genetics are attenuated and efficacious in African green monkeys. *Vaccine* 2005; **23**: 4631–4646.
 110. Bartlett EJ, Cruz AM, Esker J, *et al.* Human parainfluenza virus type 1 C proteins are nonessential proteins that inhibit the host interferon and apoptotic responses and are required for efficient replication in non-human primates. *Journal of Virology* 2008; **82**: 8965–8977.
 111. Bartlett EJ, Castano A, Surman SR, *et al.* Attenuation and efficacy of human parainfluenza virus type 1 (HPIV1) vaccine candidates containing stabilized mutations in the P/C and L genes. *Virology Journal* 2007; **4**: 67.
 112. Bartlett EJ, Amaro-Carambot E, Surman SR, *et al.* Introducing point and deletion mutations into the P/C gene of human parainfluenza virus type 1 (HPIV1) by reverse genetics generates attenuated and efficacious vaccine candidates. *Vaccine* 2006; **24**: 2674–2684.
 113. Nolan SM, Skiadopoulos MH, Bradley K, *et al.* Recombinant human parainfluenza virus type 2 vaccine candidates containing

- a 3' genomic promoter mutation and L polymerase mutations are attenuated and protective in non-human primates. *Vaccine* 2007; **25**: 6409–6422.
114. Nolan SM, Surman SR, Amaro-Carambot E, *et al.* Live-attenuated intranasal parainfluenza virus type 2 vaccine candidates developed by reverse genetics containing L polymerase protein mutations imported from heterologous paramyxoviruses. *Vaccine* 2005; **23**: 4765–4774.
 115. Skiadopoulos MH, Durbin AP, Tatem JM, *et al.* Three amino acid substitutions in the L protein of the human parainfluenza virus type 3 cp45 live attenuated vaccine candidate contribute to its temperature-sensitive and attenuation phenotypes. *Journal of Virology* 1998; **72**: 1762–1768.
 116. Whitehead SS, Firestone CY, Karron RA, *et al.* Addition of a missense mutation present in the L gene of respiratory syncytial virus (RSV) cpts530/1030 to RSV vaccine candidate cpts248/404 increases its attenuation and temperature sensitivity. *Journal of Virology* 1999; **73**: 871–877.
 117. Schaap-Nutt A, Scull MA, Schmidt AC, *et al.* Growth restriction of an experimental live attenuated human parainfluenza virus type 2 vaccine in human ciliated airway epithelium in vitro parallels attenuation in African green monkeys. *Vaccine* 2010; **28**: 2788–2798.
 118. Clements ML, Belshe RB, King J, *et al.* Evaluation of bovine, cold-adapted human, and wild-type human parainfluenza type 3 viruses in adult volunteers and in chimpanzees. *Journal of Clinical Microbiology* 1991; **29**: 1175–1182.
 119. Lee MS, Greenberg DP, Yeh SH, *et al.* Antibody responses to bovine parainfluenza virus type 3 (PIV3) vaccination and human PIV3 infection in young infants. *Journal of Infectious Diseases* 2001; **184**: 909–913.
 120. Greenberg DP, Walker RE, Lee MS, *et al.* A bovine parainfluenza virus type 3 vaccine is safe and immunogenic in early infancy. *Journal of Infectious Diseases* 2005; **191**: 1116–1122.
 121. Schmidt AC, McAuliffe JM, Huang A, *et al.* Bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3) fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins make an important contribution to the restricted replication of BPIV3 in primates. *Journal of Virology* 2000; **74**: 8922–8929.
 122. Haller AA, Miller T, Mitiku M, *et al.* Expression of the surface glycoproteins of human parainfluenza virus type 3 by bovine parainfluenza virus type 3, a novel attenuated virus vaccine vector. *Journal of Virology* 2000; **74**: 11626–11635.
 123. Tang RS, Macphail M, Schickli JH, *et al.* Parainfluenza virus type 3 expressing the native or soluble fusion (F) protein of respiratory syncytial virus (RSV) confers protection from RSV infection in African green monkeys. *Journal of Virology* 2004; **78**: 11198–11207.
 124. Schmidt AC, Wenzke DR, McAuliffe JM, *et al.* Mucosal immunization of rhesus monkeys against respiratory syncytial virus subgroups A and B and human parainfluenza virus type 3 by using a live cDNA-derived vaccine based on a host range-attenuated bovine parainfluenza virus type 3 vector backbone. *Journal of Virology* 2002; **76**: 1089–1099.
 125. Tang RS, Schickli JH, Macphail M, *et al.* Effects of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus antigen insertion in two 3' proximal genome positions of bovine/human parainfluenza virus type 3 on virus replication and immunogenicity. *Journal of Virology* 2003; **77**: 10819–10828.
 126. Tang RS, Spaete RR, Thompson MW, *et al.* Development of a PIV-vectored RSV vaccine: preclinical evaluation of safety, toxicity, and enhanced disease and initial clinical testing in healthy adults. *Vaccine* 2008; **26**: 6373–6382.
 127. Gomez M, Mufson MA, Dubovsky F, *et al.* Phase-I study MEDI-534, of a live, attenuated intranasal vaccine against respiratory syncytial virus and parainfluenza-3 virus in seropositive children. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2009; **28**: 655–658.
 128. Bernstein DI, Malkin E, Abughali N, *et al.* Phase 1 study of the safety and immunogenicity of a live, attenuated respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3 vaccine in seronegative children. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2012; **31**: 109–114.
 129. Slobod KS, Shenep JL, Lujan-Zilbermann J, *et al.* Safety and immunogenicity of intranasal murine parainfluenza virus type 1 (Sendai virus) in healthy human adults. *Vaccine* 2004; **22**: 3182–3186.
 130. Jones B, Zhan X, Mishin V, *et al.* Human PIV-2 recombinant Sendai virus (rSeV) elicits durable immunity and combines with two additional rSeVs to protect against hPIV-1, hPIV-2, hPIV-3, and RSV. *Vaccine* 2009; **27**: 1848–1857.
 131. Zhan X, Hurwitz JL, Krishnamurthy S, *et al.* Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein expressed by recombinant Sendai virus elicits B-cell and T-cell responses in cotton rats and confers protection against RSV subtypes A and B. *Vaccine* 2007; **25**: 8782–8793.
 132. Zhan X, Slobod KS, Krishnamurthy S, *et al.* Sendai virus recombinant vaccine expressing hPIV-3 HN or F elicits protective immunity and combines with a second recombinant to prevent hPIV-1, hPIV-3 and RSV infections. *Vaccine* 2008; **26**: 3480–3488.
 133. Jones BG, Sealy R, Rudraraju R, *et al.* Sendai virus-based RSV vaccine protects African green monkeys from RSV infection. *Vaccine* 2012; **30**: 959–968.
 134. Nelson CB, Pomeroy BS, Schroll K, *et al.* An outbreak of conjunctivitis due to Newcastle disease virus (NDV) occurring in poultry workers. *American Journal of Public Health and the Nation's Health* 1952; **42**: 672–678.
 135. Bukreyev A, Huang Z, Yang L, *et al.* Recombinant Newcastle disease virus expressing a foreign viral antigen is attenuated and highly immunogenic in primates. *Journal of Virology* 2005; **79**: 13275–13284.
 136. Dinapoli JM, Ward JM, Cheng L, *et al.* Delivery to the lower respiratory tract is required for effective immunization with Newcastle disease virus-vectored vaccines intended for humans. *Vaccine* 2009; **27**: 1530–1539.
 137. Teng MN, Whitehead SS, Bermingham A, *et al.* Recombinant respiratory syncytial virus that does not express the NS1 or M2-2 protein is highly attenuated and immunogenic in chimpanzees. *Journal of Virology* 2000; **74**: 9317–9321.

138. Karron RA, Wright PF, Belshe RB, *et al.* Identification of a recombinant live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate that is highly attenuated in infants. *Journal of Infectious Diseases* 2005; **191**: 1093–1104.
139. Wright PF, Karron RA, Madhi SA, *et al.* The interferon antagonist NS2 protein of respiratory syncytial virus is an important virulence determinant for humans. *Journal of Infectious Diseases* 2006; **193**: 573–581.
140. Wright PF, Karron RA, Belshe RB, *et al.* The absence of enhanced disease with wild type respiratory syncytial virus infection occurring after receipt of live, attenuated, respiratory syncytial virus vaccines. *Vaccine* 2007; **25**: 7372–7378.
141. Biacchesi S, Pham QN, Skiadopoulos MH, *et al.* Infection of nonhuman primates with recombinant human metapneumovirus lacking the SH, G, or M2-2 protein categorizes each as a nonessential accessory protein and identifies vaccine candidates. *Journal of Virology* 2005; **79**: 12608–12613.
142. Bao X, Liu T, Shan Y, *et al.* Human metapneumovirus glycoprotein G inhibits innate immune responses. *PLoS Pathogens* 2008; **4**: e1000077.
143. Ryder AB, Tollefson SJ, Podsiad AB, *et al.* Soluble recombinant human metapneumovirus G protein is immunogenic but not protective. *Vaccine* 2010; **28**: 4145–4152.
144. Pham QN, Biacchesi S, Skiadopoulos MH, *et al.* Chimeric recombinant human metapneumoviruses with the nucleoprotein or phosphoprotein open reading frame replaced by that of avian metapneumovirus exhibit improved growth in vitro and attenuation in vivo. *Journal of Virology* 2005; **79**: 15114–15122.
145. Biacchesi S, Murphy BR, Collins PL, *et al.* Frequent frameshift and point mutations in the SH gene of human metapneumovirus passaged in vitro. *Journal of Virology* 2007; **81**: 6057–6067.
146. Schmidt AC. Progress in respiratory virus vaccine development. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 2011; **32**: 527–540.
147. Tang RS, Mahmood K, Macphail M, *et al.* A host-range restricted parainfluenza virus type 3 (PIV3) expressing the human metapneumovirus (hMPV) fusion protein elicits protective immunity in African green monkeys. *Vaccine* 2005; **23**: 1657–1667.
148. Martinez-Sobrido L, Gitiban N, Fernandez-Sesma A, *et al.* Protection against respiratory syncytial virus by a recombinant Newcastle disease virus vector. *Journal of Virology* 2006; **80**: 1130–1139.
149. Sawada A, Komase K, Nakayama T. AIK-C measles vaccine expressing fusion protein of respiratory syncytial virus induces protective antibodies in cotton rats. *Vaccine* 2011; **29**: 1481–1490.
150. Mcginnes LW, Gravel KA, Finberg RW, *et al.* Assembly and immunological properties of Newcastle disease virus-like particles containing the respiratory syncytial virus F and G proteins. *Journal of Virology* 2011; **85**: 366–377.
151. Mcginnes LW, Pantua H, Laliberte JP, *et al.* Assembly and biological and immunological properties of Newcastle disease virus-like particles. *Journal of Virology* 2010; **84**: 4513–4523.
152. Fu Y, He J, Zheng X, *et al.* Intranasal immunization with a replication-deficient adenoviral vector expressing the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus elicits protective immunity in BALB/c mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009; **381**: 528–532.
153. Schmidt AC. Progress in respiratory virus vaccine development. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 2007; **28**: 243–252.
154. Bennett JV, Fernandez De Castro J, Valdespino-Gomez JL, *et al.* Aerosolized measles and measles-rubella vaccines induce better measles antibody booster responses than injected vaccines: randomized trials in Mexican schoolchildren. *Bulletin of the World Health Organization* 2002; **80**: 806–812.
155. Durando P, Iudici R, Alicino C, *et al.* Adjuvants and alternative routes of administration towards the development of the ideal influenza vaccine. *Human Vaccines* 2011; **7** (Suppl): 29–40.
156. Mastelic B, Ahmed S, Egan WM, *et al.* Mode of action of adjuvants: implications for vaccine safety and design. *Biologicals* 2010; **38**: 594–601.
157. Schmidt AC, Schaap-Nutt A, Bartlett EJ, *et al.* Progress in the development of human parainfluenza virus vaccines. *Expert Review of Respiratory Medicine* 2011; **5**: 515–526.

BILAN ET PERSPECTIVES GENERALES

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'opportunité d'étudier des mécanismes viraux d'entrée cellulaire, en me focalisant notamment sur la glycoprotéine F de plusieurs paramyxovirus respiratoires tels que hPIV-2, PIV-5 et hMPV.

Un résidu (T96) de la sous-unité F₂ de la protéine F de hPIV-2 a été identifié parmi des souches cliniques circulantes, pour son rôle dans la fusion membranaire et dans l'interaction F/HN. Plusieurs hypothèses ont pu être dégagées quant à l'implication exacte des résidus A/T96 : 1) ils pourraient perturber ou favoriser l'activité du domaine CBF2 impliqué dans la fusion et l'interaction F/HN et/ou 2) interagir avec le peptide fusion de la sous-unité F₁.

Dans le cadre de la seconde hypothèse, l'action de HN pourrait permettre la libération du peptide fusion, et donc contribuer à la fusion membranaire, HN promouvant alors activement la fusion. *A contrario*, HN pourrait interagir plus efficacement avec la thréonine que l'alanine en position 96, et empêcherait la fusion tant qu'elle n'est pas elle-même activée, selon la théorie « *spring loaded* » (Figure 9). Des expériences complémentaires sont donc nécessaires pour davantage caractériser ces souches variantes cliniques et mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à leur phénotype clinique.

Pour la seconde étude, j'ai eu l'opportunité de mener une partie de mes expérimentations à Québec au Canada, au sein du laboratoire du Dr Guy Boivin. Différentes mutations et combinaisons de mutations sur la protéine F de hMPV ont été évaluées. De cet ensemble de mutants F construits, seuls ceux comportant des mutations des résidus, en position *a* et *d* des domaines HR par un acide-aminé valine hydrophobe, permettent d'observer une augmentation de la fusion membranaire lorsque la GP F est exprimée dans des cellules de la lignée LLC-MK2. Ce résultat conforte celui obtenu dans notre laboratoire pour PIV-5 (Terrier *et al.* 2009). Il permet d'imaginer l'utilisation de telles protéines recombinantes optimisées comme outils thérapeutiques, dans des vecteurs oncolytiques (Durupt *et al.* 2012), (article 3) ou le développement de nouveaux vaccins atténués contre les paramyxovirus respiratoires.

Malgré nos efforts et la construction d'un virus recombinant hMPV exprimant la GFP et la protéine F comportant les mutations T144V, dans la région HRA, et S470V et S477V dans la région HRB, nous n'avons obtenus qu'un virus ayant une faible capacité répliquative voire nulle. Ceci remet en partie en cause nos objectifs de développement de candidats vaccins optimisés. D'autres constructions, ayant un nombre réduit de mutation, sont en cours d'évaluation.

Après la comparaison de la séquence de la protéine F de différents paramyxovirus répliquatifs, il est apparu que les positions correspondant à nos mutations étaient très conservées. Notamment le résidu T144, mais aussi les résidus S/A470 et S/A477. Cette faible variabilité semble indiquer une pression de sélection sur ces résidus. Nous pouvons également imaginer que les mutations hydrophobes que nous avons effectuées puissent déstabiliser la structure de F. Elles provoqueraient et/ou favoriseraient donc des changements de conformation de la protéine dans sa forme de post-fusion. Cela pourrait conduire ainsi à la formation de particules virales défectueuses. Cette protéine triplement mutée pourrait de ce fait être utilisée dans le cadre d'un vaccin vivant atténué. Il faudra cependant évaluer si cette forme de post-fusion de la GP F reste véritablement immunogène et si elle ne perturbe pas la production du vaccin multivalent, par exemple.

J'ai aussi eu la chance de participer à la création d'un nouveau vecteur anti-tumoral basé sur un virus adénoviral répliquatif. Nous avons démontré que la protéine F PIV5, exprimée dans des lignées cellulaires et des tumeurs *in vivo* chez des souris immunodéficientes et des hamsters immunocompétents, était très cytotoxique et permettait une stabilisation de la taille de la tumeur. Cet outil doit cependant être amélioré, et notamment être exploité dans un vecteur oncolytique clinique plus adapté. L'utilisation d'une F hMPV optimisée est une perspective intéressante du fait de son potentiel immunogène plus important.

Au final, mon travail doctoral présente une certaine cohérence dans sa démarche de développement de nouveaux outils moléculaires à visée thérapeutique et/ou vaccinale, en se basant sur les propriétés des protéines F des paramyxovirus. L'article 1 permet d'identifier des mutations d'intérêt à partir de souches circulantes de hPIV-2. L'article 2 a permis de créer une protéine F à très fort potentiel fusogène, lorsqu'exprimée dans des cellules *in vitro*, mais peut-être inactive à la surface des particules virales. Cette dernière propriété pourrait être un atout dans la construction d'un vaccin vivant atténué recombinant. L'article 3 présente l'utilisation d'une protéine F recombinante à haut potentiel fusogène dans un vecteur oncolytique.

D'un point de vue plus fondamental, les approches méthodologiques menées au cours de mon travail doctoral peuvent et pourront permettre de contribuer à une meilleure compréhension du fonctionnement de la protéine F. Son activation par la protéine HN et l'importance de l'équilibre des interactions entre les différents domaines HR sont ainsi mieux connus.

CONCLUSION GENERALE

Moins de soixante ans après la découverte des virus CCA (hRSV) et CA (hPIV-2), et grâce au développement des outils de biologie moléculaire, les paramyxovirus sont désormais une famille de virus mieux connue et bien étudiée. Malgré la connaissance de plus en plus développée de ces virus, il semble qu'il y ait toujours des zones d'ombre. Le fait qu'un virus aussi important que hMPV n'ait été découvert qu'en 2001 en témoigne.

La protéine F des paramyxovirus est de mieux en mieux connue avec notamment de plus en plus de structures disponibles pour les différentes conformations de la protéine. Paradoxalement, malgré la finesse de la caractérisation de cette glycoprotéine, beaucoup de questions restent sans réponse. Comment est-elle activée par sa protéine partenaire, la protéine d'attachement ? Quels récepteurs cellulaires peut-elle reconnaître ? Par quels mécanismes les changements de conformations amenant à la fusion sont-ils induits ? Comment ces glycoprotéines sont-elles organisées à la surface du virion ?

La connaissance du fonctionnement exact de la protéine F permettra sûrement de mieux évaluer l'une des étapes fondamentales dans le cycle viral : l'entrée de la particule virale dans la cellule. L'ensemble des découvertes sur cette protéine permettra *in fine* de mieux comprendre les mécanismes de l'infection et potentiellement de développer des outils thérapeutiques plus robustes. L'importance de la sous-unité F₂ de la protéine commence seulement à être comprise et semble avoir un rôle majeur dans l'activation de la fusion, peut-être en collaboration avec la glycoprotéine d'attachement. De plus la protéine est tributaire d'un équilibre fragile entre ses différents domaines, et l'augmentation artificielle de l'interaction entre les deux domaines HR semble perturber drastiquement l'entrée de la particule virale dans la cellule.

Néanmoins, ces connaissances, même parcellaires, sur la protéine F permettent d'imaginer de nouveaux outils moléculaires. L'utilisation et l'optimisation de cette protéine dans des vaccins recombinants, ou des vecteurs anticancéreux, est prometteuse. Les nombreux travaux de recherche en cours permettent d'espérer de nouveaux outils au service de la santé humaine et animale.

BIBLIOGRAPHIE

1. Aguilar, H. C., Z. A. Ataman, V. Aspericueta, A. Q. Fang, M. Stroud, O. A. Negrete, R. A. Kammerer and B. Lee (2009). "A novel receptor-induced activation site in the Nipah virus attachment glycoprotein (G) involved in triggering the fusion glycoprotein (F)." J Biol Chem **284**(3): 1628-1635.
2. Aguilar, H. C., K. A. Matreyek, C. M. Filone, S. T. Hashimi, E. L. Levroney, O. A. Negrete, A. Bertolotti-Ciarlet, D. Y. Choi, I. McHardy, J. A. Fulcher, S. V. Su, M. C. Wolf, L. Kohatsu, L. G. Baum and B. Lee (2006). "N-glycans on Nipah virus fusion protein protect against neutralization but reduce membrane fusion and viral entry." J Virol **80**(10): 4878-4889.
3. Ahmed, A., D. Jevremovic, K. Suzuki, T. Kottke, J. Thompson, S. Emery, K. Harrington, A. Bateman and R. Vile (2003). "Intratumoral expression of a fusogenic membrane glycoprotein enhances the efficacy of replicating adenovirus therapy." Gene Ther **10**(19): 1663-1671.
4. Alemany, R. (2009). "Designing adenoviral vectors for tumor-specific targeting." Methods Mol Biol **542**: 57-74.
5. Alemany, R., C. Balague and D. T. Curiel (2000). "Replicative adenoviruses for cancer therapy." Nat Biotechnol **18**(7): 723-727.
6. Ali, A., A. R. Khowaja, M. Z. Bashir, F. Aziz, S. Mustafa and A. Zaidi (2013). "Role of Human Metapneumovirus, Influenza A Virus and Respiratory Syncytial Virus in Causing WHO-Defined Severe Pneumonia in Children in a Developing Country." PLoS One **8**(9): e74756.
7. Allen, C., C. McDonald, C. Giannini, K. W. Peng, G. Rosales, S. J. Russell and E. Galanis (2004). "Adenoviral vectors expressing fusogenic membrane glycoproteins activated via matrix metalloproteinase cleavable linkers have significant antitumor potential in the gene therapy of gliomas." J Gene Med **6**(11): 1216-1227.
8. Andrewes, C. H., F. B. Bang and F. M. Burnet (1955). "A short description of the Myxovirus group (influenza and related viruses)." Virology **1**(2): 176-184.
9. Angarita, F. A., S. A. Acuna, K. Ottolino-Perry, S. Zerhouni and J. A. McCart (2013). "Mounting a strategic offense: fighting tumor vasculature with oncolytic viruses." Trends Mol Med **19**(6): 378-392.
10. Bao, X., T. Liu, Y. Shan, K. Li, R. P. Garofalo and A. Casola (2008). "Human Metapneumovirus Glycoprotein G Inhibits Innate Immune Responses." PLoS Pathog **4**(5): e1000077.

11. Barocchi, M. A., V. Masignani and R. Rappuoli (2005). "Opinion: Cell entry machines: a common theme in nature?" Nat Rev Microbiol **3**(4): 349-358.

12. Bartlett, E. J., A. M. Cruz, J. Esker, A. Castano, H. Schomacker, S. R. Surman, M. Hennessey, J. Boonyaratanakornkit, R. J. Pickles, P. L. Collins, B. R. Murphy and A. C. Schmidt (2008). "Human parainfluenza virus type 1 C proteins are nonessential proteins that inhibit the host interferon and apoptotic responses and are required for efficient replication in nonhuman primates." J Virol **82**(18): 8965-8977.

13. Bastien, N., L. Liu, D. Ward, T. Taylor and Y. Li (2004). "Genetic variability of the G glycoprotein gene of human metapneumovirus." J Clin Microbiol **42**(8): 3532-3537.

14. Bastien, N., S. Normand, T. Taylor, D. Ward, T. C. Peret, G. Boivin, L. J. Anderson and Y. Li (2003). "Sequence analysis of the N, P, M and F genes of Canadian human metapneumovirus strains." Virus Res **93**(1): 51-62.

15. Bateman, A., F. Bullough, S. Murphy, L. Emiliusen, D. Lavillette, F. L. Cosset, R. Cattaneo, S. J. Russell and R. G. Vile (2000). "Fusogenic membrane glycoproteins as a novel class of genes for the local and immune-mediated control of tumor growth." Cancer Res **60**(6): 1492-1497.

16. Bateman, A. R., K. J. Harrington, T. Kottke, A. Ahmed, A. A. Melcher, M. J. Gough, E. Linardakis, D. Riddle, A. Dietz, C. M. Lohse, S. Strome, T. Peterson, R. Simari and R. G. Vile (2002). "Viral fusogenic membrane glycoproteins kill solid tumor cells by nonapoptotic mechanisms that promote cross presentation of tumor antigens by dendritic cells." Cancer Res **62**(22): 6566-6578.

17. Batra, S. K., R. S. Metzgar, A. J. Worlock and M. A. Hollingsworth (1992). "Expression of the human MUC1 mucin cDNA in a hamster pancreatic tumor cell line HP-1." Int J Pancreatol **12**(3): 271-283.

18. Belshe, R. B., F. K. Newman, T. F. Tsai, R. A. Karron, K. Reisinger, D. Robertson, H. Marshall, R. Schwartz, J. King, F. W. Henderson, W. Rodriguez, J. M. Severs, P. F. Wright, H. Keyserling, G. A. Weinberg, K. Bromberg, R. Loh, P. Sly, P. McIntyre, J. B. Ziegler, J. Hackell, A. Deatly, A. Georgiu, M. Paschalis, S. L. Wu, J. M. Tatem, B. Murphy and E. Anderson (2004). "Phase 2 evaluation of parainfluenza type 3 cold passage mutant 45 live attenuated vaccine in healthy children 6-18 months old." J Infect Dis **189**(3): 462-470.

19. Bennett, J. V., J. Fernandez de Castro, J. L. Valdespino-Gomez, M. d. L. Garcia-Garcia, R. Islas-Romero, G. Echaniz-Aviles, A. Jimenez-Corona and J. Sepulveda-Amor (2002). "Aerosolized measles and measles-rubella vaccines induce better measles antibody booster responses than injected vaccines: randomized trials in Mexican schoolchildren." Bulletin of the World Health Organization **80**: 806-812.

20. Bermingham, A. and P. L. Collins (1999). "The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 11259-11264.
21. Biacchesi, S., B. R. Murphy, P. L. Collins and U. J. Buchholz (2007). "Frequent frameshift and point mutations in the SH gene of human metapneumovirus passaged in vitro." J Virol **81**(11): 6057-6067.
22. Biacchesi, S., Q. N. Pham, M. H. Skiadopoulos, B. R. Murphy, P. L. Collins and U. J. Buchholz (2005). "Infection of nonhuman primates with recombinant human metapneumovirus lacking the SH, G, or M2-2 protein categorizes each as a nonessential accessory protein and identifies vaccine candidates." J Virol **79**(19): 12608-12613.
23. Biacchesi, S., M. H. Skiadopoulos, G. Boivin, C. T. Hanson, B. R. Murphy, P. L. Collins and U. J. Buchholz (2003). "Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups." Virology **315**(1): 1-9.
24. Biacchesi, S., M. H. Skiadopoulos, L. Yang, E. W. Lamirande, K. C. Tran, B. R. Murphy, P. L. Collins and U. J. Buchholz (2004). "Recombinant human Metapneumovirus lacking the small hydrophobic SH and/or attachment G glycoprotein: deletion of G yields a promising vaccine candidate." J Virol **78**(23): 12877-12887.
25. Bishop, K. A., T. S. Stantchev, A. C. Hickey, D. Khetawat, K. N. Bossart, V. Krasnoperov, P. Gill, Y. R. Feng, L. Wang, B. T. Eaton, L. F. Wang and C. C. Broder (2007). "Identification of Hendra virus G glycoprotein residues that are critical for receptor binding." J Virol **81**(11): 5893-5901.
26. Boivin, G., Y. Abed, G. Pelletier, L. Ruel, D. Moisan, S. Cote, T. C. Peret, D. D. Erdman and L. J. Anderson (2002). "Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups." J Infect Dis **186**(9): 1330-1334.
27. Boivin, G., G. De Serres, S. Cote, R. Gilca, Y. Abed, L. Rochette, M. G. Bergeron and P. Dery (2003). "Human metapneumovirus infections in hospitalized children." Emerg Infect Dis **9**(6): 634-640.
28. Boivin, G., G. De Serres, M. E. Hamelin, S. Cote, M. Argouin, G. Tremblay, R. Maranda-Aubut, C. Sauvageau, M. Ouakki, N. Boulianne and C. Couture (2007). "An outbreak of severe respiratory tract infection due to human metapneumovirus in a long-term care facility." Clin Infect Dis **44**(9): 1152-1158.
29. Bosch, B. J., W. Bartelink and P. M. J. (2008). "Cathepsin L functionally cleaves the severe acute respiratory syndrome coronavirus class I fusion protein upstream of rather than adjacent to the fusion peptide." J Virol **82**: 8887-8890.

30. Bose, S., A. Zokarkar, B. D. Welch, G. P. Leser, T. S. Jardetzky and R. A. Lamb (2012). "Fusion activation by a headless parainfluenza virus 5 hemagglutinin-neuraminidase stalk suggests a modular mechanism for triggering." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(39): E2625-2634.
31. Bossert, B., S. Marozin and K. K. Conzelmann (2003). "Nonstructural proteins NS1 and NS2 of bovine respiratory syncytial virus block activation of interferon regulatory factor 3." J Virol **77**(16): 8661-8668.
32. Bousse, T., T. Takimoto, W. L. Gorman, T. Takahashi and A. Portner (1994). "Regions on the hemagglutinin-neuraminidase proteins of human parainfluenza virus type-1 and Sendai virus important for membrane fusion." Virology **204**(2): 506-514.
33. Brade, A. M., P. Szmitko, D. Ngo, F. F. Liu and H. J. Klamut (2003). "Heat-directed tumor cell fusion." Hum Gene Ther **14**(5): 447-461.
34. Brideau, R. J., N. L. Oien, D. J. Lehman, F. L. Homa and M. W. Wathen (1993). "Protection of cotton rats against human parainfluenza virus type 3 by vaccination with a chimeric FHN subunit glycoprotein." J Gen Virol **74** (Pt 3): 471-477.
35. Bukreyev, A., S. S. Whitehead, B. R. Murphy and P. L. Collins (1997). "Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse." J Virol **71**(12): 8973-8982.
36. Buynak, E. B. and M. R. Hilleman (1966). "Live attenuated mumps virus vaccine. 1. Vaccine development." Proc Soc Exp Biol Med **123**(3): 768-775.
37. Buynak, E. B., R. E. Weibel, J. E. Whitman, J. Stokes and M. R. Hilleman (1969). "Combined live measles, mumps, and rubella virus vaccines." JAMA **207**(12): 2259-2262.
38. Calain, P. and L. Roux (1993). "The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA." J Virol **67**(8): 4822-4830.
39. Cantin, C., J. Holguera, L. Ferreira, E. Villar and I. Munoz-Barroso (2007). "Newcastle disease virus may enter cells by caveolae-mediated endocytosis." J Gen Virol **88**(Pt 2): 559-569.
40. Carbonell-Estrany, X., E. A. Simoes, R. Dagan, C. B. Hall, B. Harris, M. Hultquist, E. M. Connor and G. A. Losonsky (2010). "Motavizumab for prophylaxis of respiratory syncytial virus in high-risk children: a noninferiority trial." Pediatrics **125**(1): e35-51.

41. CDC. (2005, July 2, 2012). "SARS Basics Fact Sheet." Article récupéré le 12 Décembre 2012, depuis l'adresse web <http://www.cdc.gov/sars/about/fs-SARS.html>.
42. CDC (2013). "Middle East Respiratory Syndrome (MERS) FAQ."
43. Chakrabarti, S., K. E. Collingham, K. Holder, S. Oyaide, D. Pillay and D. W. Milligan (2000). "Parainfluenza virus type 3 infections in hematopoietic stem cell transplant recipients: response to ribavirin therapy." Clin Infect Dis **31**(6): 1516-1518.
44. Chang, A. and R. E. Dutch (2012). "Paramyxovirus fusion and entry: multiple paths to a common end." Viruses **4**(4): 613-636.
45. Chang, A., C. Masante, U. J. Buchholz and R. E. Dutch (2012). "Human Metapneumovirus (HMPV) Binding and Infection Are Mediated by Interactions between the HMPV Fusion Protein and Heparan Sulfate." J Virol **86**(6): 3230-3243.
46. Chanock, R. and L. Finberg (1957). "Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children." Am J Hyg **66**(3): 291-300.
47. Chanock, R., B. Roizman and R. Myers (1957). "Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization." Am J Hyg **66**(3): 281-290.
48. Chanock, R. M. (1956). "Association of a new type of cytopathogenic myxovirus with infantile croup." J Exp Med **104**(4): 555-576.
49. Chanock, R. M., R. H. Parrott, K. Cook, B. E. Andrews, J. A. Bell, T. Reichelderfer, A. Z. Kapikian, F. M. Mastrota and R. J. Huebner (1958). "Newly recognized myxoviruses from children with respiratory disease." N Engl J Med **258**(5): 207-213.
50. Chatziandreou, N., N. Stock, D. Young, J. Andrejeva, K. Hagmaier, D. J. McGeoch and R. E. Randall (2004). "Relationships and host range of human, canine, simian and porcine isolates of simian virus 5 (parainfluenza virus 5)." J Gen Virol **85**(Pt 10): 3007-3016.
51. Cheng, C., J. G. Gall, M. Nason, C. R. King, R. A. Koup, M. Roederer, M. J. McElrath, C. A. Morgan, G. Churchyard, L. R. Baden, A. C. Duerr, M. C. Keefer, B. S. Graham and G. J. Nabel (2010). "Differential specificity and immunogenicity of adenovirus type 5 neutralizing antibodies elicited by natural infection or immunization." J Virol **84**(1): 630-638.

52. Chernomordik, L., A. Chanturiya, J. Green and J. Zimmerberg (1995). "The hemifusion intermediate and its conversion to complete fusion: regulation by membrane composition." Biophys J **69**: 922-929.
53. Chiu, S. S., K. H. Chan, H. Chen, B. W. Young, W. Lim, W. H. Wong and J. S. Peiris (2010). "Virologically confirmed population-based burden of hospitalization caused by respiratory syncytial virus, adenovirus, and parainfluenza viruses in children in Hong Kong." Pediatr Infect Dis J **29**(12): 1088-1092.
54. Choi, I. K. and C. O. Yun (2013). "Recent developments in oncolytic adenovirus-based immunotherapeutic agents for use against metastatic cancers." Cancer Gene Ther **20**(2): 70-76.
55. Cilla, G., E. Onate, E. G. Perez-Yarza, M. Montes, D. Vicente and E. Perez-Trallero (2009). "Hospitalization rates for human metapneumovirus infection among 0- to 3-year-olds in Gipuzkoa (Basque Country), Spain." Epidemiol Infect **137**(1): 66-72.
56. Coates, H. V., D. W. Alling and R. M. Chanock (1966). "An antigenic analysis of respiratory syncytial virus isolates by a plaque reduction neutralization test." Am J Epidemiol **83**(2): 299-313.
57. Cody, J. J. and J. T. Douglas (2009). "Armed replicating adenoviruses for cancer virotherapy." Cancer Gene Ther **16**(6): 473-488.
58. Collins, M. S., J. B. Bashiruddin and D. J. Alexander (1993). "Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity." Arch Virol **128**(3-4): 363-370.
59. Collins, P. L. and J. E. Crowe (2007). Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus. Fields Virology. D. M. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. **2**: 1601-1646.
60. Collins, P. L. and J. A. Melero (2011). "Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: Still crazy after all these years." Virus Res **162**(1-2): 80-99.
61. Connaris, H., T. Takimoto, R. Russell, S. Crennell, I. Moustafa, A. Portner and G. Taylor (2002). "Probing the sialic acid binding site of the hemagglutinin-neuraminidase of Newcastle disease virus: identification of key amino acids involved in cell binding, catalysis, and fusion." J Virol **76**(4): 1816-1824.
62. Connolly, S. A. and R. A. Lamb (2006). "Paramyxovirus fusion: real-time measurement of parainfluenza virus 5 virus-cell fusion." Virology **355**(2): 203-212.

63. Connolly, S. A., G. P. Leser, T. S. Jardetzky and R. A. Lamb (2009). "Bimolecular Complementation of Paramyxovirus Fusion and Hemagglutinin-Neuraminidase Proteins Enhances Fusion: Implications for the Mechanism of Fusion Triggering." Journal of Virology **83**(21): 10857-10868.
64. Connor, E. E., J. Mwamuka, A. Gole, C. J. Murphy and M. D. Wyatt (2005). "Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity." Small **1**(3): 325-327.
65. Cseke, G., M. S. Maginnis, R. G. Cox, S. J. Tollefson, A. B. Podsiad, D. W. Wright, T. S. Dermody and J. V. Williams (2009). "Integrin alphavbeta1 promotes infection by human metapneumovirus." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(5): 1566-1571.
66. Cseke, G., D. W. Wright, S. J. Tollefson, J. E. Johnson, J. E. Crowe, Jr. and J. V. Williams (2007). "Human metapneumovirus fusion protein vaccines that are immunogenic and protective in cotton rats." J Virol **81**(2): 698-707.
67. De Clercq, E. (1993). "Antiviral agents: characteristic activity spectrum depending on the molecular target with which they interact." Adv Virus Res **42**: 1-55.
68. De, M., P. S. Ghosh and V. M. Rotello (2008). "Applications of Nanoparticles in Biology." Advanced Materials **20**(22): 4225-4241.
69. de Swart, R. L., B. G. van den Hoogen, T. Kuiken, S. Herfst, G. van Amerongen, S. Yuksel, L. Sprong and A. D. Osterhaus (2007). "Immunization of macaques with formalin-inactivated human metapneumovirus induces hypersensitivity to hMPV infection." Vaccine **25**(51): 8518-8528.
70. Deffrasnes, C., M. H. Cavanagh, N. Goyette, K. Cui, Q. Ge, S. Seth, M. V. Templin, S. C. Quay, P. H. Johnson and G. Boivin (2008). "Inhibition of human metapneumovirus replication by small interfering RNA." Antivir Ther **13**(6): 821-832.
71. Deffrasnes, C., M. E. Hamelin, G. A. Prince and G. Boivin (2008). "Identification and evaluation of a highly effective fusion inhibitor for human metapneumovirus." Antimicrob Agents Chemother **52**(1): 279-287.
72. Del Angel, V. D., F. Dupuis, J.-P. Mornon and I. Callebaut (2002). "Viral fusion peptides and identification of membrane-interacting segments." Biochem Biophys Res Commun **293**: 1153-1160.
73. Delgado, M. F., S. Coviello, A. C. Monsalvo, G. A. Melendi, J. Z. Hernandez, J. P. Batalle, L. Diaz, A. Trento, H. Y. Chang, W. Mitzner, J. Ravetch, J. A. Melero, P. M. Irusta

and F. P. Polack (2009). "Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease." Nat Med **15**(1): 34-41.

74. DeVincenzo, J., R. Lambkin-Williams, T. Wilkinson, J. Cehelsky, S. Nochur, E. Walsh, R. Meyers, J. Gollob and A. Vaishnav (2010). "A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(19): 8800-8805.

75. DiNapoli, J. M., J. M. Ward, L. Cheng, L. Yang, S. Elankumaran, B. R. Murphy, S. K. Samal, P. L. Collins and A. Bukreyev (2009). "Delivery to the lower respiratory tract is required for effective immunization with Newcastle disease virus-vectored vaccines intended for humans." Vaccine **27**(10): 1530-1539.

76. Doggett, J. E., D. Taylor-Robinson and R. G. Gallop (1968). "A study of an inhibitor in bovine serum active against respiratory syncytial virus." Arch Gesamte Virusforsch **23**(1): 126-137.

77. Domingo, E. and J. J. Holland (1997). "RNA virus mutations and fitness for survival." Annu Rev Microbiol **51**: 151-178.

78. Dorr, P., M. Westby, S. Dobbs, P. Griffin, B. Irvine, M. Macartney, J. Mori, G. Rickett, C. Smith-Burchnell, C. Napier, R. Webster, D. Armour, D. Price, B. Stammen, A. Wood and M. Perros (2005). "Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity." Antimicrob Agents Chemother **49**: 4721-4732.

79. Douglas, J. L., M. L. Panis, E. Ho, K. Y. Lin, S. H. Krawczyk, D. M. Grant, R. Cai, S. Swaminathan, X. Chen and T. Cihlar (2005). "Small molecules VP-14637 and JNJ-2408068 inhibit respiratory syncytial virus fusion by similar mechanisms." Antimicrob Agents Chemother **49**(6): 2460-2466.

80. Durando, P., R. Iudici, C. Alicino, M. Alberti, D. de Florentis, F. Ansaldi and G. Icardi (2011). "Adjuvants and alternative routes of administration towards the development of the ideal influenza vaccine." Hum Vaccin **7 Suppl**: 29-40.

81. Durbin, A. P., J. W. Siew, B. R. Murphy and P. L. Collins (1997). "Minimum protein requirements for transcription and RNA replication of a minigenome of human parainfluenza virus type 3 and evaluation of the rule of six." Virology **234**(1): 74-83.

82. Durupt, F., D. Koppers-Lalic, B. Balme, L. Budel, O. Terrier, B. Lina, L. Thomas, R. C. Hoeben and M. Rosa-Calatrava (2012). "The chicken chorioallantoic membrane tumor assay as model for qualitative testing of oncolytic adenoviruses." Cancer Gene Ther **19**(1): 58-68.

83. Dwyer, J. J., K. L. Wilson, D. K. Davison, S. A. Freel, J. E. Sedorff, S. A. Wring, N. A. Tvermoes, T. J. Matthews, M. L. Greenberg and M. K. Delmedico (2007). "Design of helical, oligomeric HIV-1 fusion inhibitor peptides with potent activity against enfuvirtide-resistant virus." Proc Natl Acad Sci U S A **104**: 12772-12777.
84. Easton, A. J., J. B. Domachowske and H. F. Rosenberg (2004). "Animal pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis." Clin Microbiol Rev **17**(2): 390-412.
85. Falsey, A. R. (2008). "Human metapneumovirus infection in adults." Pediatr Infect Dis J **27**(10 Suppl): S80-83.
86. Falsey, A. R., D. Erdman, L. J. Anderson and E. E. Walsh (2003). "Human metapneumovirus infections in young and elderly adults." J Infect Dis **187**(5): 785-790.
87. Fearn, R. and P. L. Collins (1999). "Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription." J Virol **73**(7): 5852-5864.
88. Feltes, T. F., A. K. Cabalka, H. C. Meissner, F. M. Piazza, D. A. Carlin, F. H. Top, Jr., E. M. Connor and H. M. Sondheimer (2003). "Palivizumab prophylaxis reduces hospitalization due to respiratory syncytial virus in young children with hemodynamically significant congenital heart disease." J Pediatr **143**(4): 532-540.
89. Feltes, T. F., H. M. Sondheimer, R. M. Tulloh, B. S. Harris, K. M. Jensen, G. A. Losonsky and M. P. Griffin (2011). "A Randomized Controlled Trial of Motavizumab Versus Palivizumab for the Prophylaxis of Serious Respiratory Syncytial Virus Disease in Children With Hemodynamically Significant Congenital Heart Disease." Pediatr Res **70**(2): 186-191.
90. Ferm, V. H., C. Willhite and L. Kilham (1978). "Teratogenic effects of ribavirin on hamster and rat embryos." Teratology **17**(1): 93-101.
91. Feuillet, F., B. Lina, M. Rosa-Calatrava and G. Boivin (2011). "Ten years of human metapneumovirus research." J Clin Virol: In press. doi:10.1016/j.jcv.2011.1010.1000.
92. Feuillet, F., M. Rosa-Calatrava and G. Boivin (2011). "Le métapneumovirus humain, le point dix années après sa découverte. Caractéristiques génomiques, virologiques et avancées thérapeutiques." Virologie **15**(4): 235-250.
93. Fouchier, R. A., T. Kuiken, M. Schutten, G. van Amerongen, G. J. van Doornum, B. G. van den Hoogen, M. Peiris, W. Lim, K. Stohr and A. D. Osterhaus (2003). "Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus." Nature **423**(6937): 240.

94. Fu, Y., J. He, X. Zheng, Q. Wu, M. Zhang, X. Wang, Y. Wang, C. Xie, Q. Tang, W. Wei, M. Wang, J. Song, J. Qu, Y. Zhang and T. Hong (2009). "Intranasal immunization with a replication-deficient adenoviral vector expressing the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus elicits protective immunity in BALB/c mice." Biochem Biophys Res Commun **381**(4): 528-532.
95. Fulginiti, V. A., J. J. Eller, O. F. Sieber, J. W. Joyner, M. Minamitani and G. Meiklejohn (1969). "Respiratory virus immunization. I. A field trial of two inactivated respiratory virus vaccines; an aqueous trivalent parainfluenza virus vaccine and an alum-precipitated respiratory syncytial virus vaccine." Am J Epidemiol **89**(4): 435-448.
96. Galanis, E., A. Bateman, K. Johnson, R. M. Diaz, C. D. James, R. Vile and S. J. Russell (2001). "Use of viral fusogenic membrane glycoproteins as novel therapeutic transgenes in gliomas." Hum Gene Ther **12**(7): 811-821.
97. Gallili, G. E. and D. Ben-Nathan (1998). "Newcastle disease vaccines." Biotechnol Adv **16**(2): 343-366.
98. Garcia, C. G., R. Bhore, A. Soriano-Fallas, M. Trost, R. Chason, O. Ramilo and A. Mejias (2010). "Risk factors in children hospitalized with RSV bronchiolitis versus non-RSV bronchiolitis." Pediatrics **126**(6): e1453-1460.
99. Gardner, A. E., K. L. Martin and R. E. Dutch (2007). "A conserved region between the heptad repeats of paramyxovirus fusion proteins is critical for proper F protein folding." Biochemistry **46**(17): 5094-5105.
100. Glezen, W. P., A. L. Frank, L. H. Taber and J. A. Kasel (1984). "Parainfluenza virus type 3: seasonality and risk of infection and reinfection in young children." J Infect Dis **150**(6): 851-857.
101. Glezen, W. P., L. H. Taber, A. L. Frank and J. A. Kasel (1986). "Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus." Am J Dis Child **140**(6): 543-546.
102. Gomez-Trevino, A., S. Castel, C. Lopez-Iglesias, N. Cortadellas, J. Comas-Riu and E. Mercade (2003). "Effects of adenovirus-mediated SV5 fusogenic glycoprotein expression on tumor cells." J Gene Med **5**(6): 483-492.
103. Gravel, K. A. and T. G. Morrison (2003). "Interacting domains of the HN and F proteins of newcastle disease virus." J Virol **77**(20): 11040-11049.
104. Griffin, D. E., W. H. Lin and C. H. Pan (2012). "Measles virus, immune control, and persistence." FEMS Microbiol Rev **36**(3): 649-662.

105. Griffin, D. E., C. H. Pan and W. J. Moss (2008). "Measles vaccines." Front Biosci **13**: 1352-1370.
106. Group", T. I.-R. S. (1998). "Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants." Pediatrics **102**(3 Pt 1): 531-537.
107. Guedan, S., D. Grases, J. J. Rojas, A. Gros, F. Vilardell, R. Vile, E. Mercade, M. Cascallo and R. Alemany (2012). "GALV expression enhances the therapeutic efficacy of an oncolytic adenovirus by inducing cell fusion and enhancing virus distribution." Gene Ther **19**(11): 1048-1057.
108. Guedan, S., A. Gros, M. Cascallo, R. Vile, E. Mercade and R. Alemany (2008). "Syncytia formation affects the yield and cytotoxicity of an adenovirus expressing a fusogenic glycoprotein at a late stage of replication." Gene Ther **15**(17): 1240-1245.
109. Habjan, M., N. Penski, M. Spiegel and F. Weber (2008). "T7 RNA polymerase-dependent and -independent systems for cDNA-based rescue of Rift Valley fever virus." J Gen Virol **89**(Pt 9): 2157-2166.
110. Hall, C. B., R. G. Douglas, Jr. and J. M. Geiman (1980). "Possible transmission by fomites of respiratory syncytial virus." J Infect Dis **141**(1): 98-102.
111. Hamelin, M. E., C. Couture, M. Sackett, P. Kiener, J. Suzich, N. Ulbrandt and G. Boivin (2008). "The prophylactic administration of a monoclonal antibody against human metapneumovirus attenuates viral disease and airways hyperresponsiveness in mice." Antivir Ther **13**(1): 39-46.
112. Hamelin, M. E., C. Couture, M. K. Sackett and G. Boivin (2007). "Enhanced lung disease and Th2 response following human metapneumovirus infection in mice immunized with the inactivated virus." J Gen Virol **88**(Pt 12): 3391-3400.
113. Hamelin, M. E., C. Gagnon, G. A. Prince, P. Kiener, J. Suzich, N. Ulbrandt and G. Boivin (2010). "Prophylactic and therapeutic benefits of a monoclonal antibody against the fusion protein of human metapneumovirus in a mouse model." Antiviral Res **88**(1): 31-37.
114. Hamelin, M. E., G. A. Prince, A. M. Gomez, R. Kinkead and G. Boivin (2006). "Human metapneumovirus infection induces long-term pulmonary inflammation associated with airway obstruction and hyperresponsiveness in mice." J Infect Dis **193**(12): 1634-1642.

115. Hamelin, M. E., K. Yim, K. H. Kuhn, R. P. Cragin, M. Boukhvalova, J. C. Blanco, G. A. Prince and G. Boivin (2005). "Pathogenesis of human metapneumovirus lung infection in BALB/c mice and cotton rats." J Virol **79**(14): 8894-8903.
116. Harrison, S. C. (2008). "Viral membrane fusion." Nat Struct Mol Biol **15**(7): 690-698.
117. Hastie, E. and V. Z. Grdzlishvili (2012). "Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer." J Gen Virol **93**(Pt 12): 2529-2545.
118. He, B., G. P. Leser, R. G. Paterson and R. A. Lamb (1998). "The paramyxovirus SV5 small hydrophobic (SH) protein is not essential for virus growth in tissue culture cells." Virology **250**(1): 30-40.
119. Heminway, B. R., Y. Yu and M. S. Galinski (1994). "Paramyxovirus mediated cell fusion requires co-expression of both the fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins." Virus Res **31**(1): 1-16.
120. Henrickson, K. J. (2003). "Parainfluenza viruses." Clin Microbiol Rev **16**(2): 242-264.
121. Henrickson, K. J., S. M. Kuhn and L. L. Savatski (1994). "Epidemiology and cost of infection with human parainfluenza virus types 1 and 2 in young children." Clin Infect Dis **18**(5): 770-779.
122. Herfst, S., V. Mas, L. S. Ver, R. J. Wierda, A. D. Osterhaus, R. A. Fouchier and J. A. Melero (2008). "Low-pH-induced membrane fusion mediated by human metapneumovirus F protein is a rare, strain-dependent phenomenon." J Virol **82**(17): 8891-8895.
123. Herfst, S., E. J. Schrauwen, M. de Graaf, G. van Amerongen, B. G. van den Hoogen, R. L. de Swart, A. D. Osterhaus and R. A. Fouchier (2008). "Immunogenicity and efficacy of two candidate human metapneumovirus vaccines in cynomolgus macaques." Vaccine **26**(33): 4224-4230.
124. Higuchi, H., S. F. Bronk, A. Bateman, K. Harrington, R. G. Vile and G. J. Gores (2000). "Viral fusogenic membrane glycoprotein expression causes syncytia formation with bioenergetic cell death: implications for gene therapy." Cancer Res **60**(22): 6396-6402.
125. Hilleman, M. R., R. E. Weibel, E. B. Buynak, J. Stokes and J. E. Whitman (1967). "Live attenuated mumps-virus vaccine. IV. Protective efficacy as measured in a field evaluation." N Engl J Med **276**(5): 252-258.
126. Hitchner, S. B. and E. P. Johnson (1948). "A virus of low virulence for immunizing fowls against Newcastle disease; avian pneumoencephalitis." Vet Med **43**(12): 525-530.

127. Hoffmann, D., J. M. Bangen, W. Bayer and O. Wildner (2006). "Synergy between expression of fusogenic membrane proteins, chemotherapy and facultative virotherapy in colorectal cancer." Gene Ther **13**(21): 1534-1544.
128. Hoffmann, D., W. Bayer, A. Heim, A. Potthoff, D. M. Nettelbeck and O. Wildner (2008). "Evaluation of twenty-one human adenovirus types and one infectivity-enhanced adenovirus for the treatment of malignant melanoma." J Invest Dermatol **128**(4): 988-998.
129. Hoffmann, D., W. Bayer and O. Wildner (2007). "In situ tumor vaccination with adenovirus vectors encoding measles virus fusogenic membrane proteins and cytokines." World J Gastroenterol **13**(22): 3063-3070.
130. Hoffmann, D., W. Bayer and O. Wildner (2007). "Local and distant immune-mediated control of colon cancer growth with fusogenic membrane glycoproteins in combination with viral oncolysis." Hum Gene Ther **18**(5): 435-450.
131. Hoffmann, D., W. Bayer and O. Wildner (2007). "Therapeutic immune response induced by intratumoral expression of the fusogenic membrane protein of vesicular stomatitis virus and cytokines encoded by adenoviral vectors." Int J Mol Med **20**(5): 673-681.
132. Hoffmann, D., T. Grunwald, W. Bayer and O. Wildner (2008). "Immune-mediated anti-neoplastic effect of intratumoral RSV envelope glycoprotein expression is related to apoptotic death of tumor cells but not to the size of syncytia." World J Gastroenterol **14**(12): 1842-1850.
133. Hoffmann, D., T. Grunwald, S. Kuate and O. Wildner (2007). "Mechanistic analysis and comparison of viral fusogenic membrane proteins for their synergistic effects on chemotherapy." Cancer Biol Ther **6**(4): 510-518.
134. Hoffmann, D. and O. Wildner (2006). "Enhanced killing of pancreatic cancer cells by expression of fusogenic membrane glycoproteins in combination with chemotherapy." Mol Cancer Ther **5**(8): 2013-2022.
135. Hoffmann, D. and O. Wildner (2007). "Comparison of herpes simplex virus- and conditionally replicative adenovirus-based vectors for glioblastoma treatment." Cancer Gene Ther **14**(7): 627-639.
136. Homa, F. L., R. J. Brideau, D. J. Lehman, D. R. Thomsen, R. A. Olmsted and M. W. Wathen (1993). "Development of a novel subunit vaccine that protects cotton rats against both human respiratory syncytial virus and human parainfluenza virus type 3." J Gen Virol **74** (Pt 9): 1995-1999.

137. Horn, G. P., S. Vongpunsawad, E. Kornmann, B. Fritz, D. P. Dittmer, R. Cattaneo and M. Dobbelstein (2005). "Enhanced cytotoxicity without internuclear spread of adenovirus upon cell fusion by measles virus glycoproteins." J Virol **79**(3): 1911-1917.
138. Horwood, P. F., J. L. Gravel and T. J. Mahony (2008). "Identification of two distinct bovine parainfluenza virus type 3 genotypes." J Gen Virol **89**(Pt 7): 1643-1648.
139. Hu, X. L., R. Ray and R. W. Compans (1992). "Functional interactions between the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase of human parainfluenza viruses." J Virol **66**(3): 1528-1534.
140. Huang, Z., S. Elankumaran, A. Panda and S. K. Samal (2003). "Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector." Poult Sci **82**(6): 899-906.
141. Inaba, Y., Y. Tanaka, T. Omori and M. Matumoto (1970). "Isolation of bovine respiratory syncytial virus." Jpn J Exp Med **40**(6): 473-474.
142. Iorio, R. M. and R. L. Glickman (1992). "Fusion mutants of Newcastle disease virus selected with monoclonal antibodies to the hemagglutinin-neuraminidase." J Virol **66**(11): 6626-6633.
143. Iorio, R. M., R. L. Glickman and J. P. Sheehan (1992). "Inhibition of fusion by neutralizing monoclonal antibodies to the haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus." J Gen Virol **73** (Pt 5): 1167-1176.
144. Irie, T., N. Nagata, T. Igarashi, I. Okamoto and T. Sakaguchi (2010). "Conserved charged amino acids within Sendai virus C protein play multiple roles in the evasion of innate immune responses." PLoS One **5**(5): e10719.
145. Ishiguro, N., T. Ebihara, R. Endo, X. Ma, H. Kikuta, H. Ishiko and K. Kobayashi (2004). "High genetic diversity of the attachment (G) protein of human metapneumovirus." J Clin Microbiol **42**(8): 3406-3414.
146. Ito, M., M. Nishio, M. Kawano, S. Kusagawa, H. Komada, Y. Ito and M. Tsurudome (1997). "Role of a single amino acid at the amino terminus of the simian virus 5 F2 subunit in syncytium formation." J Virol **71**(12): 9855-9858.
147. Ito, M., M. Nishio, H. Komada, Y. Ito and M. Tsurudome (2000). "An amino acid in the heptad repeat 1 domain is important for the haemagglutinin-neuraminidase-independent fusing activity of simian virus 5 fusion protein." J Gen Virol **81**(Pt 3): 719-727.

148. Johnson, K. M., R. M. Chanock, M. K. Cook and R. J. Huebner (1960). "Studies of a new human hemadsorption virus. I. Isolation, properties and characterization." Am J Hyg **71**: 81-92.
149. Johnson, P. R., M. K. Spriggs, R. A. Olmsted and P. L. Collins (1987). "The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(16): 5625-5629.
150. Johnson, S., C. Oliver, G. A. Prince, V. G. Hemming, D. S. Pfarr, S. C. Wang, M. Dormitzer, J. O'Grady, S. Koenig, J. K. Tamura, R. Woods, G. Bansal, D. Couchenour, E. Tsao, W. C. Hall and J. F. Young (1997). "Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus." J Infect Dis **176**(5): 1215-1224.
151. Kapikian, A. Z., R. H. Mitchell, R. M. Chanock, R. A. Shvedoff and C. E. Stewart (1969). "An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine." Am J Epidemiol **89**(4): 405-421.
152. Karron, R. A. and P. L. Collins (2007). Parainfluenza Viruses. Fields Virology. D. M. Knipe and H. P. M. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. **1**: 1497-1526.
153. KATZ, S. L., C. H. KEMPE, F. L. BLACK, M. L. LEPOW, S. KRUGMAN, R. J. HAGGERTY and J. F. ENDERS (1960). "Studies on an attenuated measles-virus vaccine. VIII. General summary and evaluation of the results of vaccine." N Engl J Med **263**: 180-184.
154. KATZ, S. L., M. V. MILOVANOVIC and J. F. ENDERS (1958). "Propagation of measles virus in cultures of chick embryo cells." Proc Soc Exp Biol Med **97**(1): 23-29.
155. Kielian, M. and F. A. Rey (2006). "Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin." Nat Rev Microbiol **4**: 67-76.
156. Kilby, J. M., S. Hopkins, T. M. Venetta, B. DiMassimo, G. A. Cloud, J. Y. Lee, L. Alldredge, E. Hunter, D. Lambert, D. Bolognesi, T. Matthews, M. R. Johnson, M. A. Nowak, G. M. Shaw and M. S. Saag (1998). "Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry." Nat Med **4**: 1302-1307.
157. Kim, H. W., J. G. Canchola, C. D. Brandt, G. Pyles, R. M. Chanock, K. Jensen and R. H. Parrott (1969). "Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine." Am J Epidemiol **89**(4): 422-434.

158. Klenk, H. D. and W. Garten (1994). "Host cell proteases controlling virus pathogenicity." Trends Microbiol **2**(2): 39-43.
159. Kochhar, D. M., J. D. Penner and T. B. Knudsen (1980). "Embryotoxic, teratogenic, and metabolic effects of ribavirin in mice." Toxicol Appl Pharmacol **52**(1): 99-112.
160. Kolakofsky, D., L. Roux, D. Garcin and R. W. Ruigrok (2005). "Paramyxovirus mRNA editing, the "rule of six" and error catastrophe: a hypothesis." J Gen Virol **86**(Pt 7): 1869-1877.
161. Kotelkin, A., I. M. Belyakov, L. Yang, J. A. Berzofsky, P. L. Collins and A. Bukreyev (2006). "The NS2 protein of human respiratory syncytial virus suppresses the cytotoxic T-cell response as a consequence of suppressing the type I interferon response." J Virol **80**(12): 5958-5967.
162. Krilov, L. R. (2011). "Respiratory syncytial virus disease: update on treatment and prevention." Expert Rev Anti Infect Ther **9**(1): 27-32.
163. Kuroya, M. and N. Ishida (1953). "Newborn virus pneumonitis (type Sendai). II. The isolation of a new virus possessing hemagglutinin activity." Yokohama Med Bull **4**(4): 217-233.
164. Kuroya, M., N. Ishida and T. Shiratori (1953). "Newborn virus pneumonitis (type Sendai). II. The isolation of a new virus." Tohoku J Exp Med **58**(1): 62.
165. Lamb, R. A. and T. S. Jardetzky (2007). "Structural basis of viral invasion: lessons from paramyxovirus F." Curr Opin Struct Biol **17**(4): 427-436.
166. Lamb, R. A. and G. D. Parks (2007). Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication. Fields Virology. D. M. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins: 1449-1496.
167. Lavillette, D., E. I. Pecheur, P. Donot, J. Fresquet, J. Molle, R. Corbau, M. Dreux, F. Penin and F. L. Cosset (2007). "Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus." J Virol **81**(16): 8752-8765.
168. Le Bayon, J.-C., O. Terrier, G. Cartet, B. Lina and M. Rosa-Calatrava (2013). "Characterization of a key residue for hyperfusogenic phenotype in human parainfluenza virus type 2 (hPIV-2) fusion glycoprotein." Virus Genes: 1-5.

169. Le Bayon, J. C., B. Lina, M. Rosa-Calatrava and G. Boivin (2013). "Recent developments with live-attenuated recombinant paramyxovirus vaccines." Rev Med Virol **23**(1): 15-34.
170. Leader, S. and K. Kohlhasse (2003). "Recent trends in severe respiratory syncytial virus (RSV) among US infants, 1997 to 2000." J Pediatr **143**(5 Suppl): S127-132.
171. Leader, S., H. Yang, J. DeVincenzo, P. Jacobson, J. P. Marcin and D. L. Murray (2003). "Time and out-of-pocket costs associated with respiratory syncytial virus hospitalization of infants." Value Health **6**(2): 100-106.
172. Lech, P. J. and S. J. Russell (2010). "Use of attenuated paramyxoviruses for cancer therapy." Expert Rev Vaccines **9**(11): 1275-1302.
173. Lee, J. K., A. Prussia, T. Paal, L. K. White, J. P. Snyder and R. K. Plemper (2008). "Functional interaction between paramyxovirus fusion and attachment proteins." J Biol Chem **283**(24): 16561-16572.
174. Lee, N., D. Hui, A. Wu, P. Chan, P. Cameron, G. M. Joynt, A. Ahuja, M. Y. Yung, C. B. Leung, K. F. To, S. F. Lui, C. C. Szeto, S. Chung and J. J. Sung (2003). "A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong." N Engl J Med **348**(20): 1986-1994.
175. Lehman, D. J., L. L. Roof, R. J. Brideau, P. A. Aeed, D. R. Thomsen, A. P. Elhammer, M. W. Wathen and F. L. Homa (1993). "Comparison of soluble and secreted forms of human parainfluenza virus type 3 glycoproteins expressed from mammalian and insect cells as subunit vaccines." J Gen Virol **74** (Pt 3): 459-469.
176. Lessler, J., N. G. Reich, R. Brookmeyer, T. M. Perl, K. E. Nelson and D. A. Cummings (2009). "Incubation periods of acute respiratory viral infections: a systematic review." Lancet Infect Dis **9**(5): 291-300.
177. Leung, J., F. Esper, C. Weibel and J. S. Kahn (2005). "Seroepidemiology of human metapneumovirus (hMPV) on the basis of a novel enzyme-linked immunosorbent assay utilizing hMPV fusion protein expressed in recombinant vesicular stomatitis virus." J Clin Microbiol **43**(3): 1213-1219.
178. Levy, C., L. Aerts, M. E. Hamelin, C. Granier, J. Szecsi, D. Lavillette, G. Boivin and F. L. Cosset (2013). "Virus-like particle vaccine induces cross-protection against human metapneumovirus infections in mice." Vaccine.
179. Li, H., Y. S. Haviv, C. A. Derdeyn, J. Lam, C. Coolidge, E. Hunter, D. T. Curiel and J. L. Blackwell (2001). "Human immunodeficiency virus type 1-mediated syncytium formation

is compatible with adenovirus replication and facilitates efficient dispersion of viral gene products and de novo-synthesized virus particles." Hum Gene Ther **12**(18): 2155-2165.

180. Li, J., E. Quinlan, A. Mirza and R. M. Iorio (2004). "Mutated form of the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase interacts with the homologous fusion protein despite deficiencies in both receptor recognition and fusion promotion." J Virol **78**(10): 5299-5310.

181. Lin, E. H., C. Salon, E. Brambilla, D. Lavillette, J. Szecsi, F. L. Cosset and J. L. Coll (2010). "Fusogenic membrane glycoproteins induce syncytia formation and death in vitro and in vivo: a potential therapy agent for lung cancer." Cancer Gene Ther **17**(4): 256-265.

182. Lin, Y., A. C. Bright, T. A. Rothermel and B. He (2003). "Induction of apoptosis by paramyxovirus simian virus 5 lacking a small hydrophobic gene." J Virol **77**(6): 3371-3383.

183. Lowry, F. (2010). FDA Panel Nixes Licensing Request for Motavizumab. Medscape News, WebMD.

184. Lydy, S. L., S. Basak and R. W. Compans (1990). "Host cell-dependent lateral mobility of viral glycoproteins." Microb Pathog **9**(6): 375-386.

185. Marx, A., H. E. Gary, Jr., B. J. Marston, D. D. Erdman, R. F. Breiman, T. J. Torok, J. F. Plouffe, T. M. File, Jr. and L. J. Anderson (1999). "Parainfluenza virus infection among adults hospitalized for lower respiratory tract infection." Clin Infect Dis **29**(1): 134-140.

186. Mastelic, B., S. Ahmed, W. M. Egan, G. Del Giudice, H. Golding, I. Gust, P. Neels, S. G. Reed, R. L. Sheets, C. A. Siegrist and P. H. Lambert (2010). "Mode of action of adjuvants: implications for vaccine safety and design." Biologicals **38**(5): 594-601.

187. Maurer, U. E., B. Sodeik and K. Grunewald (2008). "Native 3D intermediates of membrane fusion in herpes simplex virus 1 entry." Proc Natl Acad Sci U S A **105**: 10559-10564.

188. McGinnes, L., T. Sergel and T. Morrison (1993). "Mutations in the transmembrane domain of the HN protein of Newcastle disease virus affect the structure and activity of the protein." Virology **196**(1): 101-110.

189. McGinnes, L. W., K. A. Gravel, R. W. Finberg, E. A. Kurt-Jones, M. J. Massare, G. Smith, M. R. Schmidt and T. G. Morrison (2011). "Assembly and immunological properties of Newcastle disease virus-like particles containing the respiratory syncytial virus F and G proteins." J Virol **85**(1): 366-377.

190. McGinnes, L. W., H. Pantua, J. P. Laliberte, K. A. Gravel, S. Jain and T. G. Morrison (2010). "Assembly and biological and immunological properties of Newcastle disease virus-like particles." J Virol **84**(9): 4513-4523.
191. Meissner, H. C. and S. S. Long (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): 1447-1452.
192. Melanson, V. R. and R. M. Iorio (2004). "Amino acid substitutions in the F-specific domain in the stalk of the newcastle disease virus HN protein modulate fusion and interfere with its interaction with the F protein." J Virol **78**(23): 13053-13061.
193. Melanson, V. R. and R. M. Iorio (2006). "Addition of N-glycans in the stalk of the Newcastle disease virus HN protein blocks its interaction with the F protein and prevents fusion." J Virol **80**(2): 623-633.
194. Merz, D. C., P. Prehm, A. Scheid and P. W. Choppin (1981). "Inhibition of the neuraminidase of paramyxoviruses by halide ions: a possible means of modulating the two activities of the HN protein." Virology **112**(1): 296-305.
195. Michael, N. L. (2012). "Rare serotype adenoviral vectors for HIV vaccine development." J Clin Invest **122**(1): 25-27.
196. Miller, S. A., S. Tollefson, J. E. Crowe, Jr., J. V. Williams and D. W. Wright (2007). "Examination of a fusogenic hexameric core from human metapneumovirus and identification of a potent synthetic peptide inhibitor from the heptad repeat 1 region." J Virol **81**(1): 141-149.
197. Mirza, A. M., R. Deng and R. M. Iorio (1994). "Site-directed mutagenesis of a conserved hexapeptide in the paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein: effects on antigenic structure and function." J Virol **68**(8): 5093-5099.
198. Mittereder, N., K. L. March and B. C. Trapnell (1996). "Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy." J Virol **70**(11): 7498-7509.
199. Moghaddam, A., W. Olszewska, B. Wang, J. S. Tregoning, R. Helson, Q. J. Sattentau and P. J. Openshaw (2006). "A potential molecular mechanism for hypersensitivity caused by formalin-inactivated vaccines." Nat Med **12**(8): 905-907.
200. Morris, J. A., R. E. Blount, Jr. and R. E. Savage (1956). "Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza." Proc Soc Exp Biol Med **92**(3): 544-549.

201. Moscona, A. (2005). "Entry of parainfluenza virus into cells as a target for interrupting childhood respiratory disease." J Clin Invest **115**(7): 1688-1698.

202. Moules, V., O. Terrier, M. Yver, B. Riteau, C. Moriscot, O. Ferraris, T. Julien, E. Giudice, J. P. Rolland, A. Erny, M. Bouscambert-Duchamp, E. Frobert, M. Rosa-Calatrava, Y. Pu Lin, A. Hay, D. Thomas, G. Schoehn and B. Lina (2011). "Importance of viral genomic composition in modulating glycoprotein content on the surface of influenza virus particles." Virology **414**(1): 51-62.

203. Msaouel, P., M. Opyrchal, E. Domingo Musibay and E. Galanis (2013). "Oncolytic measles virus strains as novel anticancer agents." Expert Opin Biol Ther **13**(4): 483-502.

204. Muhlebach, M. D., M. Mateo, P. L. Sinn, S. Prufer, K. M. Uhlig, V. H. Leonard, C. K. Navaratnarajah, M. Frenzke, X. X. Wong, B. Sawatsky, S. Ramachandran, P. B. McCray, Jr., K. Cichutek, V. von Messling, M. Lopez and R. Cattaneo (2011). "Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus." Nature **480**(7378): 530-533.

205. Murakami, M., T. Towatari, M. Ohuchi, M. Shiota, M. Akao, Y. Okumura, M. A. Parry and H. Kido (2001). "Mini-plasmin found in the epithelial cells of bronchioles triggers infection by broad-spectrum influenza A viruses and Sendai virus." Eur J Biochem **268**(10): 2847-2855.

206. Negrete, O. A., E. L. Levroney, H. C. Aguilar, A. Bertolotti-Ciarlet, R. Nazarian, S. Tajyar and B. Lee (2005). "EphrinB2 is the entry receptor for Nipah virus, an emergent deadly paramyxovirus." Nature **436**: 401-405.

207. Nichols, W. G., L. Corey, T. Gooley, C. Davis and M. Boeckh (2001). "Parainfluenza virus infections after hematopoietic stem cell transplantation: risk factors, response to antiviral therapy, and effect on transplant outcome." Blood **98**(3): 573-578.

208. Nichols, W. G., H. M. Steel, T. Bonny, K. Adkison, L. Curtis, J. Millard, K. Kabeya and N. Clumeck (2008). "Hepatotoxicity observed in clinical trials of apilavir (GW873140)." Antimicrob Agents Chemother **52**: 858-865.

209. Novavax. (2011, January 14, 2011). "NOVAVAX Launches Phase I Clinical Trial to Evaluate its Novel Vaccine Against Respiratory Syncytial Virus (RSV)." communiqué de presse consultable à l'adresse web : <http://www.novavax.com/download/releases/1-4-11%20RSV%20Phase%201%20trial%20FINAL2.pdf>.

210. Noyce, R. S., D. G. Bondre, M. N. Ha, L. T. Lin, G. Sisson, M. S. Tsao and C. D. Richardson (2011). "Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus." PLoS Pathog **7**(8): e1002240.

211. OMS (2009). Global Health Risks, World Health Organization: 70.

212. OMS. (2013, 5 June 2013). "Middle East respiratory syndrome - coronavirus (MERS-CoV) – Update." Récupéré en Juillet 2013, depuis l'adresse web <http://www.who.int/ith/updates/20130605/en/>.
213. Openshaw, P. J., F. J. Culley and W. Olszewska (2001). "Immunopathogenesis of vaccine-enhanced RSV disease." Vaccine **20 Suppl 1**: S27-31.
214. Ottolini, M. G., D. D. Porter, V. G. Hemming and G. A. Prince (2000). "Enhanced pulmonary pathology in cotton rats upon challenge after immunization with inactivated parainfluenza virus 3 vaccines." Viral Immunol **13**(2): 231-236.
215. Paccaud, M. F. and C. Jacquier (1970). "A respiratory syncytial virus of bovine origin." Arch Gesamte Virusforsch **30**(4): 327-342.
216. Paes, B. A., I. Mitchell, A. Banerji, K. L. Lanctot and J. M. Langley (2011). "A decade of respiratory syncytial virus epidemiology and prophylaxis: Translating evidence into everyday clinical practice." Can Respir J **18**(2): e10-19.
217. Palermo, L. M., M. Porotto, O. Greengard and A. Moscona (2007). "Fusion promotion by a paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase protein: pH modulation of receptor avidity of binding sites I and II." J Virol **81**(17): 9152-9161.
218. Paterson, R. G., M. L. Johnson and R. A. Lamb (1997). "Paramyxovirus fusion (F) protein and hemagglutinin-neuraminidase (HN) protein interactions: intracellular retention of F and HN does not affect transport of the homotypic HN or F protein." Virology **237**(1): 1-9.
219. Paterson, R. G., R. A. Lamb, B. Moss and B. R. Murphy (1987). "Comparison of the relative roles of the F and HN surface glycoproteins of the paramyxovirus simian virus 5 in inducing protective immunity." J Virol **61**(6): 1972-1977.
220. Paterson, R. G., C. J. Russell and R. A. Lamb (2000). "Fusion protein of the paramyxovirus SV5: destabilizing and stabilizing mutants of fusion activation." Virology **270**(1): 17-30.
221. Peiris, J. S., W. H. Tang, K. H. Chan, P. L. Khong, Y. Guan, Y. L. Lau and S. S. Chiu (2003). "Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong." Emerg Infect Dis **9**(6): 628-633.
222. Pelet, T., C. Delenda, O. Gubbay, D. Garcin and D. Kolakofsky (1996). "Partial characterization of a Sendai virus replication promoter and the rule of six." Virology **224**(2): 405-414.

223. Peret, T. C., Y. Abed, L. J. Anderson, D. D. Erdman and G. Boivin (2004). "Sequence polymorphism of the predicted human metapneumovirus G glycoprotein." J Gen Virol **85**(Pt 3): 679-686.
224. Peret, T. C., G. Boivin, Y. Li, M. Couillard, C. Humphrey, A. D. Osterhaus, D. D. Erdman and L. J. Anderson (2002). "Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America." J Infect Dis **185**(11): 1660-1663.
225. Pham, Q. N., S. Biacchesi, M. H. Skiadopoulos, B. R. Murphy, P. L. Collins and U. J. Buchholz (2005). "Chimeric recombinant human metapneumoviruses with the nucleoprotein or phosphoprotein open reading frame replaced by that of avian metapneumovirus exhibit improved growth in vitro and attenuation in vivo." J Virol **79**(24): 15114-15122.
226. Plemper, R. K., A. L. Hammond and R. Cattaneo (2001). "Measles virus envelope glycoproteins hetero-oligomerize in the endoplasmic reticulum." J Biol Chem **276**(47): 44239-44246.
227. Plemper, R. K., A. L. Hammond, D. Gerlier, A. K. Fielding and R. Cattaneo (2002). "Strength of envelope protein interaction modulates cytopathicity of measles virus." J Virol **76**(10): 5051-5061.
228. Porotto, M., I. Devito, S. G. Palmer, E. M. Jurgens, J. L. Yee, C. C. Yokoyama, A. Pessi and A. Moscona (2011). "Spring-loaded model revisited: paramyxovirus fusion requires engagement of a receptor binding protein beyond initial triggering of the fusion protein." J Virol **85**(24): 12867-12880.
229. Porotto, M., M. Fornabaio, G. E. Kellogg and A. Moscona (2007). "A second receptor binding site on human parainfluenza virus type 3 hemagglutinin-neuraminidase contributes to activation of the fusion mechanism." J Virol **81**(7): 3216-3228.
230. Porotto, M., M. Murrell, O. Greengard, M. C. Lawrence, J. L. McKimm-Breschkin and A. Moscona (2004). "Inhibition of parainfluenza virus type 3 and Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase receptor binding: effect of receptor avidity and steric hindrance at the inhibitor binding sites." J Virol **78**: 13911-13919.
231. Porotto, M., S. G. Palmer, L. M. Palermo and A. Moscona (2012). "Mechanism of fusion triggering by human parainfluenza virus type III: communication between viral glycoproteins during entry." J Biol Chem **287**(1): 778-793.
232. Portner, A. (1981). "The HN glycoprotein of Sendai virus: analysis of site(s) involved in hemagglutinating and neuraminidase activities." Virology **115**(2): 375-384.

233. Randall, R. E., D. F. Young, K. K. Goswami and W. C. Russell (1987). "Isolation and characterization of monoclonal antibodies to simian virus 5 and their use in revealing antigenic differences between human, canine and simian isolates." J Gen Virol **68 (Pt 11)**: 2769-2780.
234. Rauw, F., Y. Gardin, T. van den Berg and B. Lambrecht (2009). "La vaccination contre la maladie de Newcastle chez le poulet (*Gallus gallus*)." Biotechnol. Agron. Soc. Environ. **13(4)**: 587-596.
235. Reitter, J. N., T. Sergel and T. G. Morrison (1995). "Mutational analysis of the leucine zipper motif in the Newcastle disease virus fusion protein." J Virol **69(10)**: 5995-6004.
236. Richardson, C. D., A. Scheid and P. W. Choppin (1980). "Specific inhibition of paramyxovirus and myxovirus replication by oligopeptides with amino acid sequences similar to those at the N-termini of the F1 or HA2 viral polypeptides." Virology **105**: 205-222.
237. Roche, S., F. A. Rey, Y. Gaudin and S. Bressanelli (2007). "Structure of the prefusion form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G." Science **315**: 843-848.
238. Rockwell, N. C., D. J. Krysan, T. Komiyama and R. S. Fuller (2002). "Precursor processing by kex2/furin proteases." Chem Rev **102(12)**: 4525-4548.
239. Rojas, J. J., M. Cascallo, S. Guedan, A. Gros, J. Martinez-Quintanilla, A. Hemminki and R. Alemany (2009). "A modified E2F-1 promoter improves the efficacy to toxicity ratio of oncolytic adenoviruses." Gene Ther **16(12)**: 1441-1451.
240. Rojas, J. J., S. Guedan, P. F. Searle, J. Martinez-Quintanilla, R. Gil-Hoyos, F. Alcayaga-Miranda, M. Cascallo and R. Alemany (2010). "Minimal RB-responsive E1A promoter modification to attain potency, selectivity, and transgene-arming capacity in oncolytic adenoviruses." Mol Ther **18(11)**: 1960-1971.
241. Roldao, A., M. C. Mellado, L. R. Castilho, M. J. Carrondo and P. M. Alves (2010). "Virus-like particles in vaccine development." Expert Rev Vaccines **9(10)**: 1149-1176.
242. Roussel, A., J. Lescar, M.-C. Vaney, G. Wengler, G. Wengler and F. A. Rey (2006). "Structure and interactions at the viral surface of the envelope protein E1 of Semliki Forest virus." Structure **14**: 75-86.
243. Rowe, D. S. and R. H. Michaels (1960). "Isolation of the respiratory syncytial virus from a patient with pneumonia." Pediatrics **26**: 623-629.
244. Roymans, D., H. L. De Bondt, E. Arnoult, P. Geluykens, T. Gevers, M. Van Ginderen, N. Verheyen, H. Kim, R. Willebrords, J. F. Bonfanti, W. Bruinzeel, M. D. Cummings, H. van

Vlijmen and K. Andries (2010). "Binding of a potent small-molecule inhibitor of six-helix bundle formation requires interactions with both heptad-repeats of the RSV fusion protein." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(1): 308-313.

245. Russell, C. J., T. S. Jardetzky and R. A. Lamb (2001). "Membrane fusion machines of paramyxoviruses: capture of intermediates of fusion." EMBO J **20**(15): 4024-4034.

246. Russell, C. J., T. S. Jardetzky and R. A. Lamb (2004). "Conserved glycine residues in the fusion peptide of the paramyxovirus fusion protein regulate activation of the native state." J Virol **78**: 13727-13742.

247. Russell, C. J. and L. E. Luque (2006). "The structural basis of paramyxovirus invasion." Trends in Microbiology **14**(6): 243-246.

248. Russell, R. J., P. S. Kerry, D. J. Stevens, D. A. Steinhauer, S. R. Martin, S. J. Gamblin and J. J. Skehel (2008). "Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion." Proc Natl Acad Sci U S A.

249. Ryder, A. B., S. J. Tollefson, A. B. Podsiad, J. E. Johnson and J. V. Williams (2010). "Soluble recombinant human metapneumovirus G protein is immunogenic but not protective." Vaccine **28**(25): 4145-4152.

250. Safdar, A. (2008). "Immune modulatory activity of ribavirin for serious human metapneumovirus disease: early i.v. therapy may improve outcomes in immunosuppressed SCT recipients." Bone Marrow Transplant **41**(8): 707-708.

251. Saito, Y., M. Sunamura, F. Motoi, H. Abe, S. Egawa, D. G. Duda, T. Hoshida, S. Fukuyama, H. Hamada and S. Matsuno (2006). "Oncolytic replication-competent adenovirus suppresses tumor angiogenesis through preserved E1A region." Cancer Gene Ther **13**(3): 242-252.

252. Samal, S. K. and P. L. Collins (1996). "RNA replication by a respiratory syncytial virus RNA analog does not obey the rule of six and retains a nonviral trinucleotide extension at the leader end." J Virol **70**(8): 5075-5082.

253. Sauthoff, H., J. Hu, C. Maca, M. Goldman, S. Heitner, H. Yee, T. Pipiya, W. N. Rom and J. G. Hay (2003). "Intratumoral spread of wild-type adenovirus is limited after local injection of human xenograft tumors: virus persists and spreads systemically at late time points." Hum Gene Ther **14**(5): 425-433.

254. Schickli, J. H., J. Kaur, M. Macphail, J. M. Guzzetta, R. R. Spaete and R. S. Tang (2008). "Deletion of human metapneumovirus M2-2 increases mutation frequency and attenuates growth in hamsters." Virol J **5**: 69.

255. Schmidt, A. C. (2011). "Progress in respiratory virus vaccine development." Semin Respir Crit Care Med **32**(4): 527-540.
256. Schmidt, A. C., A. Schaap-Nutt, E. J. Bartlett, H. Schomacker, J. Boonyaratanakornkit, R. A. Karron and P. L. Collins (2011). "Progress in the development of human parainfluenza virus vaccines." Expert Rev Respir Med **5**(4): 515-526.
257. Schomacker, H., A. Schaap-Nutt, P. L. Collins and A. C. Schmidt (2012). "Pathogenesis of acute respiratory illness caused by human parainfluenza viruses." Curr Opin Virol **2**(3): 294-299.
258. Schowalter, R. M., A. Chang, J. G. Robach, U. J. Buchholz and R. E. Dutch (2009). "Low-pH triggering of human metapneumovirus fusion: essential residues and importance in entry." J Virol **83**(3): 1511-1522.
259. Schowalter, R. M., S. E. Smith and R. E. Dutch (2006). "Characterization of human metapneumovirus F protein-promoted membrane fusion: critical roles for proteolytic processing and low pH." J Virol **80**(22): 10931-10941.
260. Seol, Y., G. M. Skinner, K. Visscher, A. Buhot and A. Halperin (2007). "Stretching of homopolymeric RNA reveals single-stranded helices and base-stacking." Phys Rev Lett **98**(15): 158103.
261. Sheehan, J. P. and R. M. Iorio (1992). "A single amino acid substitution in the hemagglutinin-neuraminidase of Newcastle disease virus results in a protein deficient in both functions." Virology **189**(2): 778-781.
262. Shirogane, Y., M. Takeda, M. Iwasaki, N. Ishiguro, H. Takeuchi, Y. Nakatsu, M. Tahara, H. Kikuta and Y. Yanagi (2008). "Efficient multiplication of human metapneumovirus in Vero cells expressing the transmembrane serine protease TMPRSS2." J Virol **82**(17): 8942-8946.
263. Sidwell, R. W., J. H. Huffman, G. P. Khare, L. B. Allen, J. T. Witkowski and R. K. Robins (1972). "Broad-spectrum antiviral activity of Virazole: 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide." Science **177**(4050): 705-706.
264. Singh, M., B. Berger and P. S. Kim (1999). "LearnCoil-VMF: computational evidence for coiled-coil-like motifs in many viral membrane-fusion proteins." J Mol Biol **290**(5): 1031-1041.
265. Skiadopoulos, M. H., S. Biacchesi, U. J. Buchholz, J. M. Riggs, S. R. Surman, E. Amaro-Carambot, J. M. McAuliffe, W. R. Elkins, M. St Claire, P. L. Collins and B. R. Murphy

(2004). "The two major human metapneumovirus genetic lineages are highly related antigenically, and the fusion (F) protein is a major contributor to this antigenic relatedness." J Virol **78**(13): 6927-6937.

266. Smith, E. C., A. Popa, A. Chang, C. Masante and R. E. Dutch (2009). "Viral entry mechanisms: the increasing diversity of paramyxovirus entry." FEBS J **276**(24): 7217-7227.

267. Sollner, T. H. (2004). "Intracellular and viral membrane fusion: a uniting mechanism." Curr Opin Cell Biol **16**(4): 429-435.

268. Spann, K. M., K. C. Tran, B. Chi, R. L. Rabin and P. L. Collins (2004). "Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages [corrected]." J Virol **78**(8): 4363-4369.

269. Stockman, L. J., A. T. Curns, L. J. Anderson and G. Fischer-Langley (2012). "Respiratory Syncytial Virus-associated Hospitalizations Among Infants and Young Children in the United States, 1997-2006." Pediatr Infect Dis J **31**(1): In press. doi: 10.1097/INF.1090b1013e31822e31868e31826.

270. Stone-Hulslander, J. and T. G. Morrison (1997). "Detection of an interaction between the HN and F proteins in Newcastle disease virus-infected cells." J Virol **71**(9): 6287-6295.

271. Subramanian, R. P. and R. J. Geraghty (2007). "Herpes simplex virus type 1 mediates fusion through a hemifusion intermediate by sequential activity of glycoproteins D, H, L, and B." Proc Natl Acad Sci U S A **104**: 2903-2908.

272. Suzuki, T., M. Harada, Y. Suzuki and M. Matsumoto (1984). "Incorporation of sialoglycoprotein containing lacto-series oligosaccharides into chicken asialoerythrocyte membranes and restoration of receptor activity toward hemagglutinating virus of Japan (Sendai virus)." J Biochem **95**(4): 1193-1200.

273. Suzuki, Y., T. Suzuki, M. Matsunaga and M. Matsumoto (1985). "Gangliosides as paramyxovirus receptor. Structural requirement of sialo-oligosaccharides in receptors for hemagglutinating virus of Japan (Sendai virus) and Newcastle disease virus." J Biochem **97**(4): 1189-1199.

274. Swanson, K., X. Wen, G. P. Leser, R. G. Paterson, R. A. Lamb and T. S. Jardetzky (2010). "Structure of the Newcastle disease virus F protein in the post-fusion conformation." Virology **402**(2): 372-379.

275. Swanson, K. A., E. C. Settembre, C. A. Shaw, A. K. Dey, R. Rappuoli, C. W. Mandl, P. R. Dormitzer and A. Carfi (2011). "Structural basis for immunization with postfusion

respiratory syncytial virus fusion F glycoprotein (RSV F) to elicit high neutralizing antibody titers." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(23): 9619-9624.

276. Takeuchi, K., T. Komatsu, Y. Kitagawa, K. Sada and B. Gotoh (2008). "Sendai virus C protein plays a role in restricting PKR activation by limiting the generation of intracellular double-stranded RNA." J Virol **82**(20): 10102-10110.

277. Takimoto, T., G. L. Taylor, H. C. Connaris, S. J. Crennell and A. Portner (2002). "Role of the hemagglutinin-neuraminidase protein in the mechanism of paramyxovirus-cell membrane fusion." J Virol **76**(24): 13028-13033.

278. Tang, R. S., J. H. Schickli, M. MacPhail, F. Fernandes, L. Bicha, J. Spaete, R. A. Fouchier, A. D. Osterhaus, R. Spaete and A. A. Haller (2003). "Effects of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus antigen insertion in two 3' proximal genome positions of bovine/human parainfluenza virus type 3 on virus replication and immunogenicity." J Virol **77**(20): 10819-10828.

279. Tayyari, F., D. Marchant, T. J. Moraes, W. Duan, P. Mastrangelo and R. G. Hegele (2011). "Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus." Nat Med **17**(9): 1132-1135.

280. Techaarpornkul, S., P. L. Collins and M. E. Peebles (2002). "Respiratory syncytial virus with the fusion protein as its only viral glycoprotein is less dependent on cellular glycosaminoglycans for attachment than complete virus." Virology **294**(2): 296-304.

281. Teng, M. N., S. S. Whitehead and P. L. Collins (2001). "Contribution of the respiratory syncytial virus G glycoprotein and its secreted and membrane-bound forms to virus replication in vitro and in vivo." Virology **289**(2): 283-296.

282. Terrier, O., G. Cartet, O. Ferraris, F. Morfin, D. Thouvenot, S. S. Hong and B. Lina (2008). "Characterization of naturally occurring parainfluenza virus type 2 (hPIV-2) variants." J Clin Virol **43**(1): 86-92.

283. Terrier, O., F. Durupt, G. Cartet, L. Thomas, B. Lina and M. Rosa-Calatrava (2009). "Engineering of a parainfluenza virus type 5 fusion protein (PIV-5 F): development of an autonomous and hyperfusogenic protein by a combinational mutagenesis approach." Virus Res **146**(1-2): 115-124.

284. Terrier, O., J. P. Rolland, M. Rosa-Calatrava, B. Lina, D. Thomas and V. Moules (2009). "Parainfluenza virus type 5 (PIV-5) morphology revealed by cryo-electron microscopy." Virus Res **142**(1-2): 200-203.

285. Thammawat, S., T. A. Sadlon, P. G. Hallsworth and D. L. Gordon (2008). "Role of cellular glycosaminoglycans and charged regions of viral G protein in human metapneumovirus infection." J Virol **82**(23): 11767-11774.
286. Thomas, M. A., J. F. Spencer, M. C. La Regina, D. Dhar, A. E. Tollefson, K. Toth and W. S. Wold (2006). "Syrian hamster as a permissive immunocompetent animal model for the study of oncolytic adenovirus vectors." Cancer Res **66**(3): 1270-1276.
287. Thompson, W. W., D. K. Shay, E. Weintraub, L. Brammer, N. Cox, L. J. Anderson and K. Fukuda (2003). "Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States." JAMA **289**(2): 179-186.
288. Thorner, A. R., R. Vogels, J. Kaspers, G. J. Weverling, L. Holterman, A. A. Lemckert, A. Dilraj, L. M. McNally, P. M. Jeena, S. Jepsen, P. Abbink, A. Nanda, P. E. Swanson, A. T. Bates, K. L. O'Brien, M. J. Havenga, J. Goudsmit and D. H. Barouch (2006). "Age dependence of adenovirus-specific neutralizing antibody titers in individuals from sub-Saharan Africa." J Clin Microbiol **44**(10): 3781-3783.
289. Toyoda, T., T. Sakaguchi, K. Imai, N. M. Inocencio, B. Gotoh, M. Hamaguchi and Y. Nagai (1987). "Structural comparison of the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus." Virology **158**(1): 242-247.
290. Tsurudome, M., M. Ito, M. Nishio, M. Kawano, H. Komada and Y. Ito (2001). "Hemagglutinin-neuraminidase-independent fusion activity of simian virus 5 fusion (F) protein: difference in conformation between fusogenic and nonfusogenic F proteins on the cell surface." J Virol **75**(19): 8999-9009.
291. Tsurudome, M., M. Ito, M. Nishio, M. Kawano, H. Komada and Y. Ito (2006). "A mutant fusion (F) protein of simian virus 5 induces hemagglutinin-neuraminidase-independent syncytium formation despite the internalization of the F protein." Virology **347**: 11-27.
292. Tsurudome, M., M. Ito, M. Nishio, M. Kawano, K. Okamoto, S. Kusagawa, H. Komada and Y. Ito (1998). "Identification of regions on the fusion protein of human parainfluenza virus type 2 which are required for haemagglutinin-neuraminidase proteins to promote cell fusion." J Gen Virol **79** (Pt 2): 279-289.
293. Tsurudome, M., M. Nakahashi, Y. Matsushima, M. Ito, M. Nishio, M. Kawano, H. Komada and T. Nosaka (2013). "Full conversion of the hemagglutinin-neuraminidase specificity of the parainfluenza virus 5 fusion protein by replacement of 21 amino acids in its head region with those of the simian virus 41 fusion protein." J Virol.
294. van den Hoogen, B. G., T. M. Bestebroer, A. D. Osterhaus and R. A. Fouchier (2002). "Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus." Virology **295**(1): 119-132.

295. van den Hoogen, B. G., J. C. de Jong, J. Groen, T. Kuiken, R. de Groot, R. A. Fouchier and A. D. Osterhaus (2001). "A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease." Nat Med **7**(6): 719-724.
296. van den Hoogen, B. G., S. Herfst, L. Sprong, P. A. Cane, E. Forleo-Neto, R. L. de Swart, A. D. Osterhaus and R. A. Fouchier (2004). "Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses." Emerg Infect Dis **10**(4): 658-666.
297. Varghese, S. and S. D. Rabkin (2002). "Oncolytic herpes simplex virus vectors for cancer virotherapy." Cancer Gene Ther **9**(12): 967-978.
298. Verardi, P. H., A. Titong and C. J. Hagen (2012). "A vaccinia virus renaissance: new vaccine and immunotherapeutic uses after smallpox eradication." Hum Vaccin Immunother **8**(7): 961-970.
299. Villanueva, A., C. Garcia, A. B. Paules, M. Vicente, M. Megias, G. Reyes, P. de Villalonga, N. Agell, F. Lluís, O. Bachs and G. Capella (1998). "Disruption of the antiproliferative TGF-beta signaling pathways in human pancreatic cancer cells." Oncogene **17**(15): 1969-1978.
300. Viruses, I. C. o. T. o. (2011, 2012). "Virus Taxonomy: 2011 Release." 2011. Récupéré le 1er Janvier 2013, sur le site web <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2011>.
301. Vuu, K., J. Xie, M. A. McDonald, M. Bernardo, F. Hunter, Y. Zhang, K. Li, M. Bednarski and S. Guccione (2005). "Gadolinium-rhodamine nanoparticles for cell labeling and tracking via magnetic resonance and optical imaging." Bioconjug Chem **16**(4): 995-999.
302. Walpita, P. and R. Flick (2005). "Reverse genetics of negative-stranded RNA viruses: a global perspective." FEMS Microbiol Lett **244**(1): 9-18.
303. Walsh, E. E., D. R. Peterson and A. R. Falsey (2008). "Human metapneumovirus infections in adults: another piece of the puzzle." Arch Intern Med **168**(22): 2489-2496.
304. Wang, D., S. Bayliss and C. Meads (2011). "Palivizumab for immunoprophylaxis of respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis in high-risk infants and young children: a systematic review and additional economic modelling of subgroup analyses." Health Technol Assess **15**(5): iii-iv, 1-124.
305. Welch, B. D., Y. Liu, C. A. Kors, G. P. Leser, T. S. Jardetzky and R. A. Lamb (2012). "Structure of the cleavage-activated prefusion form of the parainfluenza virus 5 fusion protein." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(41): 16672-16677.

306. Welliver, R. C. (2003). "Respiratory syncytial virus and other respiratory viruses." Pediatr Infect Dis J **22**(2 Suppl): S6-10; discussion S10-12.
307. Welliver, R. C., D. T. Wong, M. Sun and N. McCarthy (1986). "Parainfluenza virus bronchiolitis. Epidemiology and pathogenesis." Am J Dis Child **140**(1): 34-40.
308. Whitehead, S. S., A. Bukreyev, M. N. Teng, C. Y. Firestone, M. St Claire, W. R. Elkins, P. L. Collins and B. R. Murphy (1999). "Recombinant respiratory syncytial virus bearing a deletion of either the NS2 or SH gene is attenuated in chimpanzees." J Virol **73**(4): 3438-3442.
309. Whitman, S. D., E. C. Smith and R. E. Dutch (2009). "Differential rates of protein folding and cellular trafficking for the Hendra virus F and G proteins: implications for F-G complex formation." J Virol **83**(17): 8998-9001.
310. Wild, C. T., D. C. Shugars, T. K. Greenwell, C. B. McDanal and T. J. Matthews (1994). "Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection." Proc Natl Acad Sci U S A **91**: 9770-9774.
311. Williams, J. V., K. M. Edwards, G. A. Weinberg, M. R. Griffin, C. B. Hall, Y. Zhu, P. G. Szilagyi, C. K. Wang, C. F. Yang, D. Silva, D. Ye, R. R. Spaete and J. E. Crowe, Jr. (2010). "Population-based incidence of human metapneumovirus infection among hospitalized children." J Infect Dis **201**(12): 1890-1898.
312. Wilson, R. L., S. M. Fuentes, P. Wang, E. C. Taddeo, A. Klatt, A. J. Henderson and B. He (2006). "Function of small hydrophobic proteins of paramyxovirus." J Virol **80**(4): 1700-1709.
313. Wray, W., T. Boulikas, V. P. Wray and R. Hancock (1981). "Silver staining of proteins in polyacrylamide gels." Anal Biochem **118**(1): 197-203.
314. Wright, P. F., R. A. Karron, R. B. Belshe, J. Thompson, J. E. Crowe, Jr., T. G. Boyce, L. L. Halburnt, G. W. Reed, S. S. Whitehead, E. L. Anderson, A. E. Wittek, R. Casey, M. Eichelberger, B. Thumar, V. B. Randolph, S. A. Udem, R. M. Chanock and B. R. Murphy (2000). "Evaluation of a live, cold-passaged, temperature-sensitive, respiratory syncytial virus vaccine candidate in infancy." J Infect Dis **182**(5): 1331-1342.
315. Wu, H., D. S. Pfarr, S. Johnson, Y. A. Brewah, R. M. Woods, N. K. Patel, W. I. White, J. F. Young and P. A. Kiener (2007). "Development of motavizumab, an ultra-potent antibody for the prevention of respiratory syncytial virus infection in the upper and lower respiratory tract." J Mol Biol **368**(3): 652-665.

316. Wyde, P. R., S. N. Chetty, A. M. Jewell, G. Boivin and P. A. Piedra (2003). "Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin in vitro." Antiviral Res **60**(1): 51-59.
317. Xu, Y., S. Gao, D. K. Cole, J. Zhu, N. Su, H. Wang, G. F. Gao and Z. Rao (2004). "Basis for fusion inhibition by peptides: analysis of the heptad repeat regions of the fusion proteins from Nipah and Hendra viruses, newly emergent zoonotic paramyxoviruses." Biochem Biophys Res Commun **315**: 664-670.
318. Yao, Q., X. Hu and R. W. Compans (1997). "Association of the parainfluenza virus fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins on cell surfaces." J Virol **71**(1): 650-656.
319. Ye, Z., X. Wang, S. Hao, J. Zhong, J. Xiang and J. Yang (2006). "Oncolytic adenovirus-mediated E1A gene therapy induces tumor-cell apoptosis and reduces tumor angiogenesis leading to inhibition of hepatocellular carcinoma growth in animal model." Cancer Biother Radiopharm **21**(3): 225-234.
320. Yim, K. C., R. P. Cragin, M. S. Boukhvalova, J. C. Blanco, M. E. Hamlin, G. Boivin, D. D. Porter and G. A. Prince (2007). "Human metapneumovirus: enhanced pulmonary disease in cotton rats immunized with formalin-inactivated virus vaccine and challenged." Vaccine **25**(27): 5034-5040.
321. Yin, H. S., R. G. Paterson, X. Wen, R. A. Lamb and T. S. Jardetzky (2005). "Structure of the uncleaved ectodomain of the paramyxovirus (hPIV3) fusion protein." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(26): 9288-9293.
322. Yin, H. S., X. Wen, R. G. Paterson, R. A. Lamb and T. S. Jardetzky (2006). "Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation." Nature **439**(7072): 38-44.
323. Yoneda, M., M. C. Georges-Courbot, F. Ikeda, M. Ishii, N. Nagata, F. Jacquot, H. Raoul, H. Sato and C. Kai (2013). "Recombinant measles virus vaccine expressing the Nipah virus glycoprotein protects against lethal Nipah virus challenge." PLoS One **8**(3): e58414.
324. Young, M. L., B. Dickstein, R. E. Weibel, J. Stokes, Jr., E. B. Buynak and M. R. Hilleman (1967). "Experiences with Jeryl Lynn strain live attenuated mumps virus vaccine in a pediatric outpatient clinic." Pediatrics **40**(5): 798-803.
325. Zaitsev, V., M. von Itzstein, D. Groves, M. Kiefel, T. Takimoto, A. Portner and G. Taylor (2004). "Second sialic acid binding site in Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase: implications for fusion." J Virol **78**(7): 3733-3741.

326. Zaman, K., E. Roy, S. E. Arifeen, M. Rahman, R. Raqib, E. Wilson, S. B. Omer, N. S. Shahid, R. F. Breiman and M. C. Steinhoff (2008). "Effectiveness of maternal influenza immunization in mothers and infants." N Engl J Med **359**(15): 1555-1564.
327. Zhu, L., Y. Li, S. Li, H. Li, Z. Qiu, C. Lee, H. Lu, X. Lin, R. Zhao, L. Chen, J. Z. Wu, G. Tang and W. Yang (2011). "Inhibition of influenza A virus (H1N1) fusion by benzenesulfonamide derivatives targeting viral hemagglutinin." PLoS One **6**(12): e29120.
328. Zimmer, G., K. K. Conzelmann and G. Herrler (2002). "Cleavage at the furin consensus sequence RAR/KR(109) and presence of the intervening peptide of the respiratory syncytial virus fusion protein are dispensable for virus replication in cell culture." J Virol **76**(18): 9218-9224.
329. Zuniga, A., Z. Wang, M. Liniger, L. Hangartner, M. Caballero, J. Pavlovic, P. Wild, J. F. Viret, R. Glueck, M. A. Billeter and H. Y. Naim (2007). "Attenuated measles virus as a vaccine vector." Vaccine **25**(16): 2974-2983.