



HAL
open science

Contribution de la protéine PB1-F2 des virus influenza A dans l'adaptation d'une souche virale à son hôte

Joëlle Mettier

► **To cite this version:**

Joëlle Mettier. Contribution de la protéine PB1-F2 des virus influenza A dans l'adaptation d'une souche virale à son hôte. Virologie. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASB034 . tel-03396305

HAL Id: tel-03396305

<https://pastel.hal.science/tel-03396305v1>

Submitted on 22 Oct 2021

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

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

Contribution de la protéine PB1-F2 des
virus influenza A dans l'adaptation
d'une souche virale à son hôte

*Contribution of viral protein PB1-F2 in the adaptation of
influenza A viruses to their hosts*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°581 :

Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

Spécialité de doctorat : Microbiologie

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE, VIM,

78350, Jouy-en-Josas, France

Référent : AgroParisTech

Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,
le 29/06/2021, par

Joëlle METTIER

Composition du Jury

Karim BENIHOUD

Professeur, Université Paris-Saclay

Président

Mariette DUCATEZ

Directrice de recherche, INRAE Centre Occitanie-Toulouse

Rapporteur & Examinatrice

Olivier TERRIER

Chargé de recherche, HDR, CNRS - Université Lyon 1

Rapporteur & Examineur

Béatrice GRASLAND

Directrice de recherche, Anses - Université de Rennes 1

Examinatrice

Direction de la thèse

Ronan LE GOFFIC

Directeur de recherche, INRAE Centre IdF-Jouy-en-Josas-Antony

Directeur de thèse

Christophe CHEVALIER

Directeur de recherche, INRAE Centre IdF-Jouy-en-Josas-Antony

Co-Directeur & Examineur

Remerciements

Je remercie sincèrement Mariette Ducatez et Olivier Terrier de me faire l'honneur d'évaluer ce travail de thèse en tant que rapporteurs. Je remercie grandement les membres du jury de soutenance, Karim Benihoud et Béatrice Grasland, d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je remercie les membres de mon comité de thèse pour leurs conseils et leur bienveillance : Pascale Massin, Nadia Naffakh, Damien Vitour et Sascha Trapp.

Je remercie Sabine Riffault de m'avoir accueillie au sein de l'unité Virologie et Immunologie Moléculaires et Bernard Delmas au sein de l'équipe Virus Influenza.

Je remercie infiniment Ronan Le Goffic et Christophe Chevalier, mes directeurs de thèse, de m'avoir fait confiance et confié ce projet. Vous m'avez offert l'opportunité de découvrir une grande diversité d'approches, cela a été très formateur, enrichissant et surtout passionnant. Je vous en suis profondément reconnaissante. Merci également pour vos conseils scientifiques, votre disponibilité, votre patience et votre bienveillance constantes ainsi que tout le soutien moral que vous m'avez apporté.

Merci aux membres de l'équipe Virus Influenza pour leur disponibilité, leur aide et tous les bons moments passés : Audrey, Bernard, Bertrand, Bruno, Cynthia, François, Jessica, Laura, Laury, Léa, Molidia, Nathalie, Nicolas et Olivier. Léa, merci pour toutes les bases solides que tu m'as transmises, ton humour et ta gentillesse. Bruno et Laura, merci de m'avoir formée et accompagnée tout au long de mon passage dans l'équipe. Merci pour tout ce que vous m'avez transmis, votre patience à toute épreuve et toute l'aide que vous m'avez apportée, au laboratoire comme sur le plan personnel. Cynthia, je garde en mémoire ces longues - mais très plaisantes - heures passées à l'animalerie. Merci pour tes précieux conseils. Olivier, c'était un vrai bonheur de partager ton bureau durant ces trois années. Merci pour tout ce que tu m'as appris, ton expertise, ta bienveillance, ton humour, ta patience sans faille et tous ces moments passés au L3 et dans le RER C (ou plutôt sur les quais en attente du RER C). Merci également pour ton soutien tout au long de la thèse.

J'ai eu beaucoup de chance d'effectuer ma thèse au sein de la VIM. Ce serait difficile d'être exhaustive, donc merci à tous ses membres qui contribuent à faire de la VIM un environnement de travail très agréable. Merci à Marie Galloux, Stéphane Biacchesi et Jean Millet pour leurs précieux conseils et toutes les discussions très enrichissantes. Merci à Émilie Mérour et Céline Urien pour leur aide et leur bienveillance. Merci à Vincent Andreoletti, Cindy Carpentier et aux animaliers de l'unité expérimentale IERP pour leur appui technique essentiel et leur réactivité. Merci également à Céline Henry, Lydie Correia et Aaron Millan-Oropeza de PAPPISO pour tout ce que vous m'avez appris en spectrométrie de masse, votre sympathie et votre disponibilité.

Hortense et Raphaël, j'ai passé des moments incroyables en votre compagnie, vous me manquez terriblement. Merci infiniment pour votre soutien et votre bonne humeur, j'ai eu beaucoup de chance de vous rencontrer à la VIM. Je vous souhaite plein de courage pour la fin de vos thèses.

Béatrice et Pascale, merci de m'avoir accueillie à Ploufragan après moult rebondissements. J'ai adoré travailler avec vous, cela a été très enrichissant et stimulant. Béatrice, merci pour ta gentillesse, ton implication, tout ce que tu m'as transmis et cette escapade en Bretagne.

A mes amis d'enfance toulousains et d'après : Fanny, Celia, Charlotte, Claire, Sarah, Sélim, Carole, Lorena, Guylène, Gaëtan, Nicolas, Solemne, Quentin et Élise. Je suis très reconnaissante de votre patience et de votre soutien sans faille malgré mes nombreuses absences. J'ai une chance incroyable d'être entourée par des personnes aussi exceptionnelles.

Ilena, difficile de ne pas te citer même si tu ne liras jamais ces lignes, merci d'être ma bulle de bonheur et de me faire évoluer depuis douze ans déjà.

Merci à ma famille pour leur soutien depuis toujours. Maman, Papa, Agnès, Jean-Claude, Stéphane, Claire, Jonathan, Marie-Claude et Jean-Louis, merci pour votre compréhension et votre patience. Claire, tu es mon pilier. Enfin, une pensée pour Mamima et pépé Pierre qui auraient probablement été très fiers.

Table des matières

Abréviations.....	7
Introduction.....	9
Préambule – les maladies émergentes infectieuses	9
1.1 Les virus influenza A.....	12
1.1.1 Caractéristiques générales.....	12
1.1.2 Organisation structurale et génomique.....	12
1.1.3 Cycle de réplication viral	17
1.1.3.1 Internalisation de la particule virale dans la cellule hôte	17
1.1.3.3 Transcription et export des ARNm viraux.....	18
1.1.3.4 Réplication du génome viral et export des RNPv néoformés.....	20
1.1.3.5 Assemblage et libération des nouvelles particules virales.....	21
1.2 Écologie et dynamique des IAV.....	24
1.2.1 Diversité du spectre d'hôtes	24
1.2.2 L'hôte aviaire.....	25
1.2.3 L'hôte humain et modèles expérimentaux mammifères	26
1.2.4 Mécanismes évolutifs	29
1.2.4.1 Origine des virus circulants chez l'Homme	29
1.2.4.2 Dérive antigénique	32
1.2.5 Risque zoonotique.....	32
1.2.6 Facteurs de restriction d'hôtes à l'initiation du cycle viral	35
1.2.6.1 Les récepteurs cellulaires	35
1.2.6.2 Facteurs physiologiques.....	37
1.3 La réponse immunitaire innée face à l'infection	38
1.3.1 Identification du danger par les senseurs cellulaires	39
1.3.1.1 Les TLR.....	39
1.3.1.2 Les RLR.....	41
1.3.1.3 L'inflammasome NLRP3.....	43
1.3.2 Les effecteurs de la réponse immunitaire innée.....	45
1.3.2.1 Les interférons.....	45
1.3.2.2 Autres cytokines pro-inflammatoires.....	48
1.3.2.3 Les chimiokines.....	49
1.3.3 La régulation de la mort cellulaire par la mitochondrie.....	51
1.3.4 Aspect délétère de la réponse inflammatoire et physiopathologie des infections sévères	52
1.4. La protéine PB1-F2	56
1.4.1 Découverte et contexte d'expression.....	56
1.4.2 Une protéine fortement polymorphe.....	57
1.4.3 Contribution de PB1-F2 à la pathogénicité	59
1.4.3.1 Chez l'hôte aviaire.....	59
1.4.3.2 Chez les mammifères.....	60
1.4.4 Propriétés fonctionnelles de PB1-F2	62
1.4.4.1 Tropisme mitochondrial	62
1.4.4.2 Variabilité des propriétés de PB1-F2 selon le type cellulaire.....	62
1.4.4.2.a Cellules épithéliales	62
1.4.4.2.b Cellules immunitaires	65
1.4.4.2.c Relation structure-fonction	66
1.4.5 PB1-F2 favorise les surinfections bactériennes	68
1.4.6 Bilan des propriétés de PB1-F2.....	68

2. Problématique & objectifs	71
3. Matériels et méthodes	73
3.1 Culture des lignées cellulaires.....	73
3.2 Production des virus de l'étude.....	73
3.2.1 Génétique inverse	73
3.2.2 Construction de virus encodant la nanoluciférase.....	74
3.3 Infections des lignées cellulaires.....	75
3.4 Amplification des inocula viraux	76
3.5 Titrage viral.....	76
3.6 Cinétiques de réplication virale	76
3.6.1 Cellules aviaires.....	76
3.6.2 Cellules humaines	77
3.7 Usage de rapporteurs luciférase	77
3.7.1 Étude de l'effet de la co-expression de PB1-F2 et de protéines 14-3-3 sur l'activité NF- κ B et IFN	77
3.7.2 Évaluation de l'activité IFN sur cellules infectées	78
3.8 Purification de protéines PB1-F2 recombinantes	79
3.9 Évaluation de la capacité de PB1-F2 à fibriller.....	80
3.10 Détermination des interactomes par l'approche BioID2.....	80
3.10.1 Principe de la méthode	80
3.10.2 Constructions BioID2.....	83
3.10.3 Immunofluorescence.....	83
3.10.4 Purification de protéines biotinylées	84
3.10.5 Western Blot	84
3.10.6 Analyse par spectrométrie de masse.....	85
3.10.6.1 Digestion des protéines sur gel	85
3.10.6.2 Séparation et détection des peptides par LC-MS/MS	86
3.11 Expériences <i>in vivo</i> en modèle murin.....	86
3.11.1 Lignées utilisées et infection	86
3.11.2 Évaluation de la perméabilité pulmonaire et intestinale.....	87
3.11.3 Analyse histologiques.....	87
3.11.4 Analyse des paramètres respiratoires.....	88
3.11.5 Mesure de signaux bioluminescents.....	89
3.12 Extraction de l'ARN total et analyse par PCR quantitative	89
3.12.1 Extraction - cultures cellulaires.....	89
3.12.2 Extraction - poumons de souris.....	90
3.12.3 Rétrotranscription des ARN.....	90
3.12.3.1 Rétrotranscription non spécifique.....	90
3.12.3.2 Rétrotranscription spécifique de gènes viraux.....	91
3.12.4 PCR quantitative.....	91
3.13 Étude de la capacité répliquative sur œufs embryonnés des virus H7N1-nanoluc	94
3.13.1 Développement embryonnaire	94
3.13.2 Infection d'œufs embryonnés.....	94
3.13.3 Mesure de la bioluminescence sur œufs embryonnés infectés avec un virus encodant la nanoluciférase	95
4. Résultats	96
4.1 Étude des propriétés de PB1-F2 en modèles <i>in vitro</i>	96
4.1.1 Caractérisation des virus de l'étude.....	96
4.1.1.1 Cinétiques de réplication en cellules aviaires.....	97

4.1.1.2 Cinétiques de réplication en cellules humaines.....	98
4.1.2 Caractérisation de la réponse cellulaire	100
4.1.2.1 Modèle cellulaire aviaire.....	100
4.1.2.2 Modèle cellulaire humain.....	101
4.2 Étude de l'impact de PB1-F2 sur la réponse de l'hôte <i>in vivo</i>	108
4.2.1 Capacité des protéines de l'étude à fibriller.....	108
4.2.2 L'expression de la protéine PB1-F2 n'a pas d'impact sur la capacité répliquative et le tropisme de la souche H7N1 lors de l'infection d'œufs embryonnés.....	109
4.2.3 Contribution de la protéine PB1-F2 dans la pathologie de la souche H7N1 dans un modèle de franchissement de la barrière d'espèce.....	111
4.2.3.1 Double acquisition d'activités luciférasés en modèle murin.....	111
4.2.3.2 La protéine PB1-F2 H7N1 exacerbe la pathologie en modèle murin.....	112
4.2.3.3 La protéine PB1-F2 H7N1 perturbe la perméabilité intestinale en modèle murin....	118
4.2.4 Caractérisation de la modulation de la réponse de l'hôte générée par un virus H3N2 selon l'origine du segment PB1.....	120
4.2.4.1 La réponse inflammatoire induite par la souche H3N2 diffère selon l'origine du segment 2.....	120
4.2.4.2 Caractérisation de la réponse transcriptomique de l'hôte.....	125
4.3 Interactomes différentiels des protéines PB1-F2.....	129
4.3.1 Identification d'interacteurs par usage d'une biotine ligase.....	129
4.3.2 Caractérisation des outils utilisés.....	129
4.3.2.1 Expression des constructions	129
4.3.2.2 Fonctionnalité des constructions	130
4.3.3 Analyses par spectrométrie de masse.....	132
4.3.3.1 Interactome de PB1-F2 H7N1 en cellules aviaires.....	135
4.3.3.2 Interactomes en cellules humaines.....	137
4.3.3.2.a Interactome de PB1-F2 H7N1 en cellules humaines	137
4.3.3.2.b Interactome de PB1-F2 H3N2 en cellules humaines.....	139
4.3.3.2.c Interactome commun aux PB1-F2 H7N1 et H3N2 en cellules humaines.....	141
4.3.4 Caractérisation fonctionnelle de l'interaction entre la protéine PB1-F2 H3N2 et celles de la famille 14-3-3	143
4.3.4.1 Protéine 14-3-3 η	144
4.3.4.2 Protéine 14-3-3 ϵ	145
5. Discussion.....	148
5.1 Propriétés de la protéine PB1-F2 H7N1 chez l'hôte aviaire	148
5.2 Propriétés de la protéine PB1-F2 H3N2 chez l'hôte mammifère	150
5.3 Propriétés de la protéine PB1-F2 H7N1 exprimée chez le mammifère	153
5.3.1 Modélisation d'un franchissement de la barrière d'espèce.....	153
5.3.2 Modèle de virus réassorti.....	154
5.3.3 Partenaires cellulaires	155
5.4 Fonctions partagées entre les PB1-F2 étudiées	157
5.5 Considérations techniques et perspectives	158
5.5.1 Approche BioID2	158
5.5.2 Modèle souris NF- κ B-luciférase.....	159
5.5.3 Perspectives.....	159
5.6 Conclusion	162
6. Bibliographie.....	163
Annexes	194

Abréviations

-luc : l'entité considérée est porteuse d'une cassette luciférase

aa : acide aminé

ACP : analyse en composante principale

ADNdb : ADN double brin

ADNg : ADN génomique

ARNc : ARN complémentaire

ARNm : ARN messenger

ARNsb : ARN simple brin

ARNv : ARN viral

AS : acide sialique

ASC : apoptosis-associated speck-like protein containing a carboxy-terminal CARD

AS α 2,3gal : acide sialique associé par une liaison $\alpha(2\rightarrow3)$ à un résidu galactose

AS α 2,6gal : acide sialique associé par une liaison $\alpha(2\rightarrow6)$ à un résidu galactose

BSA : bovine serum albumine

C-ter : terminaison carboxyle de la protéine ou du peptide considéré(e)

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

Da : Dalton

DMEM : Dulbecco's modified eagle medium

DMEM/F12 : Dulbecco's modified eagle medium : nutrient mixture F-12

ECDC : european centre for disease prevention and control

FAO : food and agriculture organization

fc : fold change

FDA : food and drug administration

GFP : green fluorescent protein

HA : hémagglutinine

HES : Hémalun-Éosine-Safran

HPAI : highly pathogenic avian influenza

hpi : heure post-infection

IAV : influenza A virus

IFN : interféron

IRAK : interleukine receptor associated

ISG : interferon-stimulated gene

jpi : jour post-infection

LD50 : lethal dose 50%

LGP2 : laboratory of genetics and

LPAI : low pathogenic avian influenza

M1 : protéine de matrice 1

M2 : protéine de matrice 2

MAVS : mitochondrial antiviral-signaling protein

MDA5 : melanoma differentiation associated gene 5

MEM : minimum Eagle's medium

MOI : multiplicity of infection

Myd88 : Myeloid Differentiation Primary Response 88

N-ter : terminaison amine de la protéine ou du peptide considéré(e)

NA : neuraminidase

nanoluc : nanoluciférase

NEMO : NF- κ B essential modulator

NF- κ B : nuclear factor kappa B

NLRP3 : NLR family, pyrin domain containing 3

NP : nucléoprotéine

NS1 : protéine non structurale 1

NS2 : protéine non structurale 2

OMS : organisation mondiale de la santé

ORF : open reading frame

PA : protéine acide

PA-X : protéine acide cadre X

pb : paire de base

PB1 : protéine basique 1

PB1-F2 : protéine basique 1 - cadre 2

PB1-N40 : protéine basique 1 - Nter tronqué 40

PB2 : protéine basique 2

PCR : polymerase chain reaction

PFU : plaque-forming unit

pi : post-infection

plateforme ESA : plateforme d'épidémiosurveillance en santé animale protéine PB1-F2

qPCR : PCR quantitative

RIG-I : retinoic acid-inducible gene I

RLR : RIG-I-like receptor

RLU : relative light unit

RNase : ribonucléase

RNPc : ribonucléoprotéine brin
complémentaire
RNPv : ribonucléoprotéine virale
ROI : region of interest
SDRA : syndrome de détresse respiratoire
aiguë
souris NF- κ B-luc : souris transgénique
dont le génome intègre une cassette
luciférase reflétant l'activité NF- κ B
STAT : signal transducer and activator of
transcription
SVF : sérum de veau fœtal
TA : température ambiante
TAK1 : mitogen-activated protein kinase 7
TLR : Toll-like receptor
TRAF : TNF receptor associated protein
TRIF : TIR-domain-containing adapter-
inducing interferon β
WT : wild type
 Δ F2 : virus mutant incapable d'exprimer la
protéine PB1-F2

Lignées cellulaires

293T : cellules embryonnaires de rein humain
A549 : cellules épithéliales pulmonaires humaines
BEAS-2B : cellules épithéliales bronchiques humaines
CLEC213 : cellules épithéliales pulmonaires de poulet
DF1 : fibroblastes embryonnaires de poulet
MDCK : cellules rénales canines

Souches virales

C PB1 : virus chimérique H3N2 w/PB1 H7N1
C PB1-NL : virus chimérique C PB1 encodant la nanoluciférase
H1N1 1918 : virus responsable de la grippe espagnole
H1N1 2009 : virus responsable de la grippe mexicaine
H2N2 1957 : virus responsable de la grippe asiatique
H3N2 : A/Scotland/20/1974 (H3N2)
H3N2 1968 : virus responsable de la grippe de Hong-Kong
H3N2-NL : virus H3N2 encodant la nanoluciférase
H7N1 : A/Turkey/Italy/977/1999 (H7N1)
H7N1-NL : virus H7N1 encodant la nanoluciférase
PR8 : A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)
WSN : A/WSN/1933 (H1N1)

Introduction

Préambule – les maladies émergentes infectieuses

En 430 avant notre ère, une maladie infectieuse frappe Athènes alors assiégée par Sparte. L'épidémie persista durant plusieurs années et aurait décimé environ 25% de la population athénienne, soit 75 000 à 100 000 individus [1]. Cette flambée épidémique aurait impacté les choix militaires athéniens et l'affaiblissement de la cité en découlant aurait ainsi contribué à sa défaite dans la guerre du Péloponnèse. Plus de 2000 ans après cet évènement, la population mondiale doit faire face à une nouvelle émergence virale, le SARS-CoV-2, ayant conduit à une pandémie. Compte tenu de l'organisation actuelle de la société modelée par la mondialisation et la dynamique d'échanges associée, une restructuration totale des activités sociologiques et économiques a dû être initiée. En effet, la gestion de cette crise sanitaire a nécessité, notamment, la mise en place d'un confinement appliqué mondialement : pour exemple, en avril 2020, près d'une personne sur trois fut concernée par cette mesure [2]. Outre le bilan humain, les restrictions qu'implique cet état induisent des conséquences ruisselant sur l'ensemble des sphères associées aux activités anthropogéniques. Cela témoigne de l'impact global de l'émergence des maladies infectieuses sur le fonctionnement de la société. Entre les deux évènements précédemment cités, d'autres maladies infectieuses émergentes ont régulièrement touché les populations humaines dont quatre pandémies liées à des virus influenza A (IAV) depuis le XX^{ème} siècle (Figure 1). Ces éléments soulignent l'intemporalité de la problématique de l'émergence des maladies infectieuses ainsi que la difficulté de leur anticipation.

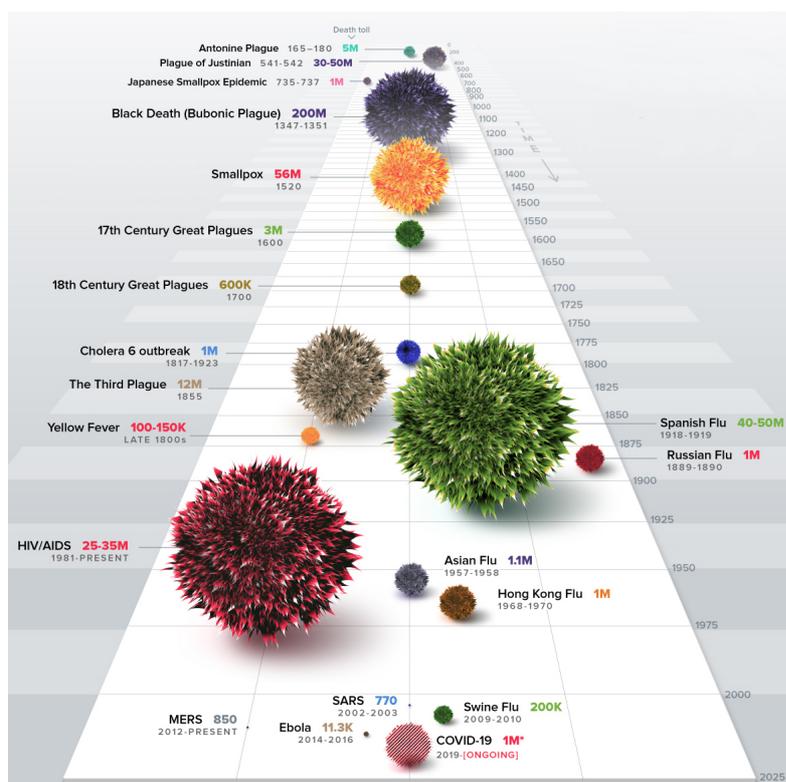


Figure 1 : historique des maladies émergentes.

Les chiffres indiquent le nombre de décès associés à chaque évènement positionné sur la frise chronologique (COVID-19, bilan au 29/09/2020). Adapté de [3].

La biogéographie des principales maladies infectieuses sur la période 1981-2020 révèle que les États-Unis ainsi que certaines régions d'Afrique et d'Asie sont les territoires majeurs d'émergences des maladies infectieuses (Figure 2). La concentration de ces événements est notamment corrélée à la densité de population, à la richesse de la biodiversité et à la pression agricole [4]. La diversité des émergences virales relatives aux IAV est remarquable : H3N2v aux États-Unis, H1N1 au Mexique à l'origine de la pandémie de 2009 et H5N1/H5N6/H7N9/H10N8 en Asie. L'intervalle de temps couvert par l'étude omet les virus pandémiques H1N1, H2N2 et H3N2, agents pathogènes respectifs de la grippe espagnole en 1918 [5], asiatique en 1957 [6] et de Hong-Kong en 1968 [7].

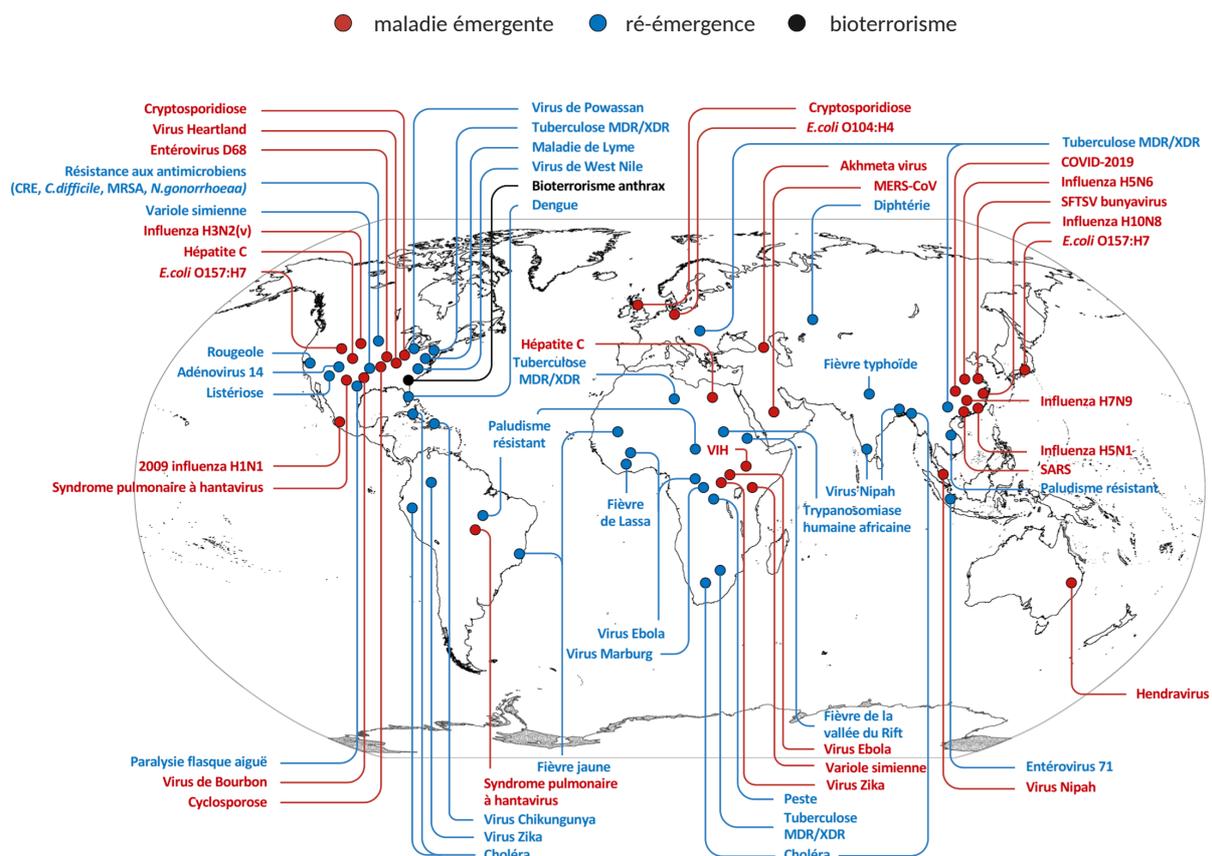


Figure 2 : cartographie des émergences récentes de maladies infectieuses (1981-2020).

Adapté de [8].

Smith et collaborateurs ont conduit une analyse sur une période s'étalant de 1980 à 2013 dans le but d'apporter des éléments de caractérisation des maladies émergentes [9]. Sur l'intervalle de temps considéré, les auteurs ont observé une augmentation régulière et significative du nombre de maladies infectieuses émergentes, en considérant aussi bien les anthroponoses que les zoonoses (Figure 3). Ces dernières sont globalement majoritaires car elles représentent en moyenne 56% des événements recensés. Par ailleurs, les agents viraux occupent une part importante des agents pathogènes émergents (38 % en moyenne). L'association des deux informations précédentes met en exergue le poids des zoonoses virales au sein des risques associés aux infections émergentes. Les IAV possèdent un large spectre d'hôtes au sein duquel des franchissements de la barrière d'espèce et des réassortiments de

matériel génétique viral surviennent. L'ensemble de ces éléments sera abordé par la suite. Les émergences d'IAV chez l'Homme sont donc intrinsèquement liées aux sphères animales dans lesquelles circulent ces virus. En ce sens, les IAV illustrent ainsi pleinement le risque associé aux zoonoses virales.

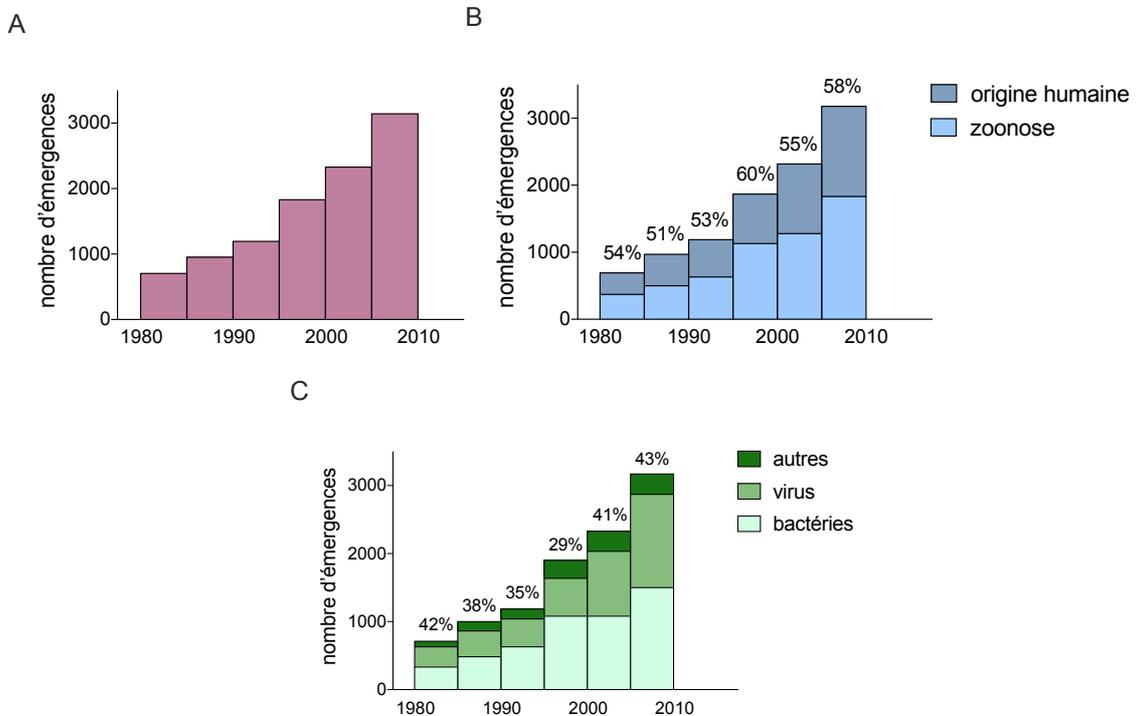


Figure 3 : caractérisation des émergences infectieuses sur la période 1980-2013.

L'évolution du nombre d'évènements recensés [A] est associée au type d'hôte [B] et d'agent pathogène [C]. Les pourcentages indiqués sur les graphiques [B] et [C] indiquent respectivement la part des émergences issues d'une zoonose et celles causées par un agent pathogène d'origine virale. Adapté de [9].

1.1 Les virus influenza A

1.1.1 Caractéristiques générales

Les virus influenza A appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae* qui regroupe des virus dont le génome segmenté comprend six à huit molécules d'ARN monocaténaire de polarité négative. A ce jour, sept genres ont été référencés au sein de cette famille dont quatre correspondant à des virus influenza (A, B, C et D) selon la dernière classification du Comité International de Taxonomie Virale [10]. Les IBV sont des agents pathogènes spécifiques à l'Homme, à l'exception de rares infections identifiées chez le phoque commun [11]. Les IVC circulent à la fois chez l'Homme et le porc [12,13]. Les IDV sont principalement identifiés chez les bovins mais leur spectre d'hôte inclut également les porcs, les chevaux, les petits ruminants et les chameaux [14–16]. Leur potentiel zoonotique n'est pas clairement statué. En effet, bien qu'aucune infection humaine n'ait été recensée à ce jour, un dépistage estime que 1,3% de la population présenterait des anticorps inhibant l'activité de la protéine HA de ces virus [17], suggérant une potentielle capacité des IDV à infecter l'Homme. Les IAV présentent un large spectre d'hôtes incluant de nombreuses espèces aviaires et mammifères au sein desquelles des franchissements de la barrière d'espèce surviennent régulièrement. Il s'agit également du seul type à l'origine de pandémies.

Depuis 1980, chaque virus influenza isolé est répertorié selon une nomenclature définie par l'OMS [18]. Les informations suivantes sont indiquées : type viral (A, B, C, D) / hôte d'origine (si non humain) / numéro d'isolat / année. Dans le cas des IAV, la grande variété de souches virales existante implique une classification basée sur les propriétés antigéniques de deux protéines de surface, l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA). A ce jour, 18 sous-types de HA (H1 → H18) et 11 de NA (N1 → N11) ont été recensés. Le sous-type viral d'un IAV est ainsi précisé à la suite des informations précédentes (H_xN_y). Enfin, les virus d'origine porcine isolés chez l'Homme sont nommés variants, cette information est précisée par l'ajout d'une lettre « v » (H3N2(v) pour exemple).

1.1.2 Organisation structurale et génomique

Pléomorphes, les IAV peuvent adopter une forme sphérique dont le diamètre varie de 80 à 120 nm, ou filamenteuse pouvant alors dépasser 1 µm de longueur (Figure 4A). Cette dernière est observée sur des isolats cliniques frais mais est le plus souvent perdue au cours du processus d'adaptation du virus aux méthodes de culture *in vitro* [19–22].

Les IAV présentent une enveloppe constituée de membrane lipidique d'origine cellulaire acquise lors du bourgeonnement à partir de la cellule hôte. Elle arbore deux glycoprotéines de surface sur lesquelles sont basées la nomenclature évoquée précédemment, la HA et la NA. Le nombre et la répartition de ces protéines peut varier selon la souche considérée mais, globalement, un ratio de 5/1 entre les protéines HA et NA est souvent observé [23,24]. La protéine de matrice M2, canal ionique, est également ancrée au sein de l'enveloppe

virale. De plus, cette dernière est intérieurement tapissée par la protéine de matrice M1, elle constitue ainsi l'entité la plus abondante au sein de la particule virale. M1 contribue par ailleurs à définir la morphologie adoptée par le virus, sphérique ou filamenteuse [22,25]. Le génome viral est composé de huit segments d'ARN monocaténaire de polarité négative (ARNv). Les segments d'ARNv sont numérotés de 1 à 8 selon leur taille décroissante et portent le nom de la principale protéine codée.

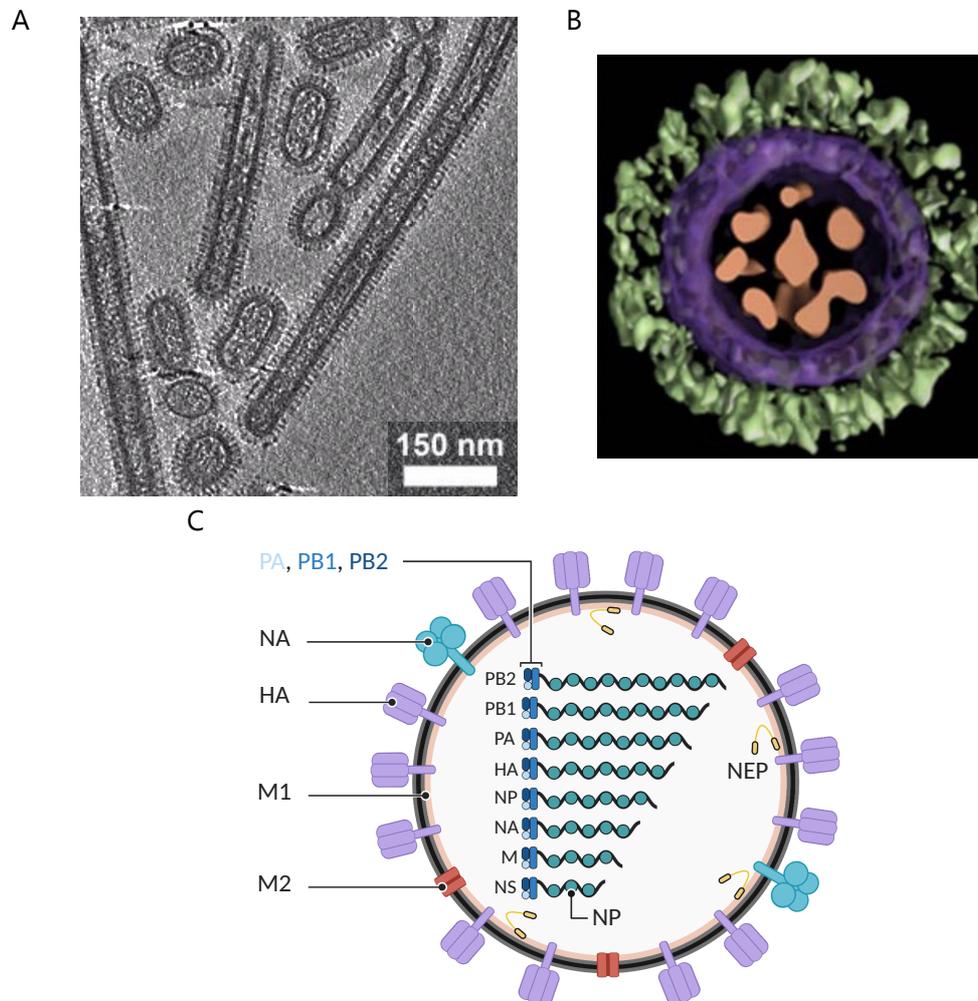


Figure 4 : organisation de la particule virale

[A] Diversité morphologique des particules virales. Tomogramme issu d'une analyse par cryo-microscopie électronique du virus A/Udorn/1972 (H3N2) [26]. Résultat de la segmentation d'une particule virale sphérique issue de la tomographie précédente [27]. [C] Modèle schématisique présentant les composants de la particule virale. Adapté de [28].

Tous les segments présentent une organisation identique. Chaque cadre de lecture ouvert (ORF) est bordé par des séquences non traduites (UTR) dont la taille varie selon le segment considéré. Cependant, les 12 premiers nucléotides (U12) et les 13 derniers (U13) sont strictement conservés entre les différents segments et souches virales (Figure 5A) [29]. Ces séquences constituent les éléments promoteurs de la transcription et de la réplication. Leur complémentarité partielle permet leur appariement ce qui impose aux ARNv un repliement à l'origine d'une structure dite en poêle à frire (panhandle model) [30–32] (Figure 5B).

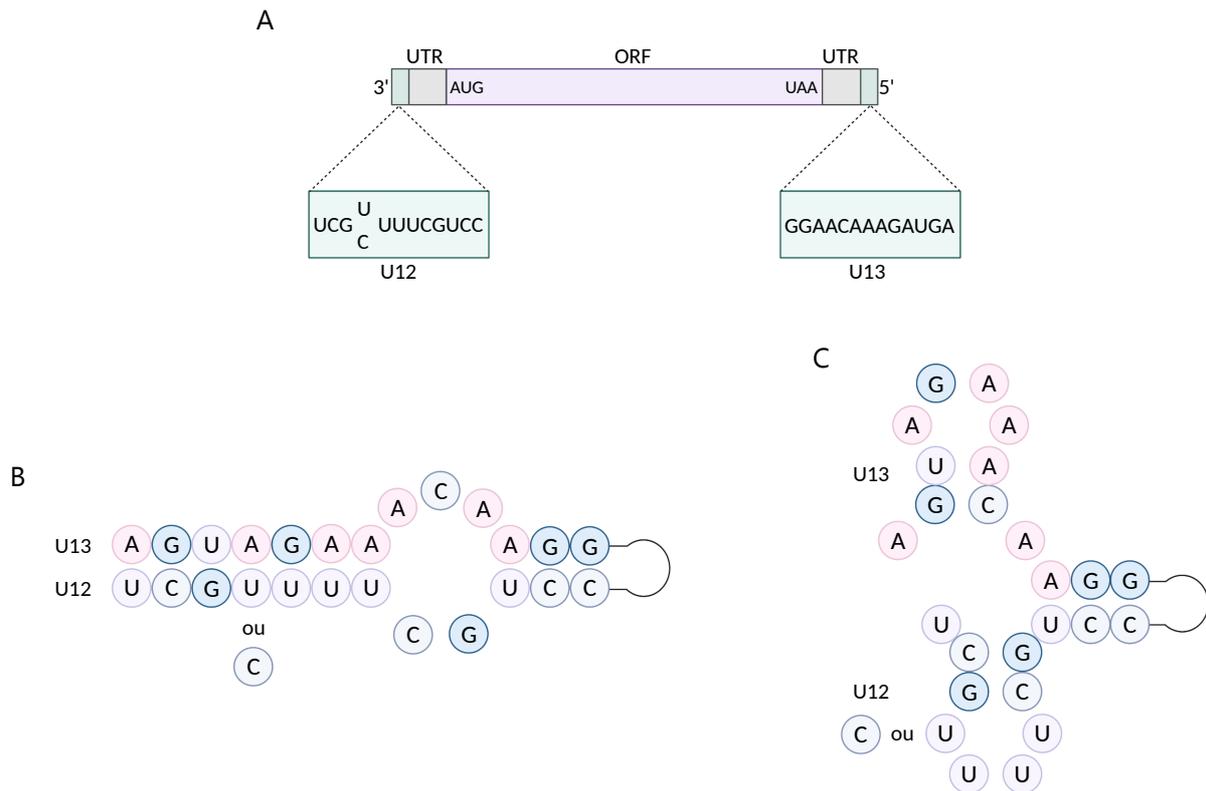


Figure 5 : structure des segments génomiques des IAV.

[A] Organisation génétique commune aux huit segments d'ARNv. [B] Modèle de repliement en « poêle à frire » adoptée par l'ARNv. [C] Modèle de repliement « en tire-bouchon » adopté lorsque l'ARNv est associé à la polymérase virale. Adapté de [33].

Les ARNv sont organisés sous forme de ribonucléoprotéines (RNPv), encapsidés par des homopolymères de nucléoprotéine (NP). L'ensemble présente une structure en double hélice [34]. Les RNPv sont également associées au complexe polymérase virale constitué de trois sous-unités : PA, PB1 et PB2 (Figure 6). Il semblerait que les ARNv associés à la polymérase virale adoptent un repliement caractérisé par une forme « en tire-bouchon » plutôt que l'organisation panhandle évoquée précédemment (Figure 5C) [35,36]. Au sein de la particule virale, les RNPv sont organisées sous un format 7+1 : une RNPv centrale encerclée par les sept autres entités (Figure 4B). Cette organisation serait notamment assurée par des interactions entre les séquences associées à l'empaquetage des RNPv situées aux extrémités 3 et 5' des ARNv. Enfin, la protéine d'export nucléaire NEP - ou NS2 (protéine non structurale 2) selon la nomenclature – est également retrouvée au sein de la particule virale, associée à M1.

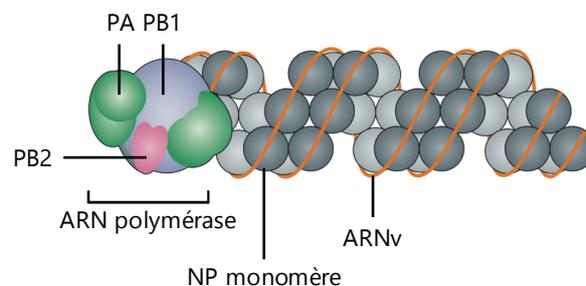


Figure 6 : structure des RNPv.

Les ARNv sont encapsidés par des unités de NP, le complexe ribonucléoprotéique formant une structure en double hélice. Les RNPv sont associées à l'ARN polymérase virale composée de trois sous-unités (PA, PB1 et PB2). Adapté de [37].

Outre les protéines présentes au sein de la particule virale citées précédemment, le génome des IAV code également des protéines synthétisées au cours du cycle viral dont la protéine non structurale 1 (NS1) qui inhibe notamment la réponse de l'hôte développée face à l'infection et des protéines accessoires. Ces protéines ne sont systématiquement exprimées par toutes les souches, notamment PB1-F2. Au total, dix-neuf protéines virales ont été recensées à ce jour [38]. Diverses stratégies sont employées afin de permettre l'expression de plusieurs protéines à partir d'un même segment : épissage (M2, M42, NS2), cadre de lecture alternatif (PB1-F2, PB1-N40) ou décalage ribosomique au cours de la traduction (PA-X). Le génome des IAV est en conséquence particulièrement compact. Les fonctions générales des protéines virales sont exposées au sein du Tableau 1.

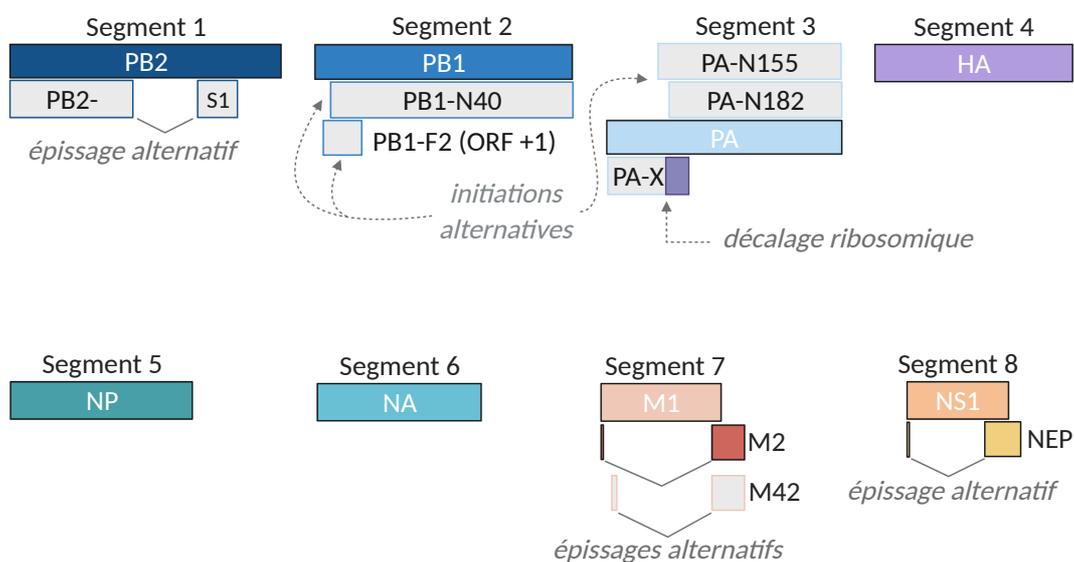


Figure 7 : organisation du génome des IAV.

Les huit segments d'ARNv sont détaillés afin de mettre en évidence les différents cadres de lecture codant les protéines virales. Adapté de [39].

segment	longueur du segment (pb)	protéine codée	taille (aa)	nombre de molécule/virus	fonction principale	ref pour les protéines accessoires
1	2341	PB2	759	30-60	reconnaissance et liaison de la coiffe	
		PB2-S1	508	-	inhibition de la réponse antivirale et de l'activité de la polymérase	[40]
		PB1	757	30-60	ARN polymérase ARN-dépendante	
2	2341	PB1-F2	90	-	facteur de virulence	[41]
		PB1 N-40	718	-	non décrite	[42]
		PA	716	30-60	endonucléase (vol de coiffe)	
3	2233	PA-X	252	-	répression de l'expression des gènes transcrits de l'hôte, facteur de virulence	[43]
		PA-N155	568	-	probablement impliquée dans la réplication virale	[44]
		PA N-182	535	-	probablement impliquée dans la réplication virale	[44]
4	1778	HA	566	500	liaison au récepteur cellulaire, fusion de la membrane virale et celle endosomale (libération du matériel génétique)	
5	1565	NP	498	1000	liaison aux ARNv et export nucléaire des RNPv	
6	1413	NA	454	100	activité neuraminidase (clivage entre HA et le récepteur cellulaire, libération des néo-virus)	
		M1	252	3000	protéine de matrice, export des RNPv	
7	1027	M2	97	20-60	canal ionique (acidification de l'endosome nécessaire à la libération du matériel génétique viral)	
		M42	99	-	pourrait remplacer fonctionnellement M2	[45]
8	890	NS1	230	-	inhibition de la réponse antivirale	
		NEP/NS2	121	130-200	exporte nucléaire des RNPv	

Tableau 1 : caractérisation du génome des IAV, des protéines codées et de leurs fonctions principales.

Basé sur [29,38,46].

1.1.3 Cycle de réplication viral

La durée du cycle viral est estimée à cinq à huit heures [47,48]. Un schéma bilan résumant les différentes étapes est proposé en Figure 10.

1.1.3.1 Internalisation de la particule virale dans la cellule hôte

Le cycle viral est initié par la protéine HA dont l'interaction avec son récepteur cellulaire permet l'entrée du virus dans la cellule hôte. Le récepteur des IAV est un acide sialique (AS), terme générique caractérisant un ose dérivé de l'acide neuraminique. Le plus abondant des AS est l'acide N-acétylneuraminique (Neu5Ac). Ce résidu est trouvé à l'extrémité des chaînes des glycoprotéines et glycosphingolipides composant le glycocalyx [49]. Selon les propriétés de la liaison associant l'AS à la glycoprotéine, deux types de récepteurs sont distingués. Les virus aviaires et mammifères présentent une affinité préférentielle pour l'un des deux types (en page 35). Le complexe d'interaction HA-SA a été cristallisé en 1988 [50]. La protéine HA mature est issue du clivage protéolytique d'un précurseur non fonctionnel HA0 constitué de deux sous-unités associées par un pont disulfure : HA1 qui porte un domaine de liaison à l'AS et HA2 possédant un peptide de fusion [51].

L'entrée du virus peut s'opérer *via* différents mécanismes d'endocytose : les vésicules de clathrines, les cavéoles ou bien par macropinoctyose [52–54]. Le dernier cas est particulièrement observé dans le cas des virus présentant une morphologie filamenteuse. Tous les AS ne sont pas associés à une protéine possédant une fonction de signalisation. Cela soulève le fait que toutes les protéines sialysées ne sont pas équivalentes dans leur capacité à initier l'endocytose. Certains récepteurs fonctionnels ont été identifiés, notamment un canal calcique voltage-dépendant Ca(v)1.2 [55] et le récepteur du facteur de croissance épidermique EGFR [56]. L'activité sialidase de la NA peut rapidement rompre la liaison entre l'AS lié à la HA et une chaîne glucidique peu opportune. Cela assure une certaine motilité à la particule virale lui permettant de parcourir la surface cellulaire et de sélectionner un récepteur préférentiel apte à initier l'internalisation du virus [57].

La maturation de l'endosome précoce en endosome tardif est associée à une acidification à l'origine de l'ouverture du canal ionique M2 (à ~pH 5) [58]. Cela se traduit par l'entrée d'un flux de protons de l'endosome au sein de la particule virale. Initialement, la protéine M1 interagit avec les RNPv, les maintenant à proximité de l'enveloppe virale. Le flux de protons a pour effet d'abolir cette interaction pour permettre leur libération. En parallèle, la protéine HA est également sujette à un changement conformationnel exposant le peptide de fusion de la sous-unité HA2 [59]. Cette dernière s'oriente alors en direction de la membrane de l'endosome avec laquelle elle va interagir. Un second changement de conformation permet de rapprocher l'enveloppe virale et la membrane endosomale, ce qui aboutit à la formation d'un pore de fusion par lequel peuvent transiter les RNPv dissociés de la protéine M1 et rejoindre le cytoplasme.

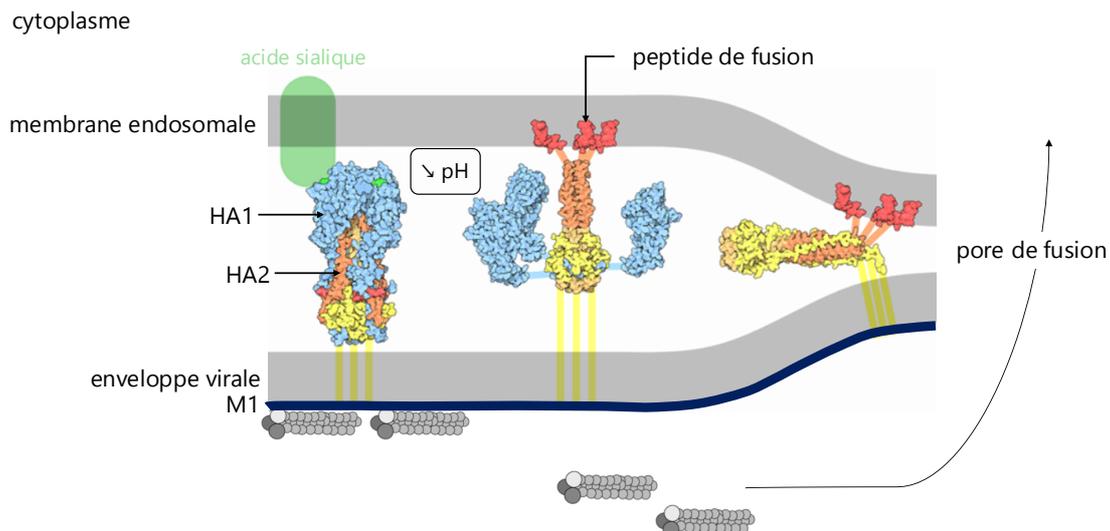


Figure 8 : modèle d'export des RNPv dans le cytoplasme.

L'endosome s'acidifie au cours de sa maturation. La baisse du pH provoque des changements de conformation des protéines HA et M2. Le démasquage du peptide de fusion de la sous-unité HA2 permet son interaction avec la membrane endosomale et la formation d'un pore de fusion reliant l'intérieur de la particule virale au cytoplasme. La protéine M2 induit un flux de protons dans la particule virale qui libère les RNPv associées à l'enveloppe virale. L'ensemble de ces transformations conduisent au transit des RNPv vers le cytoplasme.

1.1.3.2 Import des RNPv au noyau

Contrairement à la plupart des virus à ARN de polarité négative, les étapes de réplication et de transcription ont lieu dans le noyau. Le transport des RNPv jusqu'à la membrane nucléaire pourrait se faire par diffusion car aucune intervention de filaments de microtubules ou d'actine n'a été identifiée [60]. Il semblerait que le complexe des huit RNPv soit maintenu dans le cytoplasme et ne soit dissocié qu'après import nucléaire [61,62]. Les protéines NP portent plusieurs signaux de localisation nucléaire (NLS) leur permettant d'interagir avec l'importine α qui recrute ensuite l'importine β [60,63–66]. Cette dernière interagit directement avec les protéines du pore nucléaire, ce qui assure l'import du complexe trimérique. Au sein du noyau, la GTPase RAN interagit avec les importines ce qui induit la dissociation du complexe d'import et la libération des RNPv au sein du nucléoplasme.

1.1.3.3 Transcription et export des ARNm viraux

La synthèse de nouveaux virions nécessite d'une part la production des protéines constituant la particule virale et, d'autre part, l'amplification du génome. Ces deux mécanismes sont dépendants du complexe polymérase viral. Chaque RNPv fonctionne comme une unité de transcription et de réplication indépendante. Le génome des IAV étant de polarité négative, la synthèse des protéines virales nécessite en premier lieu de transcrire les segments d'ARNv en ARNm. La transcription permet ainsi d'obtenir un segment complémentaire de l'ARNv matrice présentant une orientation 5' → 3' et arborant une coiffe à son extrémité 5' ainsi qu'une queue polyadénylée à celle 3'.

La polymérase virale ne peut produire une coiffe, elle est ainsi obtenue par vol d'une coiffe portée par un ARN cellulaire (cap snatching), mécanisme partagé par les familles virales des *Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae* et *Arenaviridae* [67]. La sélection des ARN de l'hôte ne serait pas aléatoire. En effet, une étude suggère que les ARN non codants (notamment les ARN nucléaires U1 et U2) seraient préférentiellement visés ainsi qu'une classe de petits ARN associés aux promoteurs des gènes cellulaires [68]. L'accès de la polymérase virale à des ARN coiffés de l'hôte est permise par son interaction avec le domaine C-terminal de l'ARN polymérase II [69–71]. Ce rapprochement facilite la reconnaissance de la coiffe par la protéine PB2 puis son clivage par l'activité endonucléase de PA [72]. Ce dernier est réalisé 10 à 13 paires de base en aval de la coiffe [73]. L'extrémité 3' libre de l'oligonucléotide obtenu est insérée au sein du site actif de la polymérase virale où il est arrimé à l'extrémité 3' de l'ARNv afin de servir d'amorce pour l'initiation de la transcription [74–76]. Ces étapes sont résumées en Figure 9. Les ARNv possèdent en leur extrémité 5' une courte succession d'uridines dont la lecture provoque un bégaiement de la polymérase à l'origine de la terminaison de la transcription ainsi que la formation d'une queue polyadénylée [77,78] nécessaire à l'export des ARNm viraux [79]. Par ailleurs, la concaténation d'un ARN cellulaire et viral suggère la probable apparition d'ARN codants inédits contenant une portion nucléotidique issue de l'ARN de l'hôte et une issue de l'ARNv. Récemment, une étude a observé l'existence de tels ARNm chimériques au sein de cellules infectées par un IAV [80]. En modèle murin, une possible contribution à la pathogénicité des protéines codées par ces ARNm a été observée.

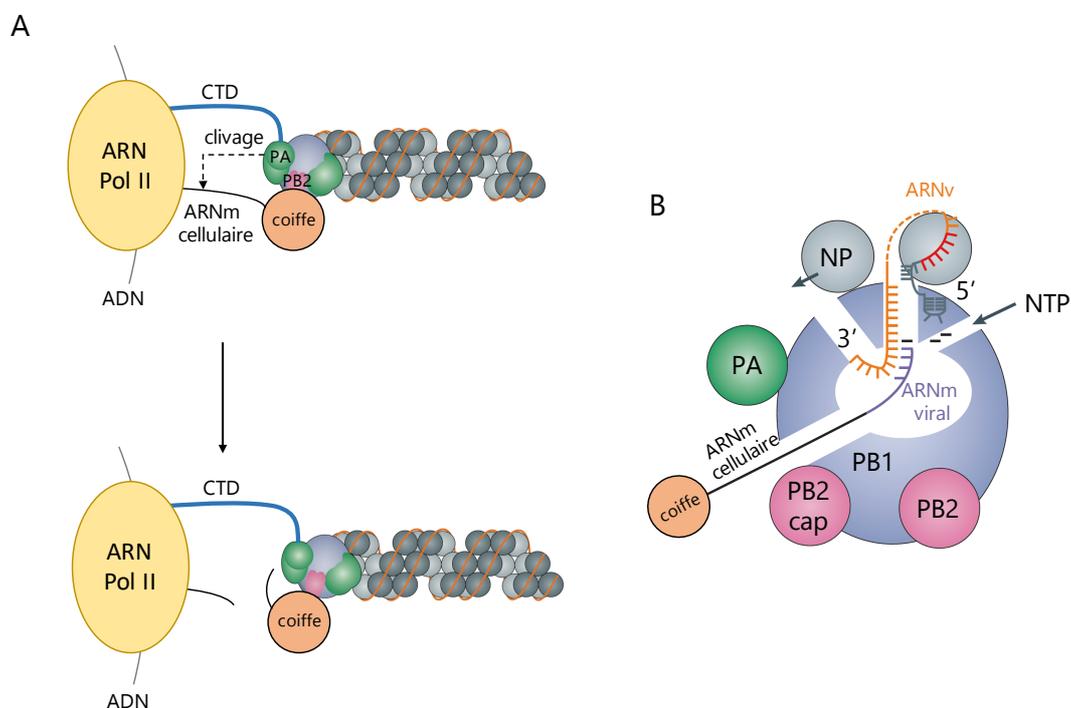


Figure 9 : mécanismes associés à la transcription des ARNv.

[A] Vol de coiffe. Le rapprochement entre les ARNm cellulaires et les RNPv est permis par l'interaction entre le domaine C-ter de l'ARN pol II et le complexe polymérase virale. La sous-unité PB2 reconnaît et fixe la coiffe qui est ensuite clivée par l'activité endonucléase de PA. [B] La portion d'ARN cellulaire coiffé clivé sert de matrice à la protéine PB1 pour amorcer la synthèse de l'ARNm viral. PB2 cap : domaine d'interaction de PB2 avec la coiffe. Adapté de [37,81].

Les transcrits viraux sont sujets à des modifications post-transcriptionnelles telles que la méthylation de résidus adénosines [82,83] ou des épissages alternatifs dans le cas des segments PB2, M et NS [40,84]. Le principal acteur impliqué dans l'export nucléaire des ARNm cellulaires est la protéine NXF1 (nuclear export factor 1) associée en complexe avec son cofacteur p15. Cet hétérodimère interagit à la fois avec les nucléoporines et les ARNm, permettant leur passage à travers les pores nucléaires [85]. Une étude décrit la contribution de ce complexe dans l'export des ARNm viraux des IAV [86], néanmoins d'autres mécanismes atypiques ont également été suggérés, notamment dans le cas des segments PA, PB1 et PB2 [87,88]. Dans le cytoplasme, les ARNm viraux coiffés et polyadénylés sont reconnus comme des ARN endogènes par les ribosomes qui assurent en conséquence leur traduction.

Les protéines constituant les RNPv (PA, PB1, PB2, NP) ainsi que M1 sont importées au noyau afin d'entretenir l'activité de la polymérase virale et de former de nouveaux RNPv. Les protéines PA et PB1 sont transloquées sous forme de dimères par interaction avec le facteur d'import cellulaire RanBP5 [89]. Les NLS portés par PB2, M1 et NP sont suffisants à leur import individuel [63,89,90].

Les IAV disposent de plusieurs stratégies afin de détourner la machinerie cellulaire à leur avantage. La protéine NS1 contribue à favoriser la traduction des ARNm viraux par rapport aux cellulaires en limitant l'export nucléaire de ces derniers et en favorisant le recrutement des ribosomes au niveau des ARNm viraux [91,92]. Par ailleurs, la protéine PA-X possède à l'instar de PA une activité endonucléase qu'elle exercerait de façon spécifique afin de dégrader les transcrits cellulaires [93].

1.1.3.4 Réplication du génome viral et export des RNPv néoformés

Contrairement à la transcription, la réplication ne nécessite pas d'amorce. En premier lieu, un intermédiaire de réplication de l'ARNv est synthétisé. Il s'agit du brin complémentaire de polarité positive noté ARNc. Les ARNc ne sont pas nus mais associés aux protéines NP au cours de leur production afin de les stabiliser et de les protéger des nucléases cellulaires [94]. Les RNPc servent ensuite de matrice afin de produire de nouveaux RNPv.

La réplication du génome viral est chronologiquement séparée de la transcription. Cette dernière est prédominante aux phases précoces de l'infection tandis que l'activité de réplication se développe au cours de l'infection [95]. En effet, la concentration maximale en ARNm est rapidement atteinte puis chute tandis que celle en RNPv augmente progressivement. Les facteurs à l'origine de la transition de fonction du complexe polymérase ne sont à ce jour pas parfaitement caractérisés. Les modèles suivants ont notamment été proposés :

- les ARNm et ARNc seraient produits simultanément mais les ARNc seraient dégradés en début d'infection, lorsque les protéines NP ne sont pas synthétisées et importées au noyau en quantité suffisante afin de protéger les ARNc et les ARNv néo-synthétisés des nucléases cellulaires [94].

- la polymérase virale est dépendante de la disponibilité en ARN capés et donc de l'activité de polymérase II cellulaire. En ce sens, l'activité de transcription serait favorisée en début d'infection lorsque les ARN capés sont abondants. Au cours de l'infection, une baisse de leur concentration nucléaire et la dégradation de la polymérase II suite à son ubiquitinylation est observée [96]. Cela induirait en conséquence une transition vers l'activité de réplication.
- les protéines NEP et NP contribueraient à la synthèse de petits ARNv (<27 nucléotides) correspondant aux extrémités 5' des différents segments d'ARNv. La production de ces derniers est corrélée avec l'accumulation des segments viraux, ce qui constituerait un signal de transition vers l'activité répliquative [97].

L'export des RNPv implique l'exportine Crm1 et la GTPase Ran. L'interaction avec Crm1 n'est pas directe, la protéine M1 est nécessaire en tant qu'intermédiaire. En effet, M1 interagit à la fois avec les RNPv et NEP. Ce dernier porte un motif d'export nucléaire (NES) reconnu par Crm1, ce qui permet son recrutement [98–100]. Avant leur export, les RNPv sont retrouvés associés à la chromatine sous la forme d'un complexe avec Crm1 et Ran [101,102]. Le ciblage de la chromatine pourrait être permis par l'interaction entre NP et la nucléoline [103] et accorderait un accès privilégié à la protéine Rcc1 qui est essentielle à l'activité de Ran puisqu'elle la charge en GTP [102]. Par la suite, dans le cytoplasme, RAN hydrolyserait le GTP ce qui permettrait la dissociation du complexe, sauf M1 qui reste associée aux RNPv. Par ailleurs, une interaction entre NP et Crm1 a également été décrite [104]. Ainsi, un mécanisme d'export indépendant de NEP n'est pas exclu.

1.1.3.5 Assemblage et libération des nouvelles particules virales

Les RNPv sont acheminés vers la membrane plasmique grâce à la protéine Rab11 associée aux endosomes de recyclage. Le transport de ce complexe est assuré par le réseau de microtubules et les filaments d'actine [105–107]. Les protéines HA, NA et M2 nécessitent des modifications post-traductionnelles et transitent ainsi par le réseau trans-golgien [108–111]. La membrane plasmique des IAV est riche en cholestérol et sphingolipides, ce qui suggère que les zones préférentielles de bourgeonnement correspondent aux radeaux lipidiques. Une interaction directe entre ces domaines membranaires et les protéines HA et NA a été recensée [112,113]. La protéine M2 est exclue de ces domaines et se situe plutôt à l'interface entre les radeaux lipidiques et les portions de membrane fluide qui entourent la zone de bourgeonnement (Bulk membrane) [114]. L'accumulation de HA et de NA au niveau des radeaux lipidiques permet d'initier la courbure membranaire nécessaire au bourgeonnement [112,115]. La protéine M1 est recrutée via les queues cytoplasmiques des protéines HA et NA [116–118]. La multimérisation de M1 sous la membrane cellulaire altérerait davantage la courbure initiée par les protéines de surface [119]. Enfin, la protéine M2 agit lors des dernières étapes en permettant de rompre le lien entre la portion de membrane constituant l'enveloppe virale et le reste de la membrane plasmique [114].

L'emballage des segments viraux est probablement assuré par l'interaction des protéines M1 associées aux RNPv avec les glycoprotéines de surface. En effet, l'abolition des motifs d'interaction entre M1 et les protéines HA et NA se traduit par une diminution de la quantité d'ARNv dans les particules virales [120]. L'emballage des huit segments viraux est un mécanisme sélectif, ce qui assure l'incorporation d'un jeu complet d'ARNv au sein du virus néoformé. Les RNPv sont intégrés dans la particule virale sous la forme d'un complexe supramoléculaire maintenu par des interactions ARN-ARN. Par ailleurs, les RNPv adoptent une organisation conservée dite en 7 +1 correspondant à une RNPv entourée des sept autres (revue [121]).

Tandis que la HA initie le cycle réplcatif, la NA l'achève par son activité sialidase qui permet de rompre la liaison entre les acides sialiques retenant les nouveaux virus formés après bourgeonnement et le résidu de sucre adjacent [122,123]. La dualité entre les fonctions de ces deux protéines souligne la nécessité d'une balance fonctionnelle et d'une coévolution des protéines HA et NA permettant de conserver un équilibre [124,125].

Parmi les modifications post-traductionnelles évoquées précédemment, le clivage de la protéine HA est une étape indispensable permettant à la particule virale d'acquérir sa capacité infectieuse. La protéine HA est synthétisée sous la forme d'un précurseur HA0 associé en un complexe trimérique au sein du réticulum endoplasmique. Il est cependant non fonctionnel et requiert ainsi un clivage en deux sous-unités (HA1 et HA2) afin que la protéine HA puisse assurer la fusion entre la membrane endosomale et la membrane virale [51]. Toutes les HA ne présentent pas le même type de site de clivage et ne sont ainsi pas sensibles aux mêmes protéases cellulaires. Les protéines HA des virus humains et de certains virus aviaires ont un site de clivage monobasique, cible des trypsines ou de protéases similaires qui ne semblent être sécrétées que par un nombre restreint de types cellulaires. Chez l'Homme, une sérine protéase produite par les cellules Club de l'épithélium bronchique ainsi que les enzymes HAT et TMPRSS2 exprimées au sein de l'épithélium respiratoire ont notamment été identifiées [126,127]. La faible distribution de ces protéases limite la propagation de ces virus au sein de l'organisme. A l'inverse, certaines protéines HA aviaires présentent un site de clivage polybasique, cible de protéases ubiquitaires de type furine localisées au niveau de l'appareil de Golgi. L'activation a ainsi lieu en amont de la libération des particules virales. Un site de clivage polybasique favorisant la dissémination virale dans l'organisme, il s'agit ainsi d'un marqueur de virulence [128,129].

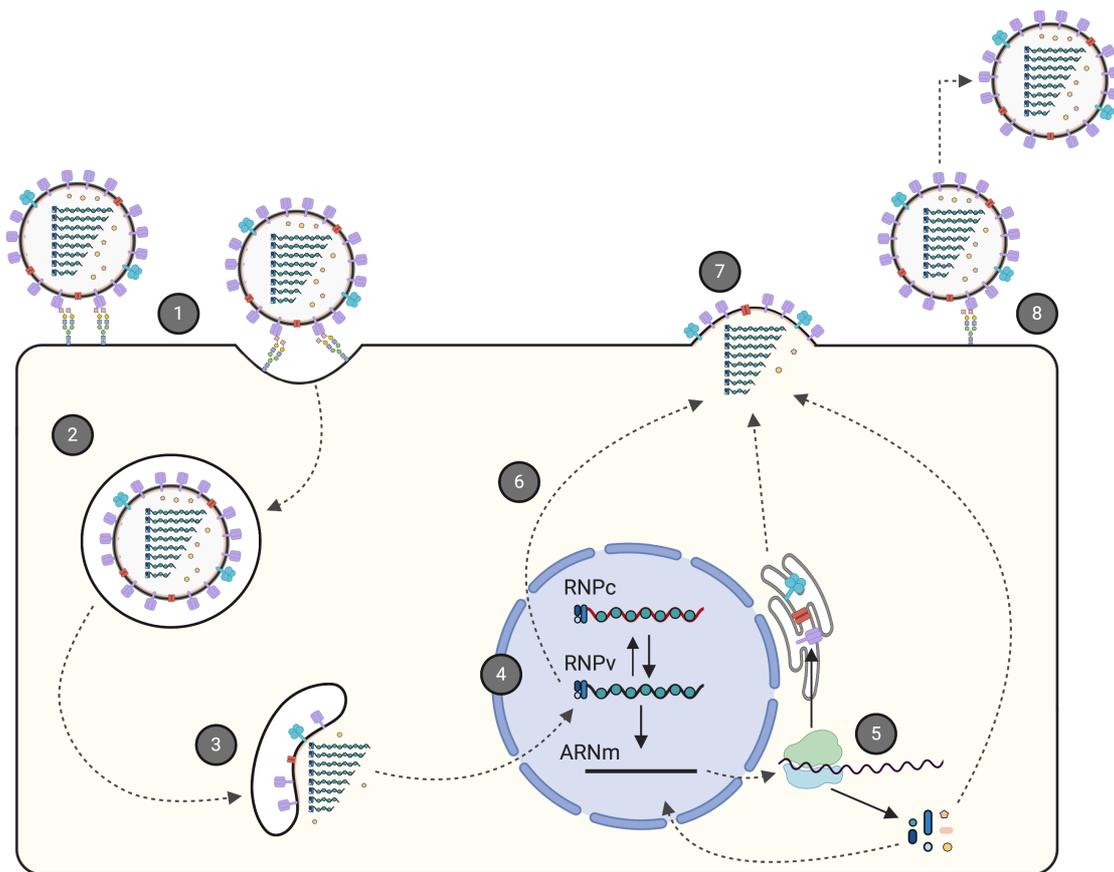


Figure 10 : représentation schématique du cycle répliatif des IAV.

① Fixation de la particule virale à la membrane cellulaire par interaction entre la protéine HA et des acides sialiques. ② Internalisation de la particule virale par endocytose. ③ Suite à l'acidification de l'endosome et activation du canal ionique M2, des changements conformationnels des protéines HA et M1 permettent la libération du matériel génétique viral dans le cytosol. ④ Les RNPv migrent au noyau où sont réalisées les étapes de transcription et répliation du génome viral. ⑤ Les ARNm viraux sont traduits par la machinerie cellulaire ribosomale. ⑥ Les RNPv néo-synthétisés sont exportés du noyau et adressés à la membrane plasmique. ⑦ Les différents constituants viraux sont assemblés et la sortie du virus se fait par bourgeonnement. ⑧ Enfin, l'activité sialidase de la NA permet la libération des particules virales formées dans l'espace extracellulaire.

régule de plus la conservation des virus au sein de l'environnement et les mouvements de populations animales propices aux échanges de virus. Le triptyque santé humaine – santé animale – environnement correspond au concept One Health développé à l'aube des années 2000. Il s'agit d'une approche holistique et transdisciplinaire dont l'objectif est de renforcer les liens entre les différents acteurs et secteurs impliqués dans la gestion et la prévention des risques sanitaires. L'initiation du concept One Health fait suite à une inquiétude grandissante relative à l'émergence de maladies infectieuses et notamment en lien avec la fréquence des infections humaines par des virus H5N1 aviaires. A l'échelle européenne, trente-neuf partenaires issus de dix-neuf États membres sont regroupés au sein d'un consortium coordonné par l'Anses.

1.2.2 L'hôte aviaire

Pathologie développée

Les virus aviaires sont distingués selon une classification hautement/faiblement pathogène basée sur la sévérité des signes cliniques induits chez le poulet. Un virus hautement pathogène (HPAI pour highly pathogenic avian influenza) se caractérise par une virulence importante, plus de 75% de mortalité induite lors d'une inoculation par voie intraveineuse. Dans le cas des sous-types H5 ou H7, la présence d'un site de clivage polybasique au sein de la protéine HA est suffisante à l'attribution de ce qualificatif ([Directive Européenne 2005/94/EC](#)). Les protéines HA portant ce motif peuvent être activées par des protéases ubiquitaires, ce qui facilite la diffusion du virus au sein de l'organisme [129,134]. Cette particularité propre aux virus H5 et H7 est justifiée par le fait que la quasi-totalité des virus HPAI appartiennent à ces sous-types. Par défaut, les virus ne présentant aucune de ces caractéristiques sont qualifiés de faiblement pathogènes (LPAI pour low pathogenic avian influenza). Les virus LPAI peuvent ainsi être associés à des infections subcliniques ou au développement de signes cliniques peu sévères (baisse du rendement de production, dyspnée, plumes ébouriffées, écoulement oculaire, éternuements) [135].

Chez les ansériformes, malgré une réplication efficace des virus LPAI – particulièrement au niveau digestif – le développement de signes cliniques est peu commun [135–137]. Antérieurement à l'émergence de la lignée eurasienne de virus H5N1 HPAI en 2002, ces espèces étaient de plus globalement peu sensibles aux virus HPAI. Dans le cas de cette lignée particulière, l'apparition de signes cliniques sévères tels qu'une détresse respiratoire importante (râle) et des atteintes neurologiques suivis d'une mortalité peut être observée selon la souche et l'espèce considérées [138–140].

Gestion des épizooties et vaccination

Diverses stratégies vaccinales sont disponibles sur le marché (vaccins inactivés homologues, vaccins inactivés hétérologues, vaccins recombinants), cependant leur usage

reste limité. Ils sont en effet actuellement principalement employés en dernier recours en tant que vaccination d'urgence [141]. Une gestion par approche sanitaire (dispositifs de quarantaine, abattage des animaux infectés, abattage préventif des animaux situés à proximité d'un foyer infectieux) est préférée car jugée plus efficace pour enrayer rapidement les épizooties. La vaccination prophylactique contre l'influenza aviaire constitue un réel challenge, notamment compte tenu de la diversité de souches circulantes et de leur évolution antigénique diminuant l'efficacité des préparations vaccinales. Par ailleurs, afin de pouvoir exporter des volailles ou des produits dérivés de volaille, la réglementation internationale demande à ce qu'un pays soit en mesure de prouver l'absence de la circulation de souches HPAI au sein de son territoire ([Règlement CE n°798/2008 du 08/08/2008](#)). Cela impose une stratégie de vaccination permettant de distinguer les animaux vaccinés de ceux infectés (DIVA) et des coûts de surveillance qui s'additionnent à ceux du vaccin afin de justifier le statut indemne. Par ailleurs, la vaccination peut favoriser la circulation de virus à bas bruit. Cela biaise l'analyse du risque auquel la population humaine est exposée et constitue un réel problème compte tenu de l'aptitude de certains IAV aviaires à franchir la barrière d'espèce.

Un modèle a tenté d'estimer l'impact macroéconomique d'une épizootie en variation du PIB. Avec pour hypothèse initiale une perte de 12% des volailles (suite à l'infection ou par abattage préventif), l'étude propose que le coût de la gestion d'une telle épizootie correspondrait à une baisse de 0,1% du PIB dans le cas des pays à revenus élevés et de 0,4% dans les pays en voie de développement [142]. Pour la France, cela représenterait 2,24 millions d'euros.

1.2.3 L'hôte humain et modèles expérimentaux mammifères

Épidémies saisonnières

Chez l'Homme, les virus influenza sont les agents étiologiques de la grippe. Sur la période 1995-2015 et à l'échelle mondiale, les virus saisonniers ont été à l'origine de 290 000 à 645 000 décès annuels [143]. Les conséquences de la maladie s'accompagnent d'un impact économique important. Pour exemple, en 2015, l'épidémie de grippe aurait induit un coût total estimé à 11,2 milliards de dollars aux États-Unis [144]. Dans les régions tempérées, les épidémies saisonnières sont synchronisées sur les mois d'hiver et en conséquence inversées entre les deux hémisphères. Les facteurs justifiant cette saisonnalité sont encore mal caractérisés. Des études expérimentales ont démontré que des températures et une humidité relative basses sont favorables à la diffusion des virus influenza [145,146]. Par ailleurs, l'analyse de données épidémiologiques a identifié qu'une épidémie suit parfois une période de quinze jours au cours de laquelle l'humidité relative était anormalement basse [147,148]. Une étude conduite sur plus de 18 250 épidémies survenues sur la période 2000-2015 en Australie n'a pas réussi à établir un lien statistique associant les fluctuations climatiques et les propriétés antigéniques des virus au déclenchement d'une épidémie ou à son ampleur. En revanche, la dynamique des épidémies est fortement dépendante de la compétition entre sous-types viraux

circulant localement [149].

Pathologie développée

La propagation des virus influenza chez l'Homme se fait à la fois par contacts directs entre individus et diffusion d'aérosols [150,151]. Les infections liées à des virus saisonniers sont généralement cantonnées à l'appareil respiratoire supérieur. Les symptômes développés sont peu sévères et incluent entre autres : fièvre, myalgie, toux, céphalée [152–154]. Des symptômes gastro-intestinaux peuvent parfois être observés [155]. La période d'incubation est généralement de un à quatre jours [156]. La période d'excrétion virale débute un jour avant l'apparition des symptômes et perdure cinq à sept jours après leur disparition [157,158]. Chez les populations à risque telles que les personnes âgées, en bas-âge ou présentant des facteurs de comorbidité, des symptômes sévères peuvent se développer (pneumonies, syndrome de détresse respiratoire aiguë, rhabdomyolyse, myocardite) [159,160]. Les souches d'IAV circulant au sein de la population humaine appartiennent aux sous-types H1N1 et H3N2. Des études conduites sur des cas recensés en France et au Japon suggèrent que les virus H3N2 induisent des symptômes plus sévères, en se basant sur l'intensité de la fièvre développée ainsi que la présence d'une myalgie [161,162].

Lors d'une infection humaine avec un virus d'origine aviaire, les symptômes développés sont assez variables. Dans le cas des sous-types H7, des conjonctivites sont couramment observées compte tenu de la présence majoritaire de récepteurs aux IAV aviaires au niveau du tissu oculaire [163]. Dans certains cas particuliers, notamment celui des virus H5N1 HPAI ou H7N9 (en page 32), des symptômes sévères peuvent se manifester, particulièrement un important œdème pulmonaire contribuant au développement d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë.

Traitements antigrippaux et vaccins

Deux classes d'antiviraux sont actuellement autorisées dans le traitement des infections grippales par la FDA : les inhibiteurs du canal ionique M2 et ceux de la protéine NA. Les molécules de la première catégorie (amantadine, rimantadine) limitent la libération du génome viral dans le cytoplasme. Cependant, la majorité des souches d'IAV actuellement circulantes présente une résistance à ces molécules [164,165]. Les mutations conférant une résistance aux inhibiteurs de M2 surviennent très rapidement, entre 48 et 96 heures après exposition à l'amantadine [166,167]. En ce sens, l'OMS ne recommande pas leur utilisation en tant que traitement de première intention. Les inhibiteurs de la neuraminidase (principalement oseltamivir et zanamivir) sont des analogues structuraux des acides sialiques. Ils se fixent ainsi au niveau du site actif de l'enzyme la privant d'exercer sa fonction de sialidase. En conséquence, le bourgeonnement des nouveaux virus produits au cours du cycle viral n'est pas complet puisque leur interaction avec la membrane de la cellule hôte ne peut être rompue. Près de 99% des souches saisonnières isolées depuis 2013 présentent une sensibilité aux inhibiteurs de la

neuraminidase [168]. Ces molécules constituent ainsi le principal traitement utilisé actuellement. Cependant, afin d'être efficaces, elles doivent être administrées moins de 48 heures après le début des symptômes grippaux, ce qui constitue un inconvénient majeur à leur emploi.

Compte tenu de l'évolution constante des épitopes viraux (en page 32), les préparations vaccinales sont révisées annuellement sur la base des informations épidémiologiques collectées lors des saisons précédentes. L'OMS recommande alors les trois ou quatre souches virales à inclure pour chaque hémisphère. Compte tenu de l'inversion des saisons, les vaccins pour l'hémisphère nord sont établis sur la base des souches circulant lors de l'épidémie de l'hémisphère sud, et inversement. Les vaccins trivalents contiennent les antigènes de deux souches d'IAV - H1N1 et H3N2 - et d'une souche d'IBV, ceux tétravalents incluent une souche d'IBV supplémentaire. Le plus couramment, les vaccins commercialisés sont élaborés à partir de virus produits sur œufs embryonnés de poule puis chimiquement inactivés et fractionnés. Plus récemment, un vaccin tétravalent atténué a été développé [169]. Toutes souches virales et types de population confondus, une efficacité vaccinale de l'ordre de 60% est observée [170]. La prévision des souches H3N2 à inclure dans les préparations vaccinales semblent être plus délicate que celle des souches H1N1 et d'IBV. En effet, l'efficacité vaccinale relative aux virus H3N2 est plutôt de l'ordre de 30%.

Modèles expérimentaux mammifères communs

La souris est usuellement utilisée en tant que modèle mammifère compte tenu de sa praticité. Relativement à d'autres espèces, son élevage est peu coûteux, nécessite un espace réduit et une grande diversité de réactifs spécifiques ainsi que de lignées transgéniques sont disponibles. Elle n'est cependant pas un hôte naturel des IAV, une adaptation de certaines souches virales obtenue par passages successifs est ainsi parfois nécessaire au développement d'un modèle d'infection [171]. Par ailleurs, une étude suggère que la distribution des types de récepteurs aux IAV au sein de l'épithélium respiratoire murin serait plus favorable aux hémagglutinines aviaires qu'humaines [172]. Cela peut justifier la sensibilité des souris à certaines souches aviaires sans adaptation préalable [173]. Dans un contexte sous-létale d'infection, la cinétique de la pathologie dure généralement une dizaine de jours. Les premiers signes cliniques sont décelables environ cinq jours post-infection, l'acmé est atteinte aux alentours du huitième jour post-infection à laquelle succède enfin une phase de rémission. Les signes cliniques développés correspondent à une anorexie et, contrairement à la fièvre observée chez l'Homme, une hypothermie [174]. L'animal présente de plus un état léthargique, une position prostrée et une piloérection. Un franchissement de la barrière encéphalique se traduisant par des troubles neurologiques est parfois observé avec certaines souches H5N1 HPAI [175]. L'anatomopathologie de tissus pulmonaires indique que les souris infectées développent des lésions similaires à celles observées chez l'Homme et caractéristiques d'une pneumonie (œdème pulmonaire et infiltrat inflammatoire) [176]. Suggérée dans les années 60, la capacité des souris à supporter une transmission inter-individus n'a pas été confirmée par

des études ultérieures [177,178].

Lors d'une infection avec un IAV, les furets développent des signes cliniques similaires à ce qui est observé chez l'Homme (fièvre, éternuement, congestion nasale) [179,180]. Ils présentent également une distribution des types de récepteurs des IAV équivalente à celle observée chez l'Homme [181,182]. De plus, les virus pandémiques sont capables d'une diffusion efficace chez cet hôte, à la fois par contacts directs et aérosols [183–185]. En ce sens, le furet est un modèle préférentiel pour étudier la transmissibilité des IAV.

1.2.4 Mécanismes évolutifs

1.2.4.1 Origine des virus circulants chez l'Homme

Lorsqu'une cellule est simultanément infectée par au moins deux virus différents, le génome segmenté des IAV autorise les échanges de segments viraux durant l'assemblage des particules virales. Les virus hybrides produits sont qualifiés de réassortants. Cette évolution brutale peut être à l'origine de l'émergence d'un virus pandémique. Pour exemple, le système immunitaire humain sera non compétent face à un virus de fond génétique humain ayant acquis des segments codant les protéines de surface HA et NA. Les protéines d'origine humaine codées par le virus étant déjà adaptées à cet hôte, cela peut conférer un avantage au virus réassorti par rapport à un virus d'origine zoonotique pour lequel aucune protéine n'a été préalablement sélectionnée chez l'Homme. Le réassortiment est ainsi le phénomène majeur à l'origine des souches d'IAV pandémiques.

Depuis le XX^{ème} siècle, quatre pandémies liées à des IAV ont été recensées dont les mécanismes liés à leur émergence sont résumés en [Figure 12](#). La première, et la plus meurtrière, est la grippe espagnole de 1918 causée par un sous-type H1N1. Un tiers de la population aurait été infecté au cours de cet épisode (~500 millions de personnes). Les symptômes développés ont été particulièrement sévères, et on estime entre 50 et 100 millions le nombre de décès. Les analyses anatomopathologiques des poumons ont fréquemment relevé des signes de bronchopneumonies bactériennes en plus des lésions inflammatoires dues au virus [186]. En ce sens, l'importante mortalité de ce virus a été associée au développement de surinfections bactériennes, sachant qu'il n'existait pas de traitement antibiotique à cette époque [187]. L'analyse génétique suggère une origine aviaire au virus, basée notamment sur la fréquence des résidus uraciles qui tend à être plus faible au sein des segments viraux aviaires que pour les mammifères [188]. En parallèle de cette pandémie, une épizootie porcine a été recensée aux États-Unis. Les signes cliniques développés par les animaux ont été décrits comme similaires à ceux observés dans le cas de la grippe espagnole. Par la suite, il a été démontré que le sérum de personnes infectées par le virus H1N1 de 1918 était capable de neutraliser le virus isolé chez le porc [189]. Ces éléments ont conduit à émettre l'hypothèse que le virus aviaire H1N1 responsable de la grippe espagnole aurait transité chez le porc comme hôte intermédiaire avant d'atteindre la population humaine. De plus, des analyses ultérieures ont révélé que la trachée du porc présente des récepteurs cellulaires convenant à la fois aux virus

aviaires et mammifères [190–193]. Cela a renforcé l'idée que cet hôte pourrait contribuer à l'adaptation de souches aviaires aux mammifères. Plus récemment, une étude génétique suggère que tous les segments du virus H1N1 1918 n'ont pas été introduits simultanément chez l'Homme, l'introduction du segment codant N1 serait en effet plus tardive [194]. Les auteurs proposent un scénario dans lequel le virus de la grippe espagnole serait issu d'un réassortiment entre un virus aviaire (apport du segment N1) et d'un virus humain présentant également une origine aviaire (apport des sept autres segments). Dans cette hypothèse, le virus H1N1 isolé chez le porc correspondrait à une rétro-zoonose.

L'analyse des virus influenza pandémiques à l'origine de la grippe asiatique (H2N2 1957) et de celle de Hong-Kong (H3N2 1968) a clairement identifié qu'ils étaient issus d'un réassortiment [195,196]. Dans le premier cas, le virus H2N2 est issu d'un réassortiment entre un virus H2N2 aviaire et un virus H1N1 humain probablement dérivé de la souche de 1918 [197]. Les virus H2N2 ont continué à circuler dans la population humaine jusqu'en 1968, où ils furent remplacés par la souche pandémique H3N2, issue d'un réassortiment entre un virus aviaire H3 et d'un virus humain H2N2. Au cours de ces pandémies, entre 25 et 30 % de la population humaine aurait développé des symptômes et 1 à 2 millions d'individus seraient décédés [198,199]. Ces deux virus pandémiques ne sont pas associés à une pathogénicité excessivement plus élevée qu'une grippe saisonnière. Il semble que l'augmentation de la mortalité soit due avant tout à l'absence d'une réponse immunitaire préexistante chez l'homme face aux glycoprotéines de surface plutôt qu'à la virulence intrinsèque de ces deux souches.

En 1977, un virus H1N1 a émergé en Russie. L'analyse génétique a indiqué une similarité avec les virus H1N1 circulant dans les années 50, en amont de l'émergence du virus H2N2 de 1957 les ayant remplacés [200,201]. Les virus H3N2 1968 et H1N1 1977 ont co-circulé au sein de la population humaine jusqu'à l'émergence du virus H1N1 pandémique de 2009 qui a remplacé à son tour le virus H1N1 1977.

La pandémie de 2009 a pour origine un virus H1N1 issu d'un multi-réassortiment entre des souches humaines, porcines et aviaires. Les segments HA, NP et NS1 proviennent d'un virus porcin H1N1 « classique » ; les segments NA et M sont issus de souches eurasiennes d'origine aviaire circulant chez le porc ; les segments PA et PB2 proviennent de virus aviaires nord-américains ; tandis que le segment PB1 a pour origine un virus H3N2 humain [202]. Environ un quart de la population mondiale aurait été infectée par le virus H1N1 2009 [203]. Ce virus s'est cependant révélé bien moins pathogène que ses prédécesseurs et aurait occasionné environ 200 000 décès [204].

Un point intéressant à noter est l'origine aviaire du segment PB1 des virus à l'origine de la grippe asiatique et de Hong Kong [195]. Une étude relative au virus H3N2 1968 suggère que cette caractéristique a constitué un élément favorisant sa capacité de réplication et cela aurait pu contribuer à l'efficacité de sa transmissibilité [205]. Dans le cas du virus H1N1 pandémique de 2009, l'introduction artificielle d'un segment PB1 aviaire issu d'un virus HPAI ou LPAI augmente la synthèse d'ARNv en modèle cellulaire [206]. Cela suggère que la sélection d'un segment 2 aviaire lors des réassortiments à l'origine de ce virus pandémique aurait pu apporter un avantage répliatif. L'émergence d'un virus réassorti n'est pas anodine car cela

implique une compatibilité à la fois mécanique lors de l'assemblage des composants viraux et fonctionnelle entre protéines [207,208]. La co-ségrégation de certains segments parfois systématiquement observée impose également une contrainte supplémentaire [208,209]. Cela souligne ainsi la compatibilité d'un segment aviaire PB1 au sein d'un génome viral d'origine humaine.

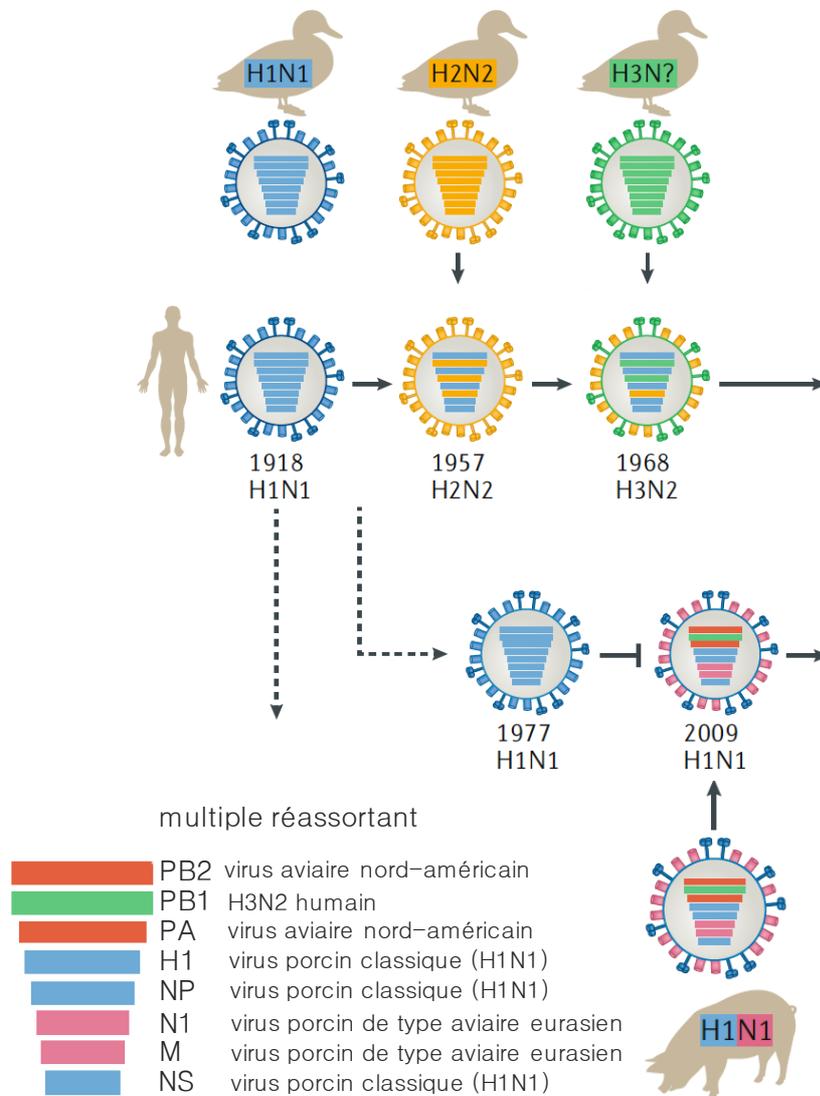


Figure 12 : mécanismes évolutifs à l'origine des virus pandémiques.

Le virus à l'origine de la grippe espagnole en 1918 serait issu d'un franchissement de la barrière d'espèce d'un virus influenza aviaire. Un virus issu d'un réassortiment entre un virus humain H1N1 et un virus aviaire H2N2 a ensuite causé la grippe asiatique en 1957. Puis, un virus humain H2N2 circulant a été réassorti avec un virus aviaire H3, produisant le virus H3N2 à l'origine de la grippe Hong Kong en 1968. Les virus H3N2 contemporains dérivent de cette souche. Enfin, le virus de la grippe mexicaine en 2009 est issu d'un triple réassortiment entre un virus humain H3N2, un virus porcin H1N1 et un virus aviaire. Les virus H1N1 contemporains dérivent de cette souche. Adapté de [133].

L'étude ayant estimé l'impact macroéconomique d'une épizootie s'est également intéressée au cas d'un virus pandémique. En se basant sur une pandémie similaire à celle de 1957 (environ 1 million de décès [198]), la gestion de l'émergence est estimée à un coût représentant 2% du PIB mondial sur la première année (1695 milliards de dollars) [142].

1.2.4.2 Dérive antigénique

Les IAV ayant réussi à se pérenniser au sein de la population humaine sont sujets à une évolution par dérive antigénique. Ce phénomène est principalement dû à la faible fidélité de l'ARN polymérase virale et à son absence d'activité correctrice [210]. Un taux de mutation est estimé à un ordre de grandeur de 10^{-3} mutations par site et par an [211]. Dans le cas des protéines de surface HA et NA, l'accumulation graduelle de ces mutations peut affecter leurs propriétés antigéniques. En conséquence, les anticorps de l'hôte synthétisés lors d'une infection antérieure avec une souche parentale ne reconnaissent plus les épitopes viraux et perdent en efficacité [212]. Il s'agit ainsi d'une stratégie permettant au virus de contourner le système immunitaire.

1.2.5 Risque zoonotique

Facteurs de risque

Les infections humaines par des virus influenza surviennent suite à une exposition directe à un animal infecté. Les principaux lieux de contamination sont ainsi les élevages avicoles, les abattoirs et les marchés commercialisant des volailles vivantes. Ces derniers, événements courants en Asie, sont particulièrement mis en cause compte tenu de la proximité entre de nombreuses espèces. Ils constituent ainsi un point névralgique pour l'émergence de souches virales [213]. Par ailleurs, il existe une grande diversité de structures avicoles en Asie allant des fermes de très petites tailles à des productions de particuliers [214]. Au sein de ces structures, l'application des règles de biosécurité est peu contrôlable et la proximité de diverses espèces animales est également fréquente. Par ailleurs, les sous-types H5 et H7 sont endémiques en Asie. En conséquence, l'Asie, et plus particulièrement la Chine compte tenu de son statut de premier producteur mondial de volaille ([FAO](#)), est ainsi considérée comme l'épicentre de l'émergence des IAV.

De par leur comportement migratoire, les oiseaux de la faune aquatique sauvage participent à la dispersion des virus sur de grandes aires géographiques. Certains points de convergence, comme les lacs Qinghai et Poyang situés en Chine, ont notamment été associés à une diffusion inter-espèces. Pour exemple, en 2005, une épizootie liée à un virus H5N1 s'est développée au lac Qinghai conduisant à une diffusion du virus dans plus de vingt pays situés en Asie, Europe et Afrique [215–218]. Le tropisme digestif des IAV chez les espèces aviaires implique une voie de transmission oro-fécale *via* les eaux contaminées [219–221]. Les IAV sont de plus relativement stables dans les milieux aqueux, notamment lorsque la température et la salinité de l'eau sont peu élevées. Un IAV peut être détecté durant plus de 200 jours dans un milieu aqueux neutre maintenu à 4°C ou une dizaine de jours dans le cas d'une alternance de phases de gel-dégel [222]. La convergence des oiseaux migrateurs vers ces zones humides en tant que point d'étape peut également induire l'infection de l'avifaune aquatique et, en conséquence, contaminer par la suite les élevages avicoles situés à proximité. Enfin, le delta du

Nil est situé sur la route migratoire de millions d'oiseaux au cours de leur déplacements entre les écozones paléarctique et afrotropicale [223]. Cela en fait une région critique pour la diffusion des IAV. Les virus H5N1 sont endémiques en Égypte et il s'agit d'un des pays présentant le plus grand nombre de contaminations humaines avec des virus H5N1 [224]. La situation géographique particulière du delta du Nil semble ainsi favoriser l'exposition de la population humaine à ces virus.

Zoonoses recensées

La première zoonose liée à un IAV dûment identifiée a été recensé en 1997 à Hong Kong [225,226]. Le virus isolé appartenait à une lignée de souches H5N1 circulant au sein des élevages aviaires et de l'avifaune aquatique [227,228]. Un virus de cette lignée a été isolé chez une oie dans la province du Guangdong, elle est en conséquence nommée Gs/Gd. Contrairement aux lignées précédentes, les virus H5N1 dérivant de la lignée Gs/Gd peuvent induire de la mortalité au sein de l'avifaune, sauvage comme domestique [138,139,229–232], et être transmis à l'Homme. Depuis 1997, des infections humaines par des virus H5N1 surviennent régulièrement. Actuellement, un total de 862 cas a été rapporté avec un taux de mortalité de près de 50% ([OMS](#), période 2003-décembre 2020). Les infections sont principalement recensées en Égypte et en Indonésie. La sévérité des symptômes développés est corrélée positivement à l'ampleur de la réponse inflammatoire développée [233–235]. En ce sens, la forte virulence de ces virus aviaires chez l'Homme a été attribuée à une réponse immunitaire inadaptée. Bien que suggérée dans un nombre restreint de cas, la transmission horizontale n'a pas été démontrée formellement [236–239]. Ainsi pour le moment, l'Homme est un hôte occasionnel, les virus H5N1 ne parvenant pas à se pérenniser au sein de cette population compte tenu de leur transmission peu efficace. Par passages successifs sur furets, une étude a observé l'acquisition de plusieurs résidus critiques au sein des protéines HA et PB2 associés à une capacité de diffusion par aérosols [240]. Ce dernier point est considéré comme beaucoup plus prédictif d'une transmission interhumaine que la contamination par contacts directs [241]. Une acquisition naturelle de ces motifs appuie le risque pandémique associé aux virus H5N1.

En 2013, un virus H7N9 a émergé en Chine et a causé à ce jour le plus grand nombre de cas humains (1536 dont 612 décès selon le rapport de la [FAO du 02/06/2021](#)) [242,243]. Initialement, le virus isolé était faiblement pathogène, puis, en 2016 une forme HPAI a émergé [244]. Seuls 32 cas ont été associés à cette forme HPAI dont 4 décès. Un virus LPAI présentant une telle capacité à infecter l'Homme soulève une réelle problématique en termes de gestion du risque. En effet, contrairement aux virus HPAI qui induisent des signes cliniques sévères et de la mortalité, un foyer infectieux associé à un virus LPAI peut passer inaperçu au sein d'un élevage à moins d'une surveillance active. L'absence de sa détection retarde ou empêche la mise en place d'un protocole permettant de limiter sa propagation à d'autres élevages et de protéger les personnes exposées. De la même façon que pour les virus H5N1, aucune transmission interhumaine n'a été clairement identifiée. L'infection de souris avec des virus

H5N1 et H7N9 a révélé que ces derniers induisaient une réponse inflammatoire moins importante, ce qui pourrait appuyer la mortalité plus faible observée chez l'Homme [245].

Outre les précédents virus évoqués à l'origine d'un nombre de cas relativement important, des infections sporadiques surviennent régulièrement. Notamment, des infections liées à des sous-types H7N2, H7N3, H7N4, H7N7 et H9N2 ont été identifiées (Tableau 2). Les sous-types H7 sont ainsi prépondérants au sein des virus ayant franchi la barrière d'espèce. Un fait intéressant concernant les virus H9N2 est qu'il s'agit d'importants fournisseurs de gènes viraux. Notamment, les virus zoonotiques H5N1 1997 et H7N9 2013 ainsi que la plupart des souches aviaires H5 HPAI circulantes possèdent au moins un segment issu d'un virus H9N2 [243,246–250]. Enfin, en février 2021, la Russie a rapporté l'infection par un virus H5N8 de sept individus travaillant au sein d'une élevage avicole ([OMS](#)). Il s'agit des premiers cas associés à ce sous-type viral. Les individus infectés n'ont pas développé de symptôme particulier et le virus n'a pas été transmis à leurs proches. Cet événement zoonotique peut être relié aux nombreuses épizooties liées à des virus H5N8 sévissant depuis 2015 [251–254]. Le séquençage du virus isolé chez un des hôtes indiquent en effet une proximité importante avec une souche H5N8 isolée à la même période chez des hôtes aviaires dans une région géographique proche ([ECDC](#)).

sous-type	nombre des cas/décès	réf
H5N1	861/455	OMS
H5N6	17/12	[247,255]
H5N8	7/0	OMS
H6N1	1/0	[256]
H7N2	7/0	[257,258]
H7N3	10/0	[259–262]
H7N4	1/0	[263]
H7N7	93/1	[264–266]
H7N9 LPAI	1536/612	FAO
H7N9 HPAI	32/4	FAO , [267]
H9N2	50/0	[268]
H10N3	1/0	OMS
H10N7	4/0	PAHO , [269]
H10N8	4/1	[270]

Tableau 2 : dénombrement des infections zoonotiques liés à des IAV aviaires (au 14/06/2021).

A l'échelle des contacts existant entre l'Homme et les volailles, les cas de transmission d'un IAV aviaire à l'Homme sont relativement rares. Cela est appuyé par une capacité de diffusion des virus au sein de la population humaine très réduite – voire inexistante. Il existe ainsi des freins au franchissement de la barrière d'espèce.

1.2.6 Facteurs de restriction d'hôtes à l'initiation du cycle viral

1.2.6.1 Les récepteurs cellulaires

Le récepteur cellulaire des IAV, l'acide sialique (AS), est associé à une chaîne glucidique par l'intermédiaire d'un galactose (gal). Deux types de liaison reliant l'AS au galactose sont observés : $AS\alpha 2-3gal$ et $AS\alpha 2-6gal$. Les protéines HA des IAV d'origine aviaire et mammifère ont une affinité préférentielle pour les récepteurs de type $\alpha 2-3$ et $\alpha 2-6$ respectivement [191]. La cartographie de ces deux entités chez l'Homme révèle que les récepteurs de type $\alpha 2-6$ sont majoritaires au niveau de l'appareil respiratoire supérieur (nez, pharynx, larynx, trachée, bronches). La proportion de récepteurs $\alpha 2-3$ augmente à partir de la jonction bronchiole/alvéole et ils sont dominants au niveau du tissu pulmonaire [271,272]. La distribution des récepteurs selon le type de cellules (ciliées, non ciliées, caliciformes, cellules Club) est délicate à préciser car très variable selon le modèle utilisé, il n'existe ainsi pas de consensus [271,273–275].

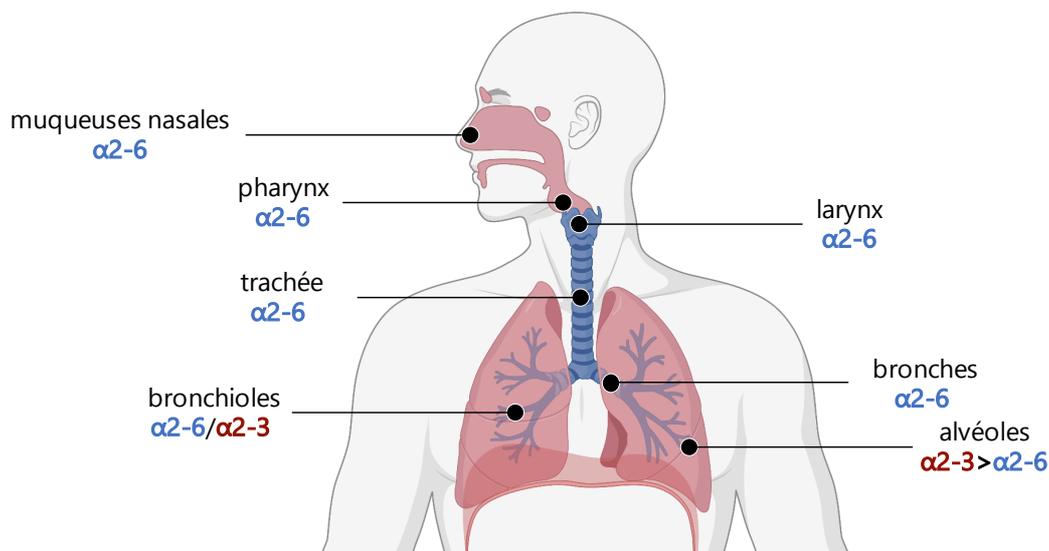


Figure 13 : distribution des types de récepteurs cellulaires des IAV au sein de l'appareil respiratoire humain.

Le schéma présente le(s) type(s) de liaison entre l'acide sialique (AS) et le résidu galactose (gal) de la chaîne glucidique ($\alpha 2-6$ ou $\alpha 2-3$) retrouvé(s) selon la région du tractus respiratoire. Les IAV aviaires et humains ont une affinité préférentielle pour les récepteurs $AS\alpha 2-3gal$ et $AS\alpha 2-6gal$ respectivement. Lorsque les deux types de liaison coexistent, le ratio estimé est indiqué (/ : équivalence, > : supériorité).

La faible affinité de la HA des IAV aviaires pour les récepteurs de type $\alpha 2-6$ constitue un facteur de restriction majeur au franchissement de la barrière d'espèce et justifie la faible efficacité de la transmission interhumaine des virus aviaires. En effet, la zone propice à leur réplication est située anatomiquement loin de leur point d'entrée dans l'organisme. La probabilité que des particules virales atteignent cette zone est ainsi faible compte tenu de l'absence de zones de réplication permissives en amont et des défenses mécaniques de l'hôte situées tout au long du tractus respiratoire qui seront précisées par la suite.

Chez les espèces aviaires, des récepteurs de type α 2-3 sont retrouvés au niveau du tractus digestif, un tropisme intestinal des IAV est ainsi observé chez ces hôtes contrairement aux mammifères [276]. La présence de récepteurs α 2-6 dans le tractus digestif a parfois été observée mais en quantité mineure. Au niveau respiratoire, une différence est observée entre le canard et le poulet. Alors que les récepteurs α 2-6 ne sont pas ou très peu détectés tout au long de l'arbre respiratoire du canard, une quantité non négligeable de ces récepteurs est observée chez le poulet, particulièrement au niveau de la trachée [276,277]. Par ailleurs, il est notable que les récepteurs α 2-6 sont très abondants chez la caille et ce dans tout le tractus respiratoire, dépassant même la concentration en α 2-3 [276,278].

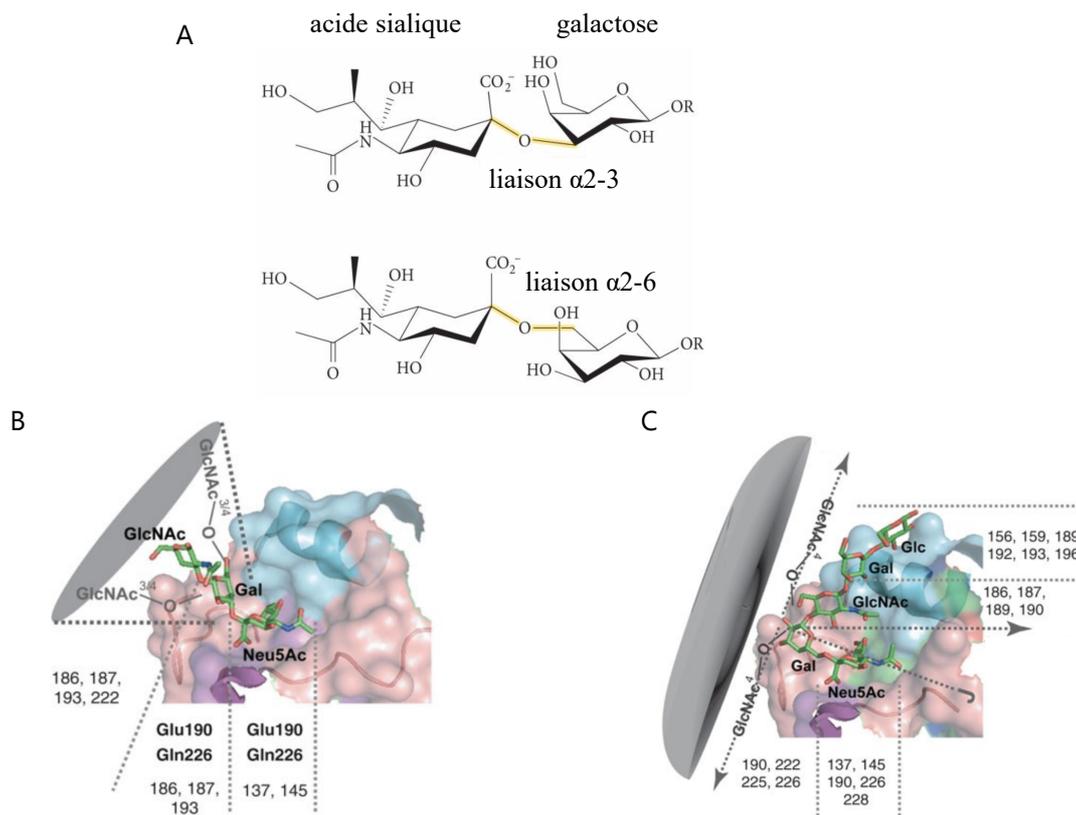


Figure 14 : topologie des acides sialiques.

[A] Association d'un acide sialique à un résidu galactose par liaison α 2-3 ou α 2-6. Conformation « cône » [B] ou « parapluie » [C] de la région de la chaîne glucidique incluant l'acide sialique. Les résidus de la protéine HA impliquée dans l'interaction avec la chaîne glucidique sont indiqués (basé sur la numérotation relative aux HA de type H3). Adapté de [279,280]. Neu5Ac : acide N-acétylneuraminique (acide sialique), Gal : galactose, GlcNAc : N-acétylglucosamine

Un modèle topologique a été proposé afin d'expliquer la différence d'affinité entre les HA aviaires et mammifères. La rigidité de la liaison $AS\alpha$ 2-3gal restreint l'angle adopté par la chaîne glucidique dans cette région, cela impose une organisation dite en cône dans l'environnement de l'acide sialique (Figure 14A et 4B). A l'opposé, la flexibilité qu'autorise la liaison $As\alpha$ 2-6gal permet à la chaîne glucidique d'adopter une conformation beaucoup plus étendue, dite en parapluie [279,281] (Figure 14A et 4C). Les domaines d'interaction des HA aviaires et mammifères sont en conséquence adaptés au type de conformation adopté par le récepteur majoritaire chez leur hôte.

Parmi les épisodes zoonotiques évoqués précédemment, les virus H7N9 HPAI sont à l'origine de plus d'infections humaines et sur un intervalle de temps bien plus court que les virus H5N1. En modèle murin, une réplication efficace d'un virus H7N9 LPAI au niveau de l'épithélium nasal a été observée [245]. Cela est surprenant compte tenu du fait que les récepteurs de type AS α 2-6gal sont majoritaires dans ce tissu murin selon les auteurs. Ce résultat n'est pas observé avec un virus H5N1 HPAI. La présence de la substitution G186V dans HA a été identifiée comme point critique de l'adaptation des virus H7N9 aux récepteurs de type α 2-6 [282]. Il s'agit d'un polymorphisme qui semble spécifique à ces virus car il n'avait pas été identifié comme marqueur associé à une augmentation de l'affinité des IAV pour les récepteurs de type α 2-6 avant l'émergence de ces virus chez l'Homme. Les polymorphismes Q226L et Q228S étaient en effet jusqu'alors considérés comme les principaux marqueurs d'une adaptation des HA aviaires aux récepteurs humains [283,284].

1.2.6.2 Facteurs physiologiques

Les espèces mammifères et aviaires sont homéothermes, cependant la température physiologique diffère entre les deux classes. En effet, alors que la température optimale des mammifères se situe autour de 37°C, la température corporelle des oiseaux est plutôt située entre 39 et 41°C [285]. Les IAV circulants au sein de ces deux sphères sont ainsi sélectionnés selon leur capacité à assurer une réplication virale efficace à la température de leur hôte [286,287]. Cela peut pénaliser la réplication des IAV aviaires dans un tractus respiratoire humain, notamment au niveau des voies respiratoires supérieures où la température est encore plus réduite par rapport à un organisme aviaire (33°C) [288]. La majorité des IAV aviaires possède un résidu acide glutamique à la position 627 de la protéine PB2 tandis qu'un résidu de lysine est retrouvé chez les virus humains. Le polymorphisme E627K a été identifié comme l'un des déterminants de la sensibilité thermique des IAV et d'adaptation à l'hôte mammifère [289].

Comme cela a été évoqué précédemment, l'exposition de la protéine HA à un faible pH induit un changement conformationnel important et irréversible (en page 17). De façon générale, le pH d'activation se situe entre 4,8 et 6,2 [290] mais une légère différence est observée entre les HA aviaires et humaines. Les virus saisonniers humains tendent à avoir un pH d'activation légèrement plus faible que les virus aviaires (5,0-5,4 vs 5,6-5,8) [291]. Bien que ténue, cette différence pourrait constituer une barrière physiologique pour les virus aviaires au sein d'un tractus respiratoire humain. En effet, tandis qu'un virus H5N1 muté afin « d'abaisser » son pH optimal d'activation présente une capacité répliquative réduite chez des espèces aviaires (poulet, canard) par rapport au virus sauvage, l'inverse est observé chez le mammifère [292–294]. Par ailleurs, il est notable que le pH de la muqueuse nasale humaine est plutôt acide, 6,3 en moyenne [295]. Il est ainsi envisageable que ce pH soit suffisant pour induire un changement conformationnel des protéines HA aviaires - contrairement aux protéines humaines - avant l'internalisation de la particule virale. En conséquence, cela inhiberait la capacité d'infection des IAV aviaires chez le mammifère [296].

1.3 La réponse immunitaire innée face à l'infection

La première défense de l'organisme consiste à éviter que l'agent pathogène puisse pénétrer au sein de ses cellules hôtes. L'épithélium des voies de conduction respiratoires est tapissé de mucus qui est un milieu biphasique composé d'une phase mobile dite liquide au contact des cellules épithéliales et d'une phase gel superficielle. La viscosité est ainsi croissante en direction de la lumière des voies de conduction. Physiologiquement, l'Homme produit quotidiennement entre 10 et 50 ml de sécrétions au niveau du tractus respiratoire [297]. Le mucus est produit par les cellules caliciformes et les glandes sous-mucosales. Il est composé majoritairement d'eau (90-95%), la part restante contenant des ions, des lipides et des protéines [298]. Ces dernières sont des glycoprotéines nommées mucines qui assurent les propriétés rhéologiques viscoélastiques du mucus. Les mucines sont présentes sous forme monomérique dans la phase liquide et s'organisent en un dense réseau multimérique associé par des ponts disulfure dans la phase gel [299]. Les agents pathogènes sont piégés dans cette dernière tandis que la phase liquide assure la mobilité des cils portés par certaines cellules épithéliales. Des vagues de battements ciliaires synchronisées permettent d'entraîner mécaniquement le mucus vers l'oropharynx pour élimination.

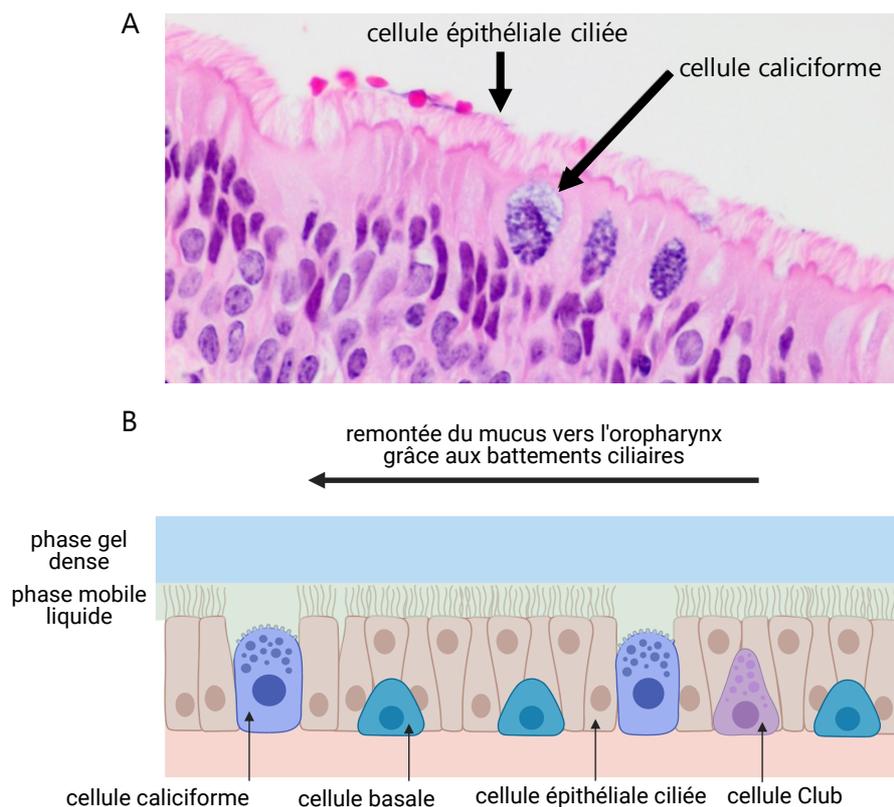


Figure 15 : protection de l'épithélium respiratoire par le mucus.

[A] Coupe histologique d'un épithélium trachéal canin, adapté de [300]. [B] Clairance mucociliaire au sein de l'épithélium respiratoire grâce à l'organisation biphasique du mucus.

Le mucus n'est pas retrouvé au niveau de l'épithélium pulmonaire mais les alvéoles sont recouvertes d'une substance essentiellement produite par les pneumocytes de type II, le surfactant [301]. Outre son rôle tensioactif assurant la compliance pulmonaire, le surfactant

contient également des protéines impliquées dans la défense de l'hôte. En effet, les protéines du surfactant A et D (SP-A et D) opsonisent les agents pathogènes, facilitant leur phagocytose par les cellules du système immunitaire [302]. Face aux virus parvenant à outrepasser le système de clairance mucociliaire et à accéder à l'épithélium, les cellules disposent en conséquence d'un arsenal de senseurs afin d'identifier la présence de l'agent pathogène et d'initier une réponse immune. Les IAV infectent en priorité les cellules épithéliales qui servent de support à la réplication virale et donc à la production de nouvelles particules infectieuses. Par ailleurs, les macrophages alvéolaires peuvent également être infectés et participer à la mise en alerte de l'organisme en plus de leur fonction de phagocytose [303–305]. Nous nous concentrerons ainsi sur ces deux types cellulaires afin d'exposer le développement de la réponse immunitaire innée face à l'infection.

1.3.1 Identification du danger par les senseurs cellulaires

1.3.1.1 Les TLR

Les récepteurs de type Toll (TLR) sont des protéines transmembranaires pouvant être localisées à la surface cellulaire (TLR1, 2, 4, 5 et 6) ou être intracellulaires (TLR3, 7, 8 et 9) [306]. Les différentes positions des TLR permettent en conséquence une surveillance à la fois du milieu extra et intracellulaire. En effet, les TLR exprimées à la surface cellulaire sont exposées à des composés exogènes et reconnaissent des motifs microbiens peptidiques ou lipidiques. Au contraire, les TLR intracellulaires sont retrouvés au niveau des endosomes et reconnaissent du matériel génétique étranger à la cellule. Les endosomes n'abritent généralement pas d'acides nucléiques de l'hôte ce qui évite une activation non adaptée. Les TLR intracellulaires seraient initialement localisés au niveau du réticulum endoplasmique puis dirigés par la voie sécrétoire vers les endosomes selon un signal d'activation encore mal caractérisé [307,308]. Les principaux TLR impliqués dans la reconnaissance du génome des IAV sont TLR3 et TLR7. Tous deux reconnaissent les ARN, bicaténaires dans le cas de TLR3 et monocaténaires dans le cas de TLR7 [307–310]. TLR3 et TLR7 sont exprimés par les cellules épithéliales mais dans une faible proportion dans le cas de TLR7 qui est retrouvé de façon bien plus conséquente au niveau des cellules immunitaires, notamment les cellules dendritiques plasmacytoïdes [309,311–313]. Les mécanismes de signalisation sont schématiquement résumés en [Figure 16](#) et décrits dans les paragraphes suivants.

Après activation de TLR7, la cascade de transduction est initiée par la protéine adaptatrice MyD88 qui interagit avec IRAK4. Cette dernière phosphoryle IRAK1 et IRAK2 [314], ce qui a pour conséquence le recrutement et l'activation de l'ubiquitine ligase TRAF6. Cette dernière active TAK1 qui à son tour phosphoryle le complexe IKK composé des protéines NEMO, IKK α et IKK β . Ce dernier est alors en mesure d'activer les facteurs de transcription de la famille NF- κ B, amplement décrits pour leur rôle dans l'expression de gènes liés à la réponse inflammatoire [315–317]. Cette famille inclut cinq membres associés sous forme d'homo ou hétérodimères (NF- κ B1, NF- κ B2, RelA, RelB et c-Rel) [318]. Par la suite, le terme NF- κ B

désignera un dimère fonctionnel de la famille NF- κ B. En condition basale, NF- κ B est séquestré dans le cytoplasme compte tenu de son interaction avec I κ B. Le complexe IKK phosphoryle I κ B ce qui provoque sa dégradation. En conséquence, NF- κ B est en mesure de migrer au noyau et d'y exercer ses fonctions. La voie TLR7 conduit également à la synthèse d'interférons de type I (IFN-I) *via* le facteur de transcription IRF7. En effet, l'activation de IRAK4 conduit en parallèle à la constitution d'un complexe incluant notamment IRAK1, IKK α et IRF7. IRAK1 et IKK α activent IRF7 par sa phosphorylation permettant sa dimérisation et ainsi son interaction avec l'ADN, ce qui se traduit par une synthèse abondante d'IFN-I [319,320]. Un orthologue fonctionnel de TLR7 existe chez le poulet. Le gène codant cette protéine est surexprimée suite à une infection avec un IAV et une stimulation par des agonistes de TLR7 se traduit par la production d'interférons [321]. Cette cascade de signalisation est résumée en Figure 16 ainsi que celle liée au senseur TLR3 présentée ci-après.

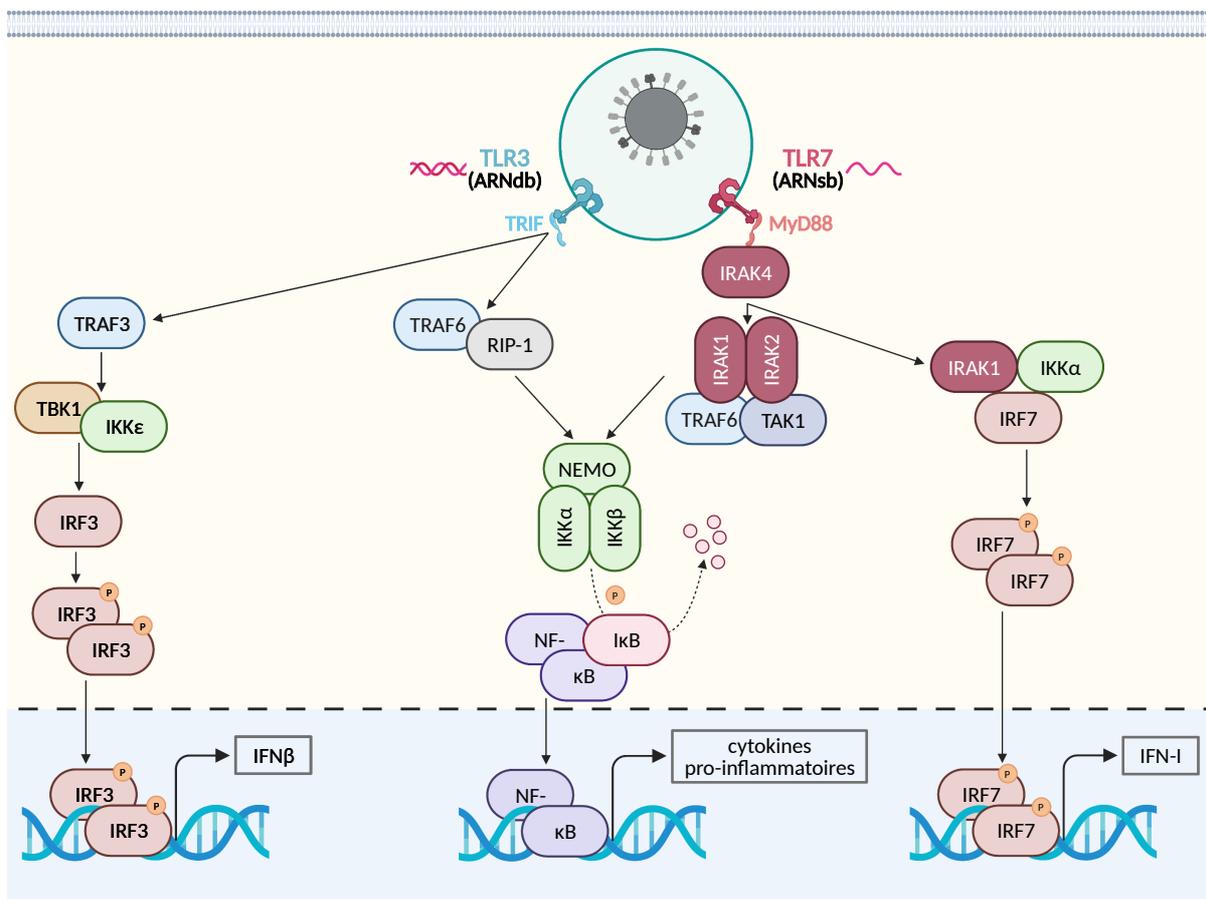


Figure 16 : voies de signalisation liées aux senseurs cellulaires TLR3 et TLR7.

Les flèches indiquent un phénomène d'activation (activité protéique ou synthèse de protéines). P : protéine phosphorylée. Dans le cas de la protéine I κ B, la flèche en pointillés matérialise la phosphorylation conduisant à sa dégradation. Des protéines accolées représentent un complexe protéique.

La cascade signalisation de TLR3 est basée sur une autre protéine adaptatrice, TRIF [322]. Cette dernière recrute TRAF3 ainsi que TRAF6 ce qui se solde par une activation à la fois de la réponse inflammatoire *via* NF- κ B et de la synthèse d'IFN *via* IRF3. En effet, le complexe formé par TRAF3, TBK1 et IKK ϵ permet l'activation par phosphorylation d'IRF3 et, en conséquence,

une production d'IFN β [320]. L'activation de TRIF se traduit également par la formation d'un complexe intégrant TRAF6 et RIP-1. Tout comme avec l'association TRAF6/TAK1 dans le cas de la cascade associée à TLR7, la combinaison de TRAF6 avec RIP-1 permet la phosphorylation du complexe IKK et donc l'activation des facteurs de transcription de la famille NF- κ B. Chez l'Homme, TLR3 est surexprimé suite à une infection avec un IAV et contribue nettement à la réponse inflammatoire développée [323]. Étonnamment, l'absence d'expression de TLR3 chez la souris n'est pas désavantageuse lors d'un challenge viral avec un virus H3N2 mais favorise la survie des animaux [324]. La réponse inflammatoire induite par TLR3 dans ce modèle est ainsi probablement excessive et délétère comme cela est observé chez l'Homme avec des virus H5N1 [233,234,325]. Chez le poulet, une surexpression de TLR3 est observée suite à la stimulation avec des ARN bicaténaires synthétiques ainsi que par l'infection avec un virus H5N1. Une synthèse d'IFN β est également notée suite à l'activation de la voie TLR3. Ainsi, TLR3 est fonctionnel chez le poulet [326,327].

1.3.1.2 Les RLR

En plus d'une surveillance de la voie endosomale, le système immunitaire dispose également de senseurs cytosoliques, notamment les récepteurs de type RIG-I (RLR). Cette famille comprend trois membres : RIG-I, MDA5 et LGP2. Tous les RLR présentent un domaine hélicase central portant un motif DExD-H ainsi qu'un domaine régulateur en région C-terminale. RIG-I et MDA5 possèdent en plus deux domaines de recrutement des caspases (CARD) grâce auxquels ils sont capables d'initier une signalisation en aval. LGP2, ne pouvant exercer cette activité compte tenu de l'absence de domaine CARD, serait plutôt impliqué dans la régulation de l'activité de RIG-I et MDA5 [328–330].

La Figure 17 schématise les différentes conformations adoptées par les protéines RIG-I et MDA5. A l'état basal, RIG-I est présent sous une forme auto-inhibée appelée conformation fermée pour laquelle les domaines CARD sont stériquement inaptes à induire un signal [331]. RIG-I reconnaît préférentiellement les ARN plutôt courts (<300 bp) présentant une extrémité 5' tri ou bi-phosphate, l'absence de coiffe distinguant les ARNv des ARNm cellulaires [332,333]. RIG-I peut interagir à la fois avec des ARN mono et bicaténaires, cependant dans le premier cas une structure secondaire telle que celle en poêle à frire adoptée par les ARNv des IAV semble nécessaire à l'activation [334,335]. La région C-terminale de RIG-I est à l'origine de la reconnaissance des ARN qui interagissent par la suite avec le domaine hélicase. Cela induit un changement conformationnel démasquant les domaines CARD de RIG-I et donc conduisant à son activation. MDA5 est associé à la reconnaissance des ARN bicaténaires plutôt longs (ordre de grandeur ~plusieurs kb) [336,337]. La structure de MDA5 à l'état basal serait plus dynamique que celle de RIG-I (aller-retour entre conformation fermée et ouverte), l'interaction avec l'ARN favoriserait la forme ouverte correspondant à celle active [338].

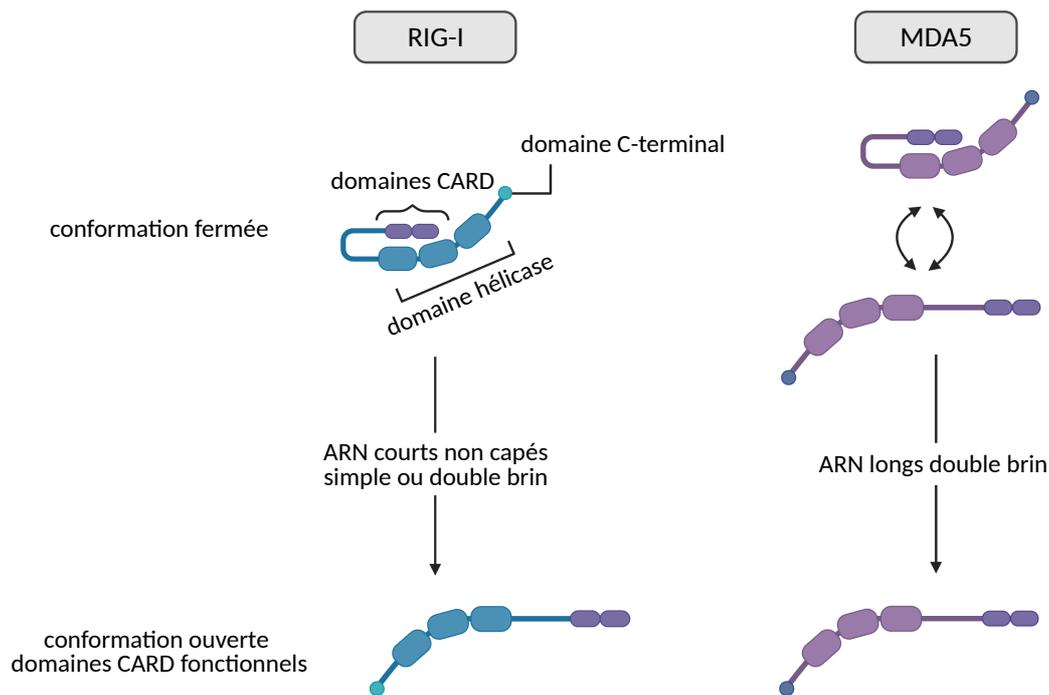


Figure 17 : modèles d'activation de RIG-I et MDA5.

Les conformations de RIG-I et MDA5 sont représentées à l'état basal et après activation suite à une liaison avec leur ligand. Dans le cas de MDA5, il existerait une alternance entre les deux conformations en amont de toute interaction.

Suite à leur activation, les senseurs RIG-I et MDA5 migrent à la membrane mitochondriale afin d'interagir avec la protéine MAVS. Plusieurs acteurs sont impliqués dans cette translocation, notamment TRIM25 et 14-3-3 ϵ pour RIG-I et 14-3-3 η pour MDA5 [339–341]. Les RLR interagissent avec MAVS sous forme dimérisée, la structure hélicoïdale tétramérique formée par l'association de leurs domaines CARD permet le recrutement de monomères de MAVS qui possèdent également un domaine CARD. Cela conduit à une oligomérisation de MAVS qui est active sous cette forme agrégée et peut en conséquence recruter les protéines TRAF3 et TRAF6 [342]. A l'instar de la signalisation liée aux TLR, une synthèse d'IFN-I ainsi que l'activation du facteur de transcription pro-inflammatoire NF- κ B est observée en conséquence. Ces cascades de signalisation sont schématisées en Figure 18.

Chez l'Homme, une contribution majeure de RIG-I dans la synthèse d'IFN-I suite à l'infection avec un IAV a été identifiée et, par extension, RIG-I a été proposé comme le principal RLR détectant du génome des IAV [343]. Cependant, une étude a observé que la capacité d'un virus à contrecarrer MDA5 constituait un avantage répliatif [344]. En ce sens, MDA5 semble jouer un rôle complémentaire à RIG-I au cours du cycle viral. La protéine NS1 est largement décrite pour sa capacité à inhiber l'activation de RIG-I, limitant ainsi l'initiation d'une réponse antivirale.

De façon intéressante, alors que RIG-I est ubiquitaire chez l'Homme, son expression est cantonnée à certains tissus chez le canard (trachée, tissu digestif) et n'a pas été détectée chez le poulet [345,346]. L'absence de RIG-I pourrait justifier la sensibilité accrue des poulets aux IAV par rapport aux canards. En revanche, les poulets possèdent une protéine MDA5 fonctionnelle qui participe ainsi à la surveillance cytosolique. Contrairement à la protéine

humaine, la MDA5 du poulet semble présenter une affinité préférentielle pour les ARN double brin courts [347]. Cela pourrait suggérer une adaptation des fonctions de MDA5 compte tenu de l'absence de RIG-I.

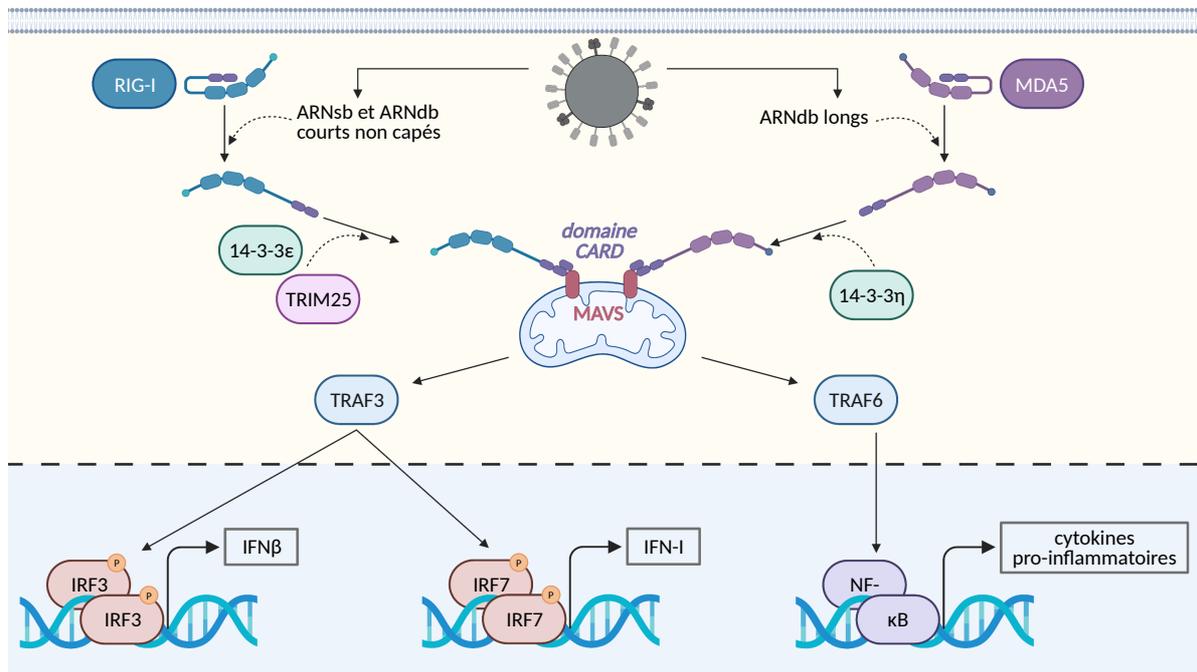


Figure 18 : voies de signalisation liées aux senseurs cellulaires de la famille des RLR.

Les flèches indiquent un phénomène d'activation (activité protéique ou synthèse de protéines). P : protéine phosphorylée. Des protéines accolées représentent un complexe protéique. Dans le cas des protéines 14-3-3ε, 14-3-3η et TRIM25, les flèches en pointillés symbolisent leur implication dans la translocation de RIG-I et MDA5 vers la membrane mitochondriale.

1.3.1.3 L'inflammasome NLRP3

En sus des senseurs cellulaires de type RLR, la surveillance du cytosol est également assurée par les récepteurs de type NOD (NLR, nucleotide oligomerization domain receptor) et de type AIM2 (ALR). Ces récepteurs peuvent s'assembler au sein d'un complexe macromoléculaire nommé inflammasome suite à un processus d'oligomérisation. Un inflammasome est ainsi composé d'un senseur (NLR ou ALR), d'une caspase (1 ou 8) et le plus souvent de la protéine adaptatrice ASC [348,349]. L'association de ces différents partenaires se fait *via* des interactions entre domaines homotypiques. La stimulation d'un inflammasome se traduit par l'activation de la caspase qui en conséquence assure la maturation de cytokines pro-inflammatoires (caspase 1) ou initie un signal apoptotique (caspase 8). Dans le cas de la caspase 1, cette enzyme active par protéolyse les précurseurs de l'IL1β et de l'IL18 qui sont des médiateurs importants de la réponse inflammatoire [348,350,351]. Parmi les inflammasomes identifiés, celui basé sur le senseur NLRP3 associé à la protéine ASC et la caspase 1 est le plus étudié et en conséquence le mieux caractérisé. Une interaction entre NLRP3 et la sérine/thréonine kinase NEK7 est également nécessaire au processus d'oligomérisation [352].

Certaines études ont observé l'expression de NLRP3 ainsi que sa fonctionnalité au sein de cellules épithéliales de l'appareil respiratoire [353,354], cependant la grande majorité des

travaux ayant apporté des éléments de caractérisation relatifs à l'activation de cet inflammasome se sont appuyés sur des modèles basés sur des cellules immunitaires - particulièrement les macrophages. Ainsi, il semblerait que la contribution de ce complexe au développement d'une réponse cellulaire prenne toute son ampleur dans ce type de cellules. La présence de molécules constituant un signal d'activation de NLRP3 - présentées dans le paragraphe suivant - ne serait pas toujours suffisante. Une phase « d'amorçage » de NLRP3, suite à une exposition au facteur de transcription NF- κ B ou à la cytokine pro-inflammatoire TNF α par exemple, serait parfois nécessaire afin que NLRP3 soit sensible aux différents signaux [355,356].

L'activation de NLRP3 est le plus souvent associée à des facteurs de stress cytosoliques. NLRP3 est particulièrement sensible à une perturbation de l'homéostasie ionique, telle qu'une chute de la concentration intracellulaire en K⁺ [357,358]. Les mécanismes exacts justifiant cette association ne sont pas totalement élucidés, cependant il a été identifié que l'interaction NEK7/NLRP3 requiert un efflux de K⁺ [352,359]. Une activation de NLRP3 a également été observée suite à une hausse de la concentration en Ca²⁺ [360,361] et une chute de celle en Cl⁻ [362,363]. Cependant, de la même façon que pour K⁺, il n'existe pas de mécanisme explicitant cette association. Sans être exhaustif, NLRP3 est également sensible aux divers signaux reflétant un dysfonctionnement mitochondrial, tels que la présence cytosolique d'ADN mitochondrial [364,365] ou une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) [366,367]. Enfin, une interaction entre les fibres amyloïdes A β et NLRP3 a été identifiée [368]. Cet inflammasome est ainsi capable de reconnaître certains assemblages protéiques en tant que facteur d'activation. La Figure 19 présente un schéma résumant les différents signaux à l'origine de l'activation de NLRP3.

Une activation de NLRP3 par les IAV a été observée à la fois en cellules épithéliales [353] et macrophages [364]. La protéine M2 contribue à ce phénomène, une acidification de l'appareil de Golgi induite par ce canal ionique a été proposée comme modèle d'action [369]. La protéine PB1-F2 constitue également un facteur d'activation de NLRP3, ce point sera développé ultérieurement.

La distribution de l'expression de NLRP3 diffère entre le canard et le poulet. Chez ce dernier, NLRP3 est ubiquitaire mais une expression plus importante est observée au niveau de la trachée et des poumons [370]. Chez le canard, à l'inverse, NLRP3 est peu retrouvé dans ces tissus, le principal organe d'expression étant le pancréas [371]. En considérant la différence de sensibilité entre les poulets et les canards aux IAV, cela pourrait argumenter une réponse inflammatoire pulmonaire excessive chez le poulet qui ne serait en conséquence plus utile pour l'hôte mais délétère. Cependant, à notre connaissance, il n'existe pas d'étude caractérisant la fonction de NLRP3 lors d'une infection avec un IAV chez ces espèces.

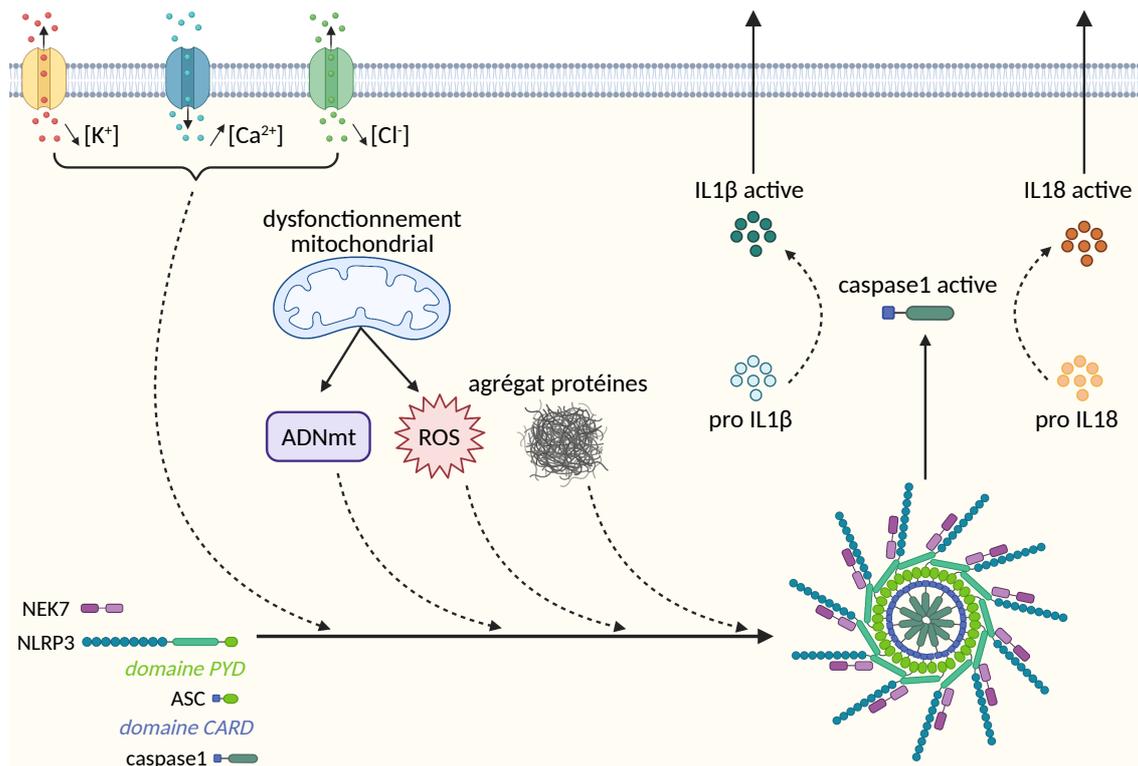


Figure 19 : voies d'activation de l'inflammasome NLRP3.

Des déséquilibre ioniques, la présence d'ADN mitochondrial (ADNmt), de ROS ou d'agrégats protéiques dans le cytoplasme constituent des signaux d'oligomérisation de NLRP3. Cette activation se traduit par la maturation par la caspase1 active de deux cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire, l'IL18 et l'IL1 β .

1.3.2 Les effecteurs de la réponse immunitaire innée

1.3.2.1 Les interférons

Les cellules infectées par des virus produisent des interférons, cytokines qui induisent des mécanismes antiviraux au sein des cellules environnantes. Les cellules épithéliales produisent deux types d'interférons : les interférons de type I (IFN-I) et ceux de type III (IFN-III). Chez l'Homme, cinq sous-types ont été recensés au sein de la première classe (IFN α , β , ϵ , κ , ω) [372]. Les IFN α et β sont ubiquitaires et ainsi les plus caractérisés. Trois paralogues d'IFN-III (IFN λ 1, 2, 3) ont été identifiés [373,374]. Des études suggèrent que les cellules épithéliales sont les plus importantes productrices d'IFN-III tandis que les cellules dendritiques et les macrophages sont la source principale d'IFN-I [375,376]. Chez les espèces aviaires, seuls les IFN α et β sont retrouvés au sein des IFN-I [377] et un seul IFN-III a été identifié [378,379], présentant une similarité en acides aminés plus importante pour l'IFN λ 2 humain [378].

Les IFN-I possèdent un rôle majeur dans la réponse antivirale de l'hôte. Des souris transgéniques incapables d'initier cette signalisation présentent une sensibilité exacerbée par rapport à la lignée sauvage [380]. Les IFN-I sont surexprimés extrêmement rapidement suite à l'infection, notamment en modèles *in vitro*, une induction de l'expression de l'IFN β peut être détectée dès une heure post-infection [381,382]. En cellules humaines et de poulet, les IFN-III

présentent des fonctions antivirales similaires à celles observées avec les IFN-I [374,378,383]. De plus, l'activité des IFN-III semble réduite par rapport à ceux de type I [378,384]. Cependant, chez la souris, une production des IFN-III un peu en amont des IFN-I – un jour post-infection *vs* trois - et en plus grande quantité a été observée suite à une infection avec la souche PR8 (H1N1) [385]. Ce résultat est d'autant plus net que la dose d'infection est faible. En conséquence, les IFN-III constitueraient l'un des premiers mécanismes de la défense antivirale face à une infection grippale. Les IFN-III limitent la progression de l'infection notamment *via* le recrutement de neutrophiles. Bien que ces cellules contribuent à la réponse inflammatoire, leur infiltration suite à l'action des IFN-III n'est pas associée à l'initiation d'une réponse inflammatoire. Au contraire, la suppression de la fonctionnalité du récepteur des IFN-III induit une inflammation plus importante. En ce sens, les auteurs proposent un modèle où les IFN-III joueraient un rôle essentiel dans la balance de la réponse de l'hôte afin d'éviter une inflammation excessive qui pourrait s'avérer délétère pour l'hôte. L'action des IFN-III serait concentrée sur les temps précoces de l'infection, puis si cela ne suffit pas à limiter l'infection, les voies de signalisation liées aux IFN-I prendraient le relais.

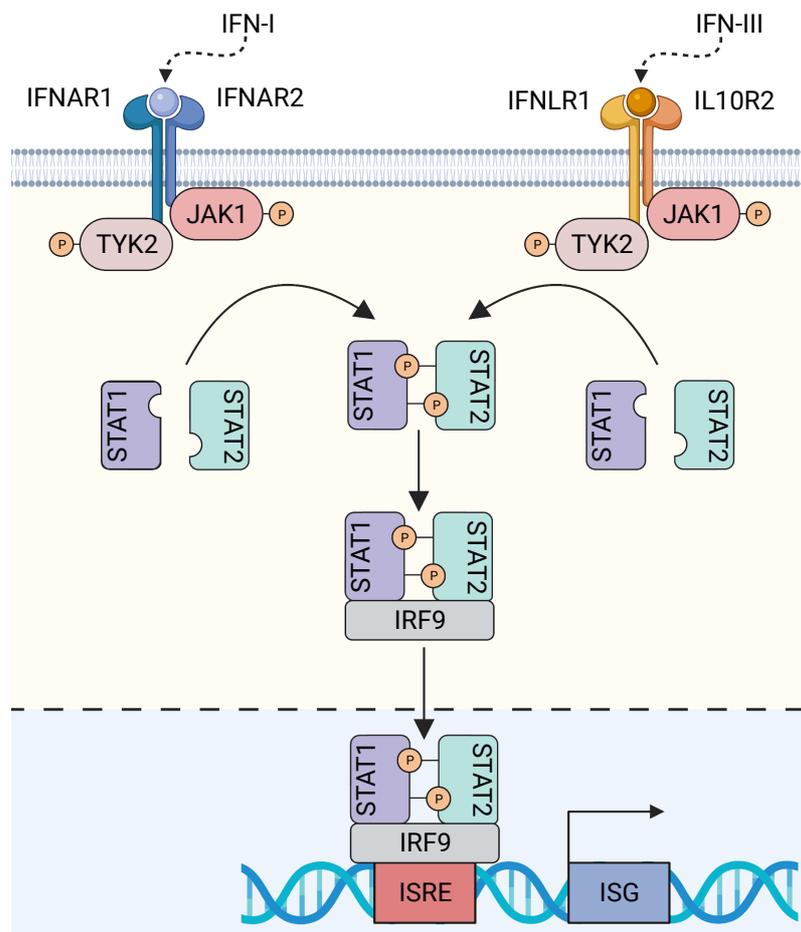


Figure 20 : voie de signalisation des IFN-I et III.

Les flèches indiquent un phénomène d'activation (activité protéique ou synthèse de protéines). P : protéine phosphorylée. Des protéines accolées représentent un complexe protéique. ISRE : Interferon stimulated response element, région de promoteurs impliquée dans la régulation de l'expression des gènes dont l'expression est modulée par les IFN (ISG, interferon stimulated gene). Le complexe STAT1-STAT2-IRF9 interagit avec le domaine ISRE.

La Figure 20 détaille le modèle d'action des IFN-I et III. Les récepteurs cellulaires des IFN-I sont des hétérodimères composés des sous-unités IFNAR1 et IFNAR2 dans le cas des IFN-I et IFNLR1 et IL10R2 pour les IFN-III. La quantification de l'expression de IFNLR1 indique que les cellules épithéliales seraient les principales cibles de ces IFN [386]. L'interaction entre les IFN et leur récepteur induit une dimérisation des sous-unités cytoplasmiques des récepteurs. Ce changement conformationnel se traduit par l'activation de kinases associées aux sous-unités, JAK et TYK2. L'activation de ces protéines va en conséquence phosphoryler les protéines STAT ce qui va entraîner leur dimérisation. Le dimère formé par les protéines STAT1 et STAT2 s'associe à IRF9 et l'ensemble est transloqué au noyau où il va interagir avec des séquences de l'ADN nommées ISRE (interferon-stimulated response element) situées au sein des promoteurs de la plupart des gènes répondant aux IFN (élément ISRE).

Selon la base de données Interferome, les IFN-I et III réguleraient l'expression de respectivement 7350 et 184 gènes chez l'Homme [387]. Une étude s'est attachée à comparer les interféromes de dix espèces (mammifères, aviaires), dont l'Homme et le poulet. Le modèle développé s'est appuyé sur des fibroblastes dermiques stimulés à l'IFN α . Les auteurs ont observé une surexpression de seulement 62 ISG (interferon-stimulated gene) communs à toutes les espèces [388]. Les fonctions liées à ce groupe de gènes sont majoritairement associées au processus de la présentation d'antigènes et, étonnamment, relativement peu aux voies de signalisation correspondant aux différents senseurs cellulaires. Ces ISG représenteraient ainsi un groupe de gènes ancestraux critiques dans la réponse antivirale. En réponse aux IAV, les principaux ISG dont l'expression est induite sont ceux codant les protéines de la famille Mx (myxovirus resistance), IFITM (interferon induced transmembrane protein) ainsi que la protéine kinase R (PKR) et une phosphotransférase permettant la synthèse du 2',5'-oligoadénylate (OAS).

La première protéine de la famille Mx a été identifiée chez la souris car son expression a été associée à une sensibilité moindre d'une lignée murine sauvage - non sélectionnée pour usage expérimental - aux IAV [389,390]. Les animaux des lignées consanguines contemporaines ont perdu la fonctionnalité de cette protéine [390]. Les protéines Mx interagissent avec la protéine NP des IAV, à la fois sous forme monomérique et associée aux ARNv. Ainsi, Mx bloque le déroulement du cycle viral lors de l'import nucléaire des RNPv puis de l'import de la NP synthétisée *de novo*. En cellules humaines, les virus aviaires sont plus sensibles à l'action de Mx que ceux d'origine mammifère, ainsi ces protéines contribuent aux facteurs de restriction d'hôtes limitant le franchissement de la barrière d'espèce [391]. La protéine Mx aviaire est très polymorphe [392], son activité antivirale est ainsi variable selon l'espèce considérée. Chez le poulet, Mx est peu efficace [393], cette protéine ne constitue ainsi pas un facteur antiviral majeur comme cela est observé chez le mammifère [394–396].

Au sein de la famille des IFITM, IFITM3 est le membre le plus caractérisé dans le cadre de la réponse antivirale développée face aux IAV. Deux polymorphismes nucléotidiques (SNP) de cette protéine sont à l'origine de l'expression d'isoformes non fonctionnelles. Or, la présence de ces SNP (rs12252 et rs34481144) a été associée à une sensibilité accrue des individus au virus H1N1 pandémique de 2009 [397–399]. Localisée au niveau des endosomes, IFITM3 inhibe

la libération des RNPv dans le cytosol au stade d'hémifusion entre les membranes virale et endosomale [400,401]. La protéine IFITM3 est fonctionnelle chez le canard et le poulet. Suite à une infection avec un IAV, elle est cependant bien plus surexprimée chez le canard [402]. Cela pourrait ainsi constituer un argument supplémentaire appuyant la sensibilité accrue des gallinacés.

La PKR est une sérine/thréonine kinase dont l'activation est induite par divers signaux de stress ou de danger tels que les ARN bicaténaires [403]. La forme active de la PKR inhibe la synthèse des protéines virales en phosphorylant le facteur d'initiation de la traduction eIF-2 α . A l'instar de RIG-I, l'activité de la PKR est inhibée par la protéine NS1. Plusieurs modèles ont été proposés dont i) une séquestration des ARN bicaténaires par NS1 [404] et ii) une interaction compétitive de NS1 avec la PKR empêchant son association avec les ARN bicaténaires [405].

Enfin, l'enzyme OAS synthétise des 2',5'-oligoadénylates qui constituent des facteurs d'activation de la ribonucléase L (RNase L). Cette dernière va en conséquence détruire à la fois certains ARN cellulaires et les ARN viraux. La RNase L limite ainsi le matériel génétique viral disponible pour amplification et produit également du matériel détectable par les senseurs cellulaires RIG-I et MDA5 [406].

1.3.2.2 Autres cytokines pro-inflammatoires

Les cytokines majeures impliquées dans la réponse inflammatoire sont les interleukines 1 et 6 (IL1, IL6) ainsi que le facteur de nécrose tumorale α (TNF α).

Dans la voie classique d'activation de l'IL6, le récepteur est un hétéro-hexamère transmembranaire composé de deux sous-unités α (IL6R) et deux sous-unités β (la glycoprotéine 130, gp130) [407]. L'IL6 reconnaît la sous-unité α ce qui entraîne l'activation de la protéine gp130. Tandis que l'expression de gp130 est ubiquitaire, l'IL6R n'est retrouvé qu'au niveau de la membrane de certaines cellules telles que les macrophages, les neutrophiles et les hépatocytes. Ainsi, la voie classique ne concerne que ces types cellulaires. L'IL6R existe également sous forme soluble, sa liaison avec l'IL6 constitue la voie dite de trans-signalisation [408]. Le complexe IL6/IL6R interagit ensuite avec la protéine gp130 transmembranaire. L'activation de gp130 se traduit par un recrutement de kinases de la famille Janus (JAK). Ces tyrosines kinases s'auto-phosphorylent puis activent le facteur de transcription STAT3. La phosphorylation de STAT3 permet sa dimérisation et son interaction avec l'ADN. STAT3 régule l'expression d'un grand nombre de gènes dont la diversité explique la pléiotropie de l'IL6. L'activation de la voie classique est associée à une action anti-inflammatoire qui favoriserait le renouvellement cellulaire. La voie de trans-signalisation est associée à des inflammations chroniques et favoriserait le recrutement de monocytes [409]. En modèle murin, l'invalidation de l'expression de l'IL6 est associée à une plus grande sensibilité des animaux à la souche WSN [410].

La famille des IL1 comprend onze membres [411], dont l'IL1 β et l'IL18 activées par l'inflammasome NLRP3. Les récepteurs de ces interleukines sont des composés des sous-unités IL1R1 et IL1R3 pour l'IL1 β et IL1R7/L1R5 ou IL1R8/ILR5 pour l'IL18 [412]. La dimérisation induite

par la fixation de leur ligand permet le recrutement de la protéine adaptatrice MyD88. La signalisation est ainsi commune à la voie des TLR et conduit à l'activation de facteurs de transcription clefs de la réponse inflammatoire tels que NF- κ B [413].

A l'instar de l'IL6, TNF α est une cytokine pléiotropique dont les fonctions divergentes proviennent de la liaison et de l'activation de deux types de récepteurs, TNFR1 et TNFR2. Un modèle de signalisation suggère que TNFR1 favoriserait principalement l'inflammation et la mort cellulaire tandis que TNFR2 aurait un rôle homéostatique et favoriserait plutôt la survie cellulaire [414]. Cela est appuyé par le fait que, contrairement à TNFR2, TNFR1 possède un domaine de mort (DD) [415] lui permettant de recruter des protéines portant également ce domaine. Les fonctions de ces protéines ont notamment été associées à l'induction de la mort cellulaire et à l'activation de NF- κ B [416,417].

1.3.2.3 Les chimiokines

Les cytokines chimio-attractantes, ou chimiokines, exercent d'importantes fonctions de communication intercellulaire. Les chimiokines régulent de nombreux processus biologiques tels que la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'angiogenèse, le développement des organes lymphoïdes ou encore l'hématopoïèse, mais leur rôle principal est d'activer et de contrôler la migration des leucocytes [418–421]. Elles participent à la fois au maintien de l'homéostasie leucocytaire en condition basale ainsi qu'au recrutement de cellules immunitaires compétentes lors d'une infection. De faible poids moléculaire (entre 8 et 15 kDa), les chimiokines représentent la plus grande famille de cytokines, une cinquantaine de membres est recensée chez l'Homme et la souris. Elles sont classées dans quatre groupes selon la position séquentielle de résidus cystéines conservés situés dans la région N-terminale : C, CC, CX3C et CXC [422]. Le groupe C ne possède qu'une seule cystéine, tandis que pour les trois autres groupes, deux cystéines espacées de respectivement 1, 3 ou un nombre variable d'acides aminés sont présentes. Ces quatre catégories sont également retrouvées chez le poulet [379]. Les récepteurs des chimiokines appartiennent à la catégorie des récepteurs couplés à la protéine G, d'où une signalisation de transduction basée sur l'AMPc en tant que messenger secondaire. La spécificité du couple récepteur/chimiokine n'est pas nécessairement stricte, certains récepteurs interagissent avec plusieurs chimiokines tels que le récepteur CXCR2 qui est capable de se lier à la plupart des ligands de types CXC [422]. L'interaction entre une chimiokine et son récepteur se traduit par une restructuration de la morphologie cellulaire due à la polymérisation des filaments d'actine et au développement de lamellipodes, ce qui favorise la mobilité des leucocytes [423]. De plus, l'expression d'intégrines de surface est également observée afin de permettre une interaction entre ces derniers et les molécules d'adhérence cellulaire CAM (cellular attachment molecule) de l'endothélium et ainsi de retenir les leucocytes au niveau du site inflammatoire qu'ils rejoignent par migration transendothéliale [424].

Les neutrophiles et les macrophages jouent un rôle essentiel dans la lutte contre l'infection grippale. Les neutrophiles représentent une part très importante des leucocytes

circulants, 50 à 70% chez l'Homme [425]. Ils possèdent une courte durée de demi-vie - environ huit heures chez l'Homme [426] - ils sont ainsi renouvelés quotidiennement avec jusqu'à 2.10^{11} cellules produites en vingt-quatre heures [427]. Le processus de production est sous le contrôle du facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF) [428]. Les neutrophiles peuvent éliminer les agents pathogènes par phagocytose ou par nétose, processus qui correspond au piégeage de l'agent pathogène par des fibres composées d'ADN et de protéines afin de limiter sa propagation et faciliter sa phagocytose [427,429]. Tandis que les macrophages résidents ont une origine embryonnaire et présentent une importante longévité ainsi qu'un faible taux d'auto-renouvellement [430], les macrophages recrutés par les chimiokines sont des dérivés de monocytes [431,432]. Les macrophages sont des phagocytes [433] mais ils participent également au développement d'une réponse adaptative car ils peuvent agir comme cellules présentatrices d'antigènes [434]. En plus de leurs actions directes sur les agents pathogènes, les neutrophiles et les macrophages sont d'importants producteurs de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires [435–438].

En modèle murin, une neutropénie est associée à une augmentation du titre viral pulmonaire ainsi que de la mortalité [439]. Les neutrophiles comptent parmi les cellules immunitaires recrutées le plus rapidement suite à l'infection, ils peuvent en effet être détectés dès le premier jour post-infection [440]. Des résultats similaires sont observés suite à l'inhibition du recrutement des macrophages [441]. Par ailleurs, les analyses anatomopathologiques de tissus pulmonaires infectés avec des IAV soulignent le poids de ces leucocytes dans la réponse à l'infection car un infiltrat inflammatoire composé principalement de neutrophiles et de macrophages est observé [442–446]. Les chimiokines clés impliquées dans le recrutement de ces cellules immunitaires sont présentées dans le Tableau 3. Les cellules épithéliales comme les macrophages sont compétents dans la production des chimiokines en réponse à une infection avec un IAV [444,447,448].

chimiokine	récepteur	principal type cellulaire recruté
CXCL1	CXCR2	neutrophiles
CXCL2	CXCR2	
CXCL3	CXCR2	
CXCL5	CXCR2	
CXCL6	CXCR1, CXCR2	
CXCL7	CXCR2	
CXCL8 (IL8)	CXCR1, CXCR2	
CCL2 (MCP-1)	CCR2	macrophages, monocytes
CCL3 (MIP-1 α)	CCR1, CCR5	
CCL4 (MIP-1 β)	CCR5	
CCL5 (RANTES)	CCR1, CCR3, CCR5	
CCL7 (MCP-3)	CCR2, CCR3	

Tableau 3 : principales chimiokines impliquées dans le recrutement des neutrophiles et cellules monocytaires.

Adapté de [422].

1.3.3 La régulation de la mort cellulaire par la mitochondrie

L'induction de la mort cellulaire est une stratégie de défense de l'organisme visant à limiter la propagation d'un agent pathogène par élimination des cellules infectées. La voie de signalisation associée à la mort cellulaire la plus caractérisée est l'apoptose. Il existe cependant d'autres mécanismes tels que la nécrose pour laquelle la mort de la cellule s'accompagne de la libération de médiateurs de l'inflammation [449]. L'apoptose peut être induite à la fois par des facteurs extra et intracellulaires. Tous deux convergent vers l'activation de caspases (principalement 3 et 7) qui, en tant que protéases, vont induire la dégradation d'une multitude de protéines [450]. Cela porte le sceau d'un état de mort cellulaire.

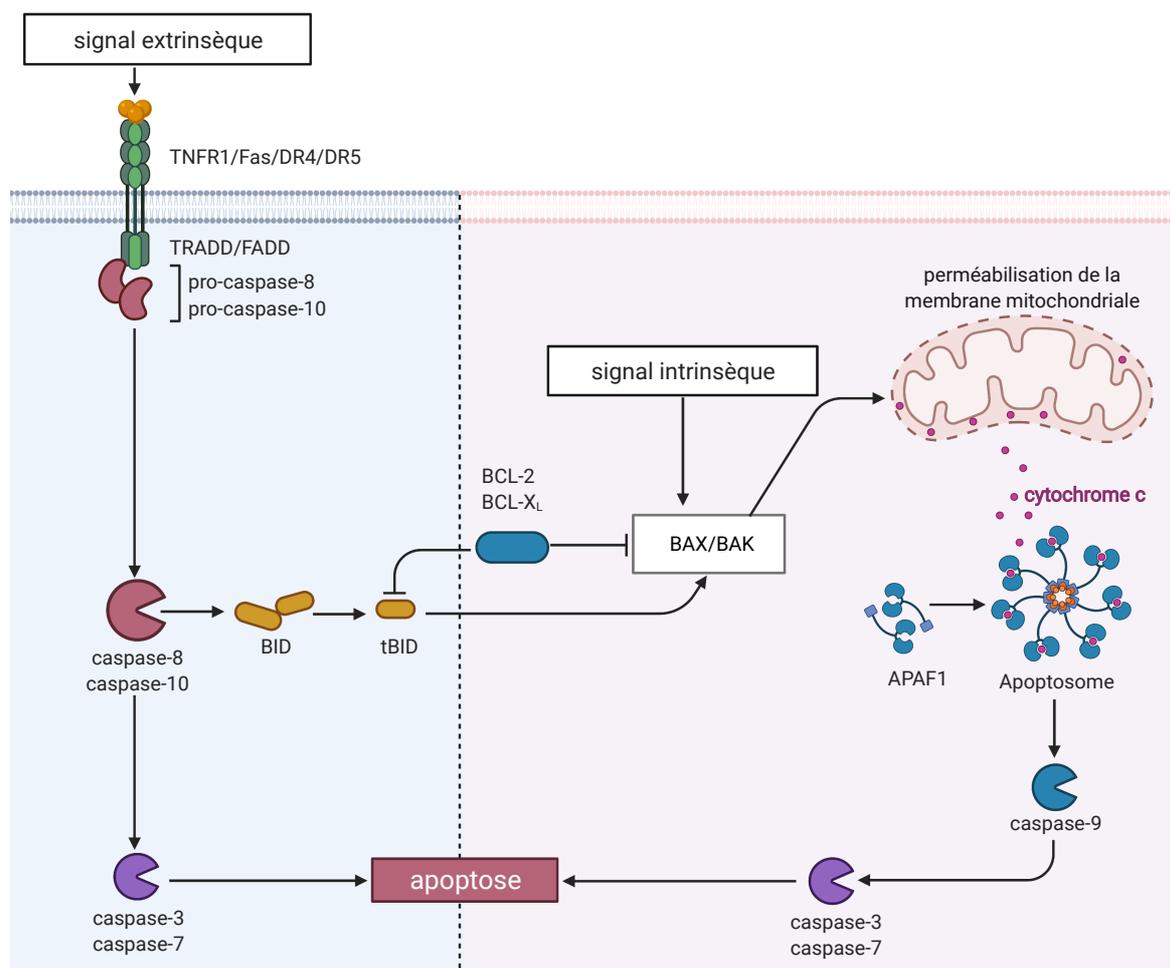


Figure 21 : voies de signalisation de l'apoptose.

La mort cellulaire par apoptose peut être activée par deux voies : intrinsèque ou extrinsèque. Dans le second cas, la transduction du message extracellulaire repose sur des récepteurs transmembranaires associés aux pro-caspases 8 et 10 à l'état basal. La forme active de ces caspases obtenue après liaison des récepteurs à leur ligand active à son tour la protéine BID (tBID). La translocation à la mitochondrie de tBID ou des facteurs pré-apoptotiques BAX et BAK libérés par des signaux de stress intrinsèques ou tBID se traduit par la libération de cytochromes c. L'association de ce dernier à la protéine APAF1 forme l'apoptosome, complexe capable d'activer les caspases 3 et 7 qui orchestrent l'apoptose.

Les signaux extracellulaires permettant d'initier l'apoptose sont les cytokines $TNF\alpha$ et TRAIL (tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand) ainsi que les ligands du

récepteur Fas [451]. Les récepteurs respectifs de TNF α et TRAIL sont TNRF1 et les death receptors 4 et 5 (DR4, DR5) [452]. Ces trois types de récepteurs portent un domaine death au niveau de leur queue cytoplasmique grâce auquel ils recrutent des protéines adaptatrices. TNRF1 recrute la protéine TRADD tandis que le récepteur Fas, DR4 et DR5 recrutent FADD. Ces protéines adaptatrices interagissent avec les pro-caspases 8 et 10, qui vont s'activer par clivage auto-protéolytique et induire une cascade d'activation des caspases (3 et 7 principalement) conduisant à l'apoptose. Simultanément, la caspase 8 active par clivage la protéine pro-apoptotique Bid, qui est alors transloquée à la mitochondrie et induit la libération de cytochrome c, entraînant des processus apoptotiques reliés à la voie intrinsèque.

Les facteurs d'activation intracellulaires sont variés et incluent notamment les molécules d'ADN endommagées ainsi qu'un stress métabolique ou hypoxique par exemple [450]. La voie intrinsèque repose sur la perte de fonctionnalité de la membrane mitochondriale induite par des protéines de la famille BCL-2. Cette famille inclut à la fois des facteurs pro et anti-apoptotiques. A l'état basal, les facteurs pro-apoptotiques BAX et BAK sont inactifs, localisés respectivement au niveau du cytoplasme et de la membrane mitochondriale externe. Les facteurs anti-apoptotiques tels que BCL-2 et BCL-X_L inhibent l'induction de l'apoptose en interagissant avec BAX et BAK mais également tBid, la forme activée de la protéine Bid [453]. Suite à un signal, BAX, BAK et tBid sont libérés et s'accumulent au niveau de la membrane mitochondriale externe induisant sa perméabilisation et la libération de cytochrome c qui s'associe ensuite avec la protéine « apoptotic peptidase activating factor 1 » (APAF-1) [454]. Cela induit le recrutement et l'activation de la caspase 9. L'ensemble forme l'apoptosome, et active les caspases 3 et 7 qui déclenchent la mort cellulaire programmée.

1.3.4 Aspect délétère de la réponse inflammatoire et physiopathologie des infections sévères

Les actions conduites par les effecteurs de la réponse immunitaire présentés précédemment ont pour but de limiter la propagation d'un agent pathogène *via* des actions concrètes sur le cycle viral, par le recrutement de cellules immunitaires compétentes ou l'apoptose des cellules infectées. Chez un individu présentant une pneumonie, le développement d'un SDRA est une complication particulièrement sévère. Un SDRA se caractérise par une tachypnée et une hypoxémie réfractaire [455], ces symptômes sont ainsi le témoignage d'une altération importante de l'efficacité des échanges gazeux. La physiopathologie de ce syndrome inclut la formation d'un œdème pulmonaire associé à une infiltration cellulaire massive [456]. Une coupe histologique présentant un recrutement cellulaire important suite à une infection par un IAV est observable en [Figure 22](#). L'encombrement du tissu pulmonaire résultant des deux facteurs précédents justifie la perturbation des rapports ventilation/perfusion et le développement d'une hypoxie. Ainsi, bien qu'initiée afin de protéger l'organisme, une réponse inflammatoire excessive pénalise l'exercice des fonctions physiologiques pulmonaires. Cela peut se traduire par l'apparition d'un symptôme sévère engageant fortement le pronostic vital (46% de mortalité chez les patients

internés en réanimation présentant un SDRA) [457].

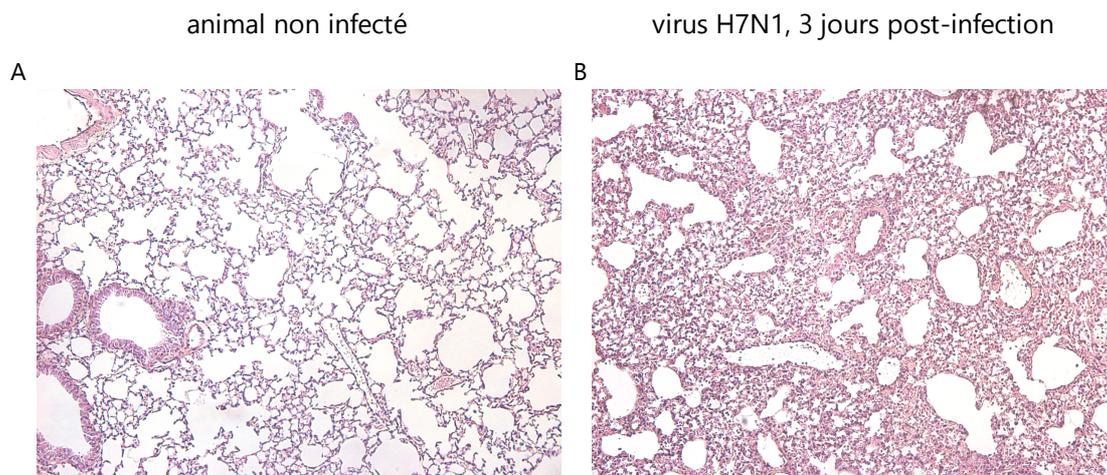


Figure 22 : lésions histologiques pulmonaires suite à une infection par un IAV.

Coupes histologiques du tissu pulmonaire d'une souris contrôle [A] ou infectée par un virus H7N1 (organe prélevé à 3 jours post-infection) [B]. Une coloration hématoxyline-éosine-safran a été utilisée (x20). Une importante infiltration cellulaire est notable chez l'animal infecté ainsi qu'un collapsus alvéolaire.

En appui avec les éléments précédents, la sévérité des symptômes développés chez un individu infecté par un IAV est positivement corrélé à l'ampleur de la réponse inflammatoire [234,458,459]. Pour exemple, le dosage de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (IL6, IL8, MCP-1) dans le sérum d'individus infectés par un virus H5N1 ou des virus saisonniers - moins virulents - révèle une production nettement plus importante dans le premier cas [233]. Par ailleurs, des analyses transcriptomiques de tissus pulmonaires de souris infectées avec des doses létales ou sous-létales d'IAV ont révélé qu'une induction précoce et massive de l'expression de cytokines (IL β , IL6, TNF α) et de chimiokines (CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1) pro-inflammatoires est également corrélée positivement à la sévérité des symptômes développés ainsi qu'à la mort des animaux. L'impact de l'activation de l'inflammasome NLRP3 sur la pathogénèse est variable. Chez la souris, le recours à des lignées transgéniques inaptes à induire une signalisation relative à NLRP3 (NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} ou caspase 1^{-/-}) a permis d'observer un rôle protecteur de l'inflammasome. Suite à une infection avec la souche PR8, les animaux transgéniques ont présenté une sensibilité accrue par rapport à la lignée sauvage [460–462]. L'action pro-inflammatoire des interleukines IL1 β et IL18 a ainsi été associée à une réponse essentielle dans la lutte contre l'infection. Toutefois, ce résultat serait propre aux phases précoces de l'infection. Tate et collaborateurs ont observé que l'inhibition de NLRP3 dès un jour post-infection augmente la pathogénicité de la souche PR8 [463]. Au contraire, si l'inhibiteur est administré plus tardivement (à partir de trois jours post-infection), le traitement est favorable à la survie de l'animal. Par ailleurs, une concentration élevée de la caspase 1, de l'IL1 β et de l'IL18 est observée dans le sérum d'individu présentant un SDRA [464]. L'ensemble de ces éléments illustre la dualité de la réponse inflammatoire, de protectrice à délétère.

La réalisation des échanges gazeux requiert une absence de liquide au niveau du tissu pulmonaire. La régulation de ce paramètre est assurée par la combinaison de l'action des jonctions serrées épithéliales et de canaux ioniques qui régissent la migration de liquides par

gradient osmotique. L'infection de cellules épithéliales est associée à une perturbation du fonctionnement de ces canaux ioniques (notamment le canal sodique épithélial ENaC) [465] et, dans le cas des virus H5N1, une dégradation des jonctions serrées est observée [466]. La mort des cellules épithéliales infectées fini de déstructurer la barrière épithéliale. Les autopsies de patients décédés d'un SDRA induit par une infection grippale ont permis d'identifier à la fois des signes d'apoptose et de nécrose [467,468]. L'ensemble de ces éléments caractérise la perturbation de l'intégrité de la barrière épithéliale pulmonaire et l'infiltration de liquide des vaisseaux sanguins vers le tissu pulmonaire. Cela conduit à la formation d'un œdème dégradant fortement l'efficacité de l'oxygénation du sang.

Plus récemment, l'implication de l'endothélium dans le développement de la pathogénèse a été étudiée. *In vitro*, une souche clinique H3N2 est capable de se répliquer dans une lignée primaire de cellules endothéliales [469]. L'apoptose induite se traduit par une augmentation de la perméabilité de la barrière endothéliale. Toutefois, *in vivo*, une infection de l'endothélium n'a été effectivement observée que chez l'hôte aviaire et dans le cas de souches HPAI [470]. L'endothélium produit un sphingolipide aux propriétés immuno-modulatrices, la sphingosine-1-phosphate (S1P) [471]. En modèle murin, l'administration d'un inhibiteur de la signalisation liée à S1P se traduit par une réduction de la réponse immunitaire innée et une survie accrue des animaux à une infection avec la souche H1N1 WSN [472]. L'endothélium semble ainsi contribuer de façon importante à la régulation de la réponse de l'hôte et pourrait contribuer au développement d'une inflammation excessive.

Une complication typique des infections grippales est constituée par les surinfections bactériennes. L'exemple le plus frappant de cette accumulation est celui de la grippe espagnole pour laquelle les autopsies d'individus décédés ont fréquemment révélé des traces de pneumonie bactérienne [186]. Lors de la pandémie de 2009, une surinfection bactérienne a été notée dans 25 à 50% des formes sévères [473–475]. Le plus souvent, la bactérie isolée est un staphylocoque doré ou un pneumocoque.

Le niveau d'adaptation d'un virus à son hôte est décrit par le concept de fitness viral. Initialement développé au sein de la théorie de l'évolution darwinienne, l'adaptation correspond à l'aptitude d'une entité biologique à transférer son patrimoine génétique à la génération suivante [477]. En transposant à la virologie, un virus adapté est ainsi un virus capable de produire une progéniture infectieuse chez un hôte donné [478]. Dans le cas d'un franchissement de la barrière d'espèce, il existe des facteurs de restriction limitant l'adaptation du virus à son nouvel hôte. Les facteurs opposés au franchissement de la barrière d'espèce présentés en amont sont de types « mécaniques » (en page 35). Ils correspondent à des propriétés physico-chimiques ou structurelles peu favorables au déroulement du cycle viral. Cependant, la virulence (i.e. les dommages induits en termes de morbidité et mortalité par l'infection) va également jouer un rôle dans le fitness viral. La relation adaptation-virulence est complexe et sujet à controverse. Certaines études ont identifié une corrélation positive entre fitness et virulence [183,479,480], tandis que d'autres suggèrent qu'une mortalité réduite permet d'augmenter la contamination inter-hôte [481]. En effet, plus la mortalité est faible, plus la probabilité que l'hôte infecté contamine au moins un autre individu est élevée ($R_0 > 1$)

[482]. Ainsi, bien que le lien entre adaptation et virulence ne soit pas entièrement caractérisé, il est indéniable que la virulence d'un agent pathogène joue dans son adaptation au sein d'un hôte.

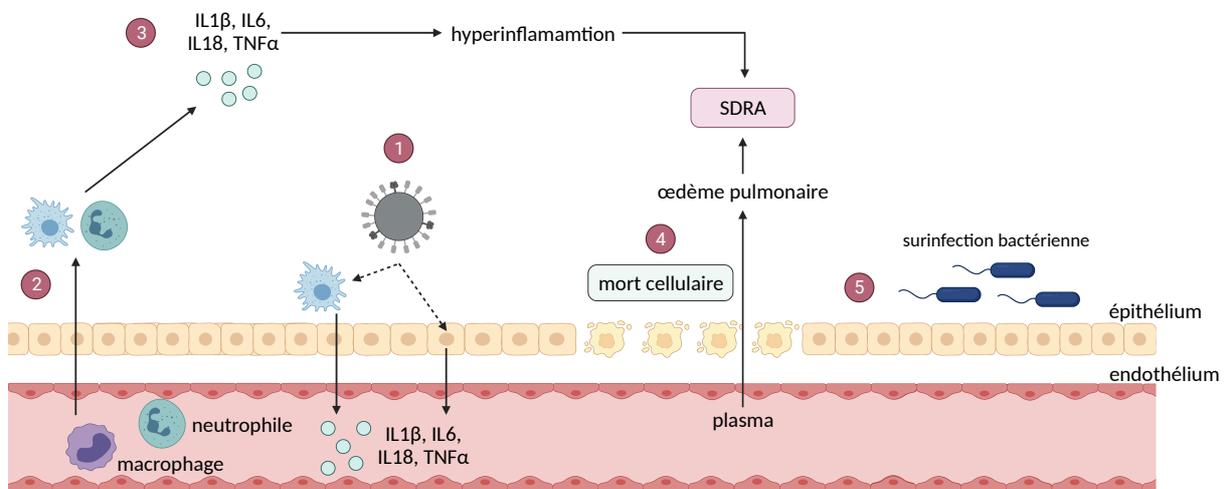


Figure 23 : schéma bilan de la pathogénèse d'une infection grippale sévère.

① Infection des cellules épithéliales et des macrophages alvéolaires. Des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires sont produites afin d'alerter l'organisme et d'initier une réponse antivirale. ② Infiltration de neutrophiles et macrophages en réponse aux chimiokines libérées. ③ Ces cellules sont d'importantes productrices de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires ce qui contribue à un emballement de la réponse inflammatoire. ④ La perméabilisation de la frontière épithélium/endothélium favorise l'infiltration de liquide au sein du tissu pulmonaire. La formation d'un œdème ainsi que le recrutement cellulaire massif dus à la production massive de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires conduit au développement d'un SDRA. ⑤ Une surinfection bactérienne peut survenir, ce qui constitue un facteur d'aggravation de l'infection important. Adapté de [476].

Au cours d'une infection avec un IAV, la réponse développée par l'hôte est à double tranchant. Une réponse excessive n'est pas à l'avantage de l'organisme, au contraire elle est associée à des symptômes sévères. Le pouvoir pathogène d'un IAV est donc lié à l'ampleur de la réponse immunitaire développée par l'hôte infecté. En conséquence, l'aptitude d'un virus à moduler la réponse de l'hôte peut favoriser ou non son adaptation à un nouvel hôte. Il est ainsi intéressant d'aborder le franchissement de la barrière d'espèce sous cet angle, en complément des facteurs restrictifs « mécaniques » tels que l'affinité pour les récepteurs cellulaires. Les IAV expriment plusieurs protéines (PB1-F2, PA-X, NS1) dont l'activité impacte la réponse de l'hôte et sont en conséquence nommées facteur de virulence. Au cours de ce projet, nous nous sommes focalisés sur PB1-F2.

1.4. La protéine PB1-F2

1.4.1 Découverte et contexte d'expression

La protéine PB1-F2 est identifiée au début des années 2000 grâce à un projet visant initialement à identifier des épitopes viraux de la souche PR8 (A/Puerto Rico/8/34, H1N1) reconnus par les lymphocytes T CD8+ [41]. Des peptides ayant une affinité prédictive pour le Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe 1 (CMH1) ont ainsi été recherchés dans le génome viral. Un peptide appartenant à un cadre de lecture alternatif du segment codant la protéine PB1 est alors identifié. La reconnaissance de celui-ci par les LT CD8+ est ensuite validée chez la souris ainsi que l'expression de la protéine contenant ce peptide au cours de l'infection. Cette dernière est constituée de 87 acides aminés (aa) pour un poids moléculaire de 10,5 kDa. Étant codée par le second cadre de lecture du segment PB1, elle est en conséquence nommée PB1-F2 (PB1-Frame 2).

L'expression de PB1-F2 est permise par un environnement Kozak ([A/G]xxAUGG) plus favorable à la traduction que celui des codons initiateurs présents dans la région 5' du segment PB1 [41,42,483] (Figure 24). Ainsi, l'expression de PB1-F2 est permise par un recrutement des ribosomes moins optimal en amont. Par ailleurs, l'existence de codons initiateurs au sein de la séquence de PB1-F2 suggère que protéines tronquées en région N-terminale pourraient être produites. Enfin, la protéine PB1-F2 est spécifique aux IAV, son ORF n'étant pas retrouvé au sein du segment PB1 des trois autres types de virus influenza.

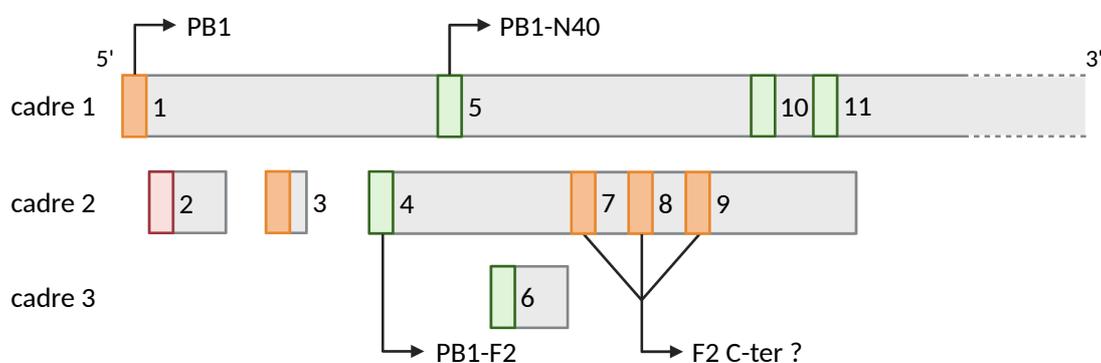


Figure 24 : codons d'initiations de la région 5' du segment PB1.

Les différents codons initiateurs sont colorés selon la force de l'environnement de Kozak associé (vert : forte, orange : intermédiaire, rouge : faible). Les ORF codant pour une protéine identifiée sont précisés par une flèche. Le segment PB1 de la souche PR8 a été utilisé comme modèle. Adapté de [42].

L'expression de PB1-F2 est concentrée sur les phases précoces de l'infection. Dans le cas de la souche WSN, le maximum d'expression a été observé à 10 heures post-infection et la protéine n'est plus détectable à 24 heures post-infection. Cela est appuyé par une courte durée de demi-vie qui a été estimée à 30 minutes par analyse pulse-chase. Le traitement de cellules infectées par un inhibiteur du protéasome prolonge la durée d'expression de PB1-F2 [41]. Ainsi, la dégradation de PB1-F2 est associée à un ciblage par le protéasome qui serait déterminé par l'ubiquitination d'un groupe de lysines situées dans la région C-terminale de PB1-F2 [484].

1.4.2 Une protéine fortement polymorphe

La première protéine PB1-F2 identifiée et caractérisée, issue de la souche H1N1 d'origine humaine PR8, présente une taille de 87 aa. En recherchant la présence de l'ORF correspondant à PB1-F2 au sein du segment PB1 d'autres IAV, les auteurs ont observé qu'il s'agissait plutôt d'un cas particulier. En effet, la majorité des soixante-quatre séquences analysées ont présenté un ORF de 90 aa [41]. Des analyses phylogénétique de grande ampleur ont par la suite relevé que la taille de la protéine de PB1-F2 est en réalité très variable, allant de 0 à 101 aa [485,486]. Par ailleurs, vingt-trois formes tronquées ont également été identifiées [486]. Ce polymorphisme soulève la question de la taille minimale de la protéine lui permettant de rester fonctionnelle. L'étude originelle présentant PB1-F2 a observé un tropisme mitochondrial dans environ 50% des cellules infectées exprimant la protéine [41]. L'adressage de PB1-F2 à cet organite a été considéré comme le reflet de la fonctionnalité de la protéine. La taille critique associée à ce phénotype (>78 aa [487]) a en conséquence été fixée comme valeur seuil de fonctionnalité de PB1-F2. Il est notable que cet arbitrage est basé sur un rationnel assez peu robuste. Une étude a cependant relevé que les protéines PB1-F2 présentant une taille comprise entre 79 et 87 aa étaient peu fréquentes [488]. Ainsi, appliquer un seuil de 78 aa ou considérer les protéines pleine longueur ne modifie pas de façon majeure la proportion de PB1-F2 estimées fonctionnelles.

La majorité des souches expriment une PB1-F2 fonctionnelle (87% [485] et 64% [486] des souches analysées). Cet indicateur global masque cependant une hétérogénéité très importante. Une forte dichotomie est premièrement constatée entre les virus isolés chez les hôtes aviaires et mammifères. En effet, tandis que l'expression d'une protéine fonctionnelle est extrêmement conservée au sein des souches aviaires (95% des souches), cela est beaucoup moins vérifié dans le cas des virus d'origine mammifère (Tableau 4). Notamment, les formes non fonctionnelles sont majoritaires chez l'Homme.

hôte	nombre de souches analysées	% souches exprimant une PB1-F2 supposée fonctionnelle (>78 aca)
humain	10 948	37%
porcin	2128	60%
aviaire H5N1	9358	95%
total	22 434	64%

Tableau 4 : part de PB1-F2 fonctionnelles selon l'hôte considéré.

L'analyse est basée sur l'ensemble des séquences des segments PB1 pleine longueur recensées sur les bases de données GISAID ou NCBI Influenza jusqu'en 2013. Adapté de [486].

L'expression majoritaire d'une PB1-F2 fonctionnelle est un trait partagé par l'ensemble des souches aviaires [486,489] quelle que soit l'espèce considérée [488]. Cependant une forte augmentation de formes tronquées est observée depuis 2008 au sein des souches H5N1 HPAI. Des données ultérieures sont nécessaires afin de confirmer cette tendance. La lignée H5N1 HPAI Gs/Gd (en page 32) a évolué en de nombreux clades et sous-clades. Les virus H5N1 du clade 2.3.4.4 ont connu de multiples réassortiments aboutissant à des virus HPAI H5 chez

lesquels la neuraminidase N1 a été remplacée par d'autres sous-types, dont N2, N3, N5, N6 et N8 [490]. Ces virus réassortants sont nommés H5Nx. Les oiseaux aquatiques migrateurs ont contribué à une diffusion panzootique de ces virus à partir de la Chine. Parmi les H5N8, deux sous-clades se distinguent : 2.3.4.4a et 2.3.4.4b. Ce dernier est à l'origine des épizooties survenues en France lors des hivers 2016-2017 [491] et 2020-2021 ([note de la plateforme ESA du 21/01/2021](#)). De façon, intéressante, le clade 2.3.4.4b a été associé à une mortalité plus importante chez les oiseaux sauvages et les canards d'élevage [251,492,493]. Au sein du clade 2.3.4.4b, des protéines PB1-F2 naturellement tronquées de 11 aa ont été identifiées.

Au sein des souches d'origine mammifère, la proportion de protéines PB1-F2 estimées fonctionnelles diffère selon le sous-type viral considéré. Alors que tous les virus H1N1 recensés entre 1918 et 1947 exprimaient une PB1-F2 pleine longueur, des virus codant une forme tronquée de 57 aa ont émergé à partir de 1950 [486]. Le virus H1N1 pandémique de 2009 exprimait une PB1-F2 tronquée de 11 aa [494]. Les virus H1N1 saisonniers contemporains descendent de cette souche pandémique, en conséquence la presque totalité de ces virus n'expriment pas une PB1-F2 fonctionnelle. Dans le cas des virus H3N2, au contraire, la très grande majorité exprime une PB1-F2 fonctionnelle (en moyenne 80% des virus isolés avant 2014) [495]. Toutefois, près de 50% des souches H3N2 ayant circulé durant la saison 2010-2011 présentaient une forme tronquée de 34 aa. Un tel phénomène ne s'est pas réitéré et reste donc à ce jour anecdotique.

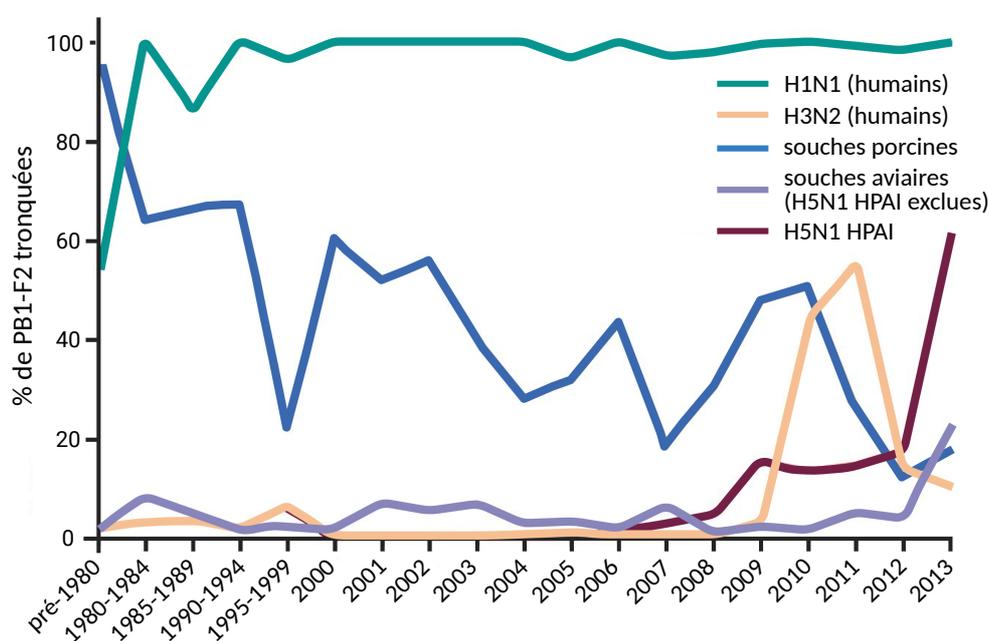


Figure 25 : évolution de la prévalence des formes tronquées de PB1-F2.
D'après [486].

En résumé, la taille de la protéine PB1-F2 est variable selon l'espèce d'origine du virus. L'expression majoritaire d'une PB1-F2 fonctionnelle au sein des espèces aviaries suggère que PB1-F2 confère un avantage sélectif chez les espèces réservoirs des IAV alors que la tendance s'inverse chez le mammifère. Cet avantage ne serait pas systématiquement retrouvé chez le

mammifère, d'où l'exercice d'une pression de sélection ayant conduit à l'émergence de formes tronquées non fonctionnelles. En ce sens, la protéine PB1-F2 pourrait contribuer à l'adaptation d'une souche virale lors d'un franchissement de la barrière d'espèce.

1.4.3 Contribution de PB1-F2 à la pathogénicité

1.4.3.1 Chez l'hôte aviaire

Les études caractérisant les fonctions de la protéine PB1-F2 chez les espèces aviaires sont peu nombreuses. Chez le poulet, la contribution de PB1-F2 à la pathologie développée a été étudiée avec pour modèle des virus H5N1 HPAI et H9N2 LPAI [488,496]. Dans les deux cas, un impact fort de son expression sur la mortalité a été noté. En effet, les animaux infectés avec un virus WT ont présenté un meilleur taux de survie (respectivement 50 et 100%) que ceux infectés avec le virus homologue Δ F2 (15 et 60%). Ces éléments suggèrent que la protéine PB1-F2 favorise la survie de l'hôte. Par ailleurs, dans le cas du virus H9N2, PB1-F2 a également été un facteur déterminant de la durée d'excrétion virale. L'absence de son expression a été associée à une réduction puis à un arrêt de l'excrétion virale au niveau de la cavité buccale un peu plus précoce. Compte tenu de la faible pathogénicité du virus H9N2, l'excrétion par la voie digestive a été très fugace, cependant un nombre réduit d'animaux excréteurs a tout de même pu être observé en l'absence d'expression de PB1-F2. La quantification du génome viral au niveau des fosses nasales et du colon appuie ces observations, une réduction du titre viral étant observé avec le virus H9N2 Δ F2. Ces résultats se traduisent par une efficacité de transmission réduite du virus H9N2 Δ F2 par rapport à celui WT. En résumé, la protéine PB1-F2 semble être un facteur d'atténuation de la virulence chez le poulet favorisant la diffusion du virus. Cela rejoint un principe décrivant la dynamique d'évolution des agents pathogènes au sein d'une population : plus la mortalité induite par l'infection est faible, plus la probabilité que l'hôte infecté contamine au moins un autre individu, et donc se propage est élevée [481,482].

En 2002, des variants H5N1 HPAI dérivés de la lignée Gs/Gd présentant une virulence inédite chez des espèces usuellement peu sensibles aux IAV (canards, pigeons, cygnes, oies) ont émergés [138,139,229–232]. Au cours d'une étude basée sur l'un de ces variants, des motifs contribuant à définir la virulence ont été identifiés au sein de la protéine PB1-F2 [497]. La perte des résidus T51, V56, E87 s'est en effet traduite par une augmentation du taux de survie lors d'un challenge infectieux chez le canard colvert. La protéine PB1-F2 pourrait ainsi contribuer au potentiel pathogène des virus H5N1 HPAI notamment *via* ce motif TVE.

En résumé, l'expression de PB1-F2 pourrait constituer un avantage sélectif justifiant sa forte conservation chez les espèces aviaires. Il serait intéressant de disposer de données plus diversifiées, à la fois en termes de souches virales et d'espèces afin d'appuyer cette hypothèse. Notamment, les virus H5N8 à l'origine des épizooties survenues en Europe au cours des hivers 2015-2016 et 2020-2021 présentent une délétion naturelle de PB1-F2 et constituent ainsi un sujet d'étude d'intérêt particulier.

1.4.3.2 Chez les mammifères

Chez les mammifères, l'impact de la protéine PB1-F2 sur la pathologie développée est fortement dépendant de la souche virale considérée. Dans le cas la souche H1N1 WSN, la délétion de la protéine PB1-F2 s'est traduite par une réduction des signes cliniques développés et en conséquence d'une amélioration significative du taux de survie en modèle murin. Une fonction pro-inflammatoire de PB1-F2 a par ailleurs été notée, basée sur une induction de l'activité NF- κ B et un recrutement de neutrophiles [498]. Il s'agit d'un point important du mécanisme d'action de PB1-F2 car la protéine perd son rôle de facteur de virulence dans un modèle de souris neutropéniques [499]. Des études se sont attachées à caractériser les propriétés de PB1-F2 dans un contexte de franchissement de la barrière d'espèce. Contrairement au virus WSN, l'expression de la protéine PB1-F2 par un virus H5N1 ne contribue pas à la mortalité induite en modèle murin [232,500]. Toutefois, une interférence de PB1-F2 sur le développement de la réponse inflammatoire a été notée. En début d'infection, la protéine PB1-F2 inhibe l'activation des macrophages puis des lymphocytes NK tandis que plus tardivement, son action s'inverse car elle amplifie l'inflammation pulmonaire en favorisant le recrutement de neutrophiles [500]. Dans l'ensemble des études évoquées, la délétion de PB1-F2 ne s'est jamais accompagnée d'un impact sur la capacité répliquative du virus estimée par quantification du génome viral dans le tissu pulmonaire. Cela indique que la contribution de la protéine PB1-F2 au cycle viral est accessoire et, en conséquence, que son action sur la réponse de l'hôte ne se caractérise pas uniquement par une modulation de la quantité de virus présente au sein de l'organisme.

Comme cela a été évoqué chez l'hôte aviaire, il existe également des motifs de PB1-F2 contribuant à définir le potentiel pathogène d'une souche virale chez le mammifère. Notamment, la présence d'une sérine en position 66 (polymorphisme N66S) a été associée à une virulence accrue. Ce polymorphisme est notamment présent au sein de la protéine PB1-F2 exprimée par des virus présentant une origine aviaire : H1N1 à l'origine de la grippe espagnole et le premier H5N1 HPAI isolée chez l'Homme en 1997. Des études ont permis de mettre en évidence que ce polymorphisme contribue très fortement à la sévérité des signes cliniques développés en modèle murin [501,502]. Les auteurs ont associé la présence de ce motif à une inhibition de la voie IFN en phase précoce de l'infection, retardant en conséquence l'initiation d'une réponse antivirale. Cela est appuyé par des titres viraux et une persistance du virus au sein du tissu pulmonaire plus importants lorsque PB1-F2 porte ce motif, témoignant de la difficulté de l'organisme à lutter contre l'infection. Le caractère pro-virulent porté par le polymorphisme N66S est donc associé à un impact sur la réplication virale. De plus, une inflammation exacerbée caractérisée par une infiltration de neutrophiles et monocytes a également été observée. Ce motif est cependant rare au sein des virus H5N1 (environ 3% sur 666 souches analysées) [489]. Enfin, d'autres résidus contribuant à la fonction pro-inflammatoire de PB1-F2 ont été identifiés au sein de la souche pandémique H3N2 de 1968. Également situé au niveau du domaine C-terminal, il s'agit du motif L62, R75, R79, L82 [503]. De la même façon que le polymorphisme N66S, ce motif contribue au développement de

signes cliniques chez la souris et accentue la réponse inflammatoire développée évaluée par l'infiltration de leucocytes, neutrophiles et macrophages [495]. A l'inverse, le motif P62, H75, Q79, S82 est associé à une protéine PB1-F2 ne présentant pas de potentiel pro-inflammatoire.

Le virus H1N1 à l'origine de la pandémie de 2009 exprime une PB1-F2 tronquée de 11 acides aminés supposée en conséquence non fonctionnelle. La mortalité induite par ce virus a d'ailleurs été bien plus réduite - environ dix voire 200 fois dans le cas de la grippe espagnole - que celle observée avec les virus pandémiques précédents [198]. L'amélioration de la qualité des soins médicaux ne pouvant justifier un tel écart, le virus pandémique de 2009 s'est réellement révélé moins virulent que ses prédécesseurs. Il est ainsi tentant d'associer la virulence modérée du virus H1N1pdm 2009 à l'absence de la protéine PB1-F2. Cette hypothèse est toutefois à considérer avec mesure. La restitution de son expression chez le furet ne s'est pas traduite par un réel impact que ce soit sur les signes cliniques développés, la susceptibilité à une surinfection bactérienne ou sur le recrutement de cellules immunitaires [504].

Dans le cas de virus responsables des épidémies saisonnières et donc établis de façon stable au sein de la population humaine, le caractère pro-pathogène de PB1-F2 identifié précédemment n'est pas retrouvé. La délétion de son expression au sein de souches H1N1 chez le furet [505] ou H3N2 chez la souris [495] ne modifie pas la pathologie développée chez ces hôtes.

Il est notable que PB1-F2 présente intrinsèquement un effet pathogène. Dans le cas de la souche PR8, la présence du motif I68, L69, V70 a été identifié comme déterminant de cette propriété [506]. De plus, en adéquation avec ce qui a été décrit en conditions infectieuses, l'instillation de protéines PB1-F2 présentant une origine aviaire et/ou un motif de pathogénicité induisent le développement de signes cliniques chez la souris associés à une inflammation pulmonaire (PR8, H5N1 HPAI, H1N1, les virus à l'origine des pandémies de 1918/1957/1968 et H7N9) [503,507,508]. Au contraire, la PB1-F2 exprimée par un virus H3N2 saisonnier ne présente pas de potentiel pathogène.

Parmi tous les éléments évoqués, il semble important de retenir que la protéine PB1-F2 peut contribuer à la pathogénicité chez le mammifère en amplifiant la réponse inflammatoire. Cela s'oppose à ce qui a été décrit chez l'oiseau où PB1-F2 agit plutôt comme un facteur d'atténuation. Cependant, le caractère pro-virulent de PB1-F2 n'est pas une vérité générale, il est impératif de tenir compte de la souche d'origine. Les protéines PB1-F2 exprimées par les virus pandémiques, H5N1 HPAI et certaines souches de laboratoire (WSN, PR8) présentent un rôle de facteur de virulence chez le mammifère. Ces virus ont un commun un segment PB1 d'origine aviaire et/ou portent des motifs particuliers. Au contraire, chez les virus responsables des épidémies saisonnières, la protéine PB1-F2 ne possède plus un tel impact sur la pathogénicité. En conséquence, il semble que la contribution de PB1-F2 à la pathogénicité chez le mammifère s'exerce lorsque qu'elle possède une origine aviaire récente. Cela signifie qu'un virus ayant franchi la barrière d'espèce ou issu d'un réassortiment ayant sélectionné le segment PB1 aviaire exprime une PB1-F2 présentant un potentiel pro-inflammatoire important et donc pouvant accentuer la pathogénicité. Dans le cas où le virus parviendrait à se pérenniser au sein de la population humaine, ce phénotype de PB1-F2 n'est

pas conservé. Cela appuie l'idée d'une implication de PB1-F2 dans l'adaptation d'un virus à l'Homme. Les processus d'évolution des IAV au sein de la population humaine pourraient ainsi sélectionner des protéines PB1-F2 dont le caractère pro-inflammatoire est atténué (ou une protéine tronquée non fonctionnelle).

1.4.4 Propriétés fonctionnelles de PB1-F2

1.4.4.1 Tropisme mitochondrial

La première étude à l'origine de la découverte de PB1-F2 a identifié un tropisme mitochondrial relativement fréquent (55% des cellules infectées par des virus exprimant la protéine) [41]. Une distribution nucléaire ou cytoplasmique est également observée. Cependant, alors que la localisation mitochondriale est intrinsèque, celle nucléaire et cytoplasmique est dépendante d'un contexte infectieux. La région C-terminale de la protéine porte un signal d'adressage mitochondrial (MLS) prédictif [487,509]. Les résidus minimum nécessaires ne font cependant pas consensus. En cellules aviaires, un tropisme mitochondrial majoritaire de PB1-F2 a également été observé pour un virus HPAI (H5N1), mais pas LPAI (H9N2) [510]. Le tropisme mitochondrial de PB1-F2 se traduit par un impact sur la morphologie de l'organite qui présente en conséquence un aspect fragmenté/ponctiforme. La localisation mitochondriale a été affinée en identifiant la présence de PB1-F2 au niveau de la membrane mitochondriale interne [509]. Un mécanisme de transport a été décrit en cellules épithéliales avec pour modèle le virus PR8 : PB1-F2 transite *via* la translocase TOM40 [511]. L'expression de PB1-F2 est de plus associée à une perturbation du potentiel membranaire mitochondrial qui reflète une perméabilisation membranaire [487,509,512]. Cette dernière a été associée à l'aptitude de PB1-F2 à s'insérer au sein des membranes lipidiques et à former des pores [512].

La mitochondrie est un pôle stratégique de la réponse cellulaire développée face à l'infection. En effet, outre sa contribution dans la voie apoptotique, elle héberge la protéine MAVS. La perturbation des fonctions de cet organite produit de plus des molécules à l'origine de l'activation de l'inflammasome NLRP3. La localisation mitochondriale de PB1-F2 n'est donc pas sans conséquence sur la réponse de la cellule hôte.

1.4.4.2 Variabilité des propriétés de PB1-F2 selon le type cellulaire

1.4.4.2.a Cellules épithéliales

Effet pro-apoptotique, une spécificité de la souche PR8

La respiration mitochondriale fait intervenir le cytochrome c, une petite hémoprotéine associée à la membrane mitochondriale interne. Sa présence dans le cytosol est donc un signal d'alerte d'un dysfonctionnement mitochondrial et constitue un signal d'activation de l'apoptose [513]. La protéine PB1-F2 induisant une déstabilisation de la membrane

mitochondriale, cela suggère qu'elle pourrait favoriser la libération du cytochrome c et en conséquence l'apoptose. Cependant, en cellules épithéliales, seule la protéine PB1-F2 exprimée par le virus PR8 a été associée à un impact sur la voie apoptotique [507,514]. De plus, une seule étude a observé ce phénomène en condition infectieuse, ainsi ce résultat ne fait pas consensus [514].

Une interaction de PB1-F2 avec le canal ionique VDAC1 et la translocase ANT3 respectivement localisées au niveau de la membrane mitochondriale externe et interne a été identifiée. L'interaction avec ANT3 est nécessaire à l'apoptose médiée par PB1-F2 [514]. L'étude n'a pas permis de trancher entre les trois hypothèses conduisant à une libération du cytochrome c : i) le cytochrome c transite via les pores directement formés par PB1-F2, ii) l'interaction individuelle de PB1-F2 avec ANT3 et VDAC1 induit une perméabilisation de la membrane mitochondriale interne et externe et iii) le complexe PB1-F2/VDAC1/ANT3 forme un pore reliant la matrice mitochondriale au cytosol. De plus, PB1-F2 ne peut intrinsèquement induire l'apoptose. En effet, un signal initiateur tel que la cytokine TNF α est nécessaire pour observer une action de PB1-F2 sur cette voie cellulaire. Ainsi, PB1-F2 agit comme un facteur amplificateur plutôt qu'un inducteur de l'apoptose. Par ailleurs, l'induction de la libération de cytochrome c par PB1-F2 semble dépendante des protéines BAX et BAK qui favorisent une rupture de la membrane mitochondriale externe [507,515–517].

Impact sur la voie MAVS

Plusieurs modes d'action par lesquels PB1-F2 interfère avec les fonctions de MAVS ont été décrits. Premièrement, la variation du potentiel membranaire mitochondrial précédemment évoquée et induisant une déstabilisation de la membrane mitochondriale impacte également le fonctionnement de MAVS. Une réduction du différentiel de charge limite en effet le niveau d'activation de cette signalisation [518]. Deuxièmement, une interaction entre MAVS et certaines PB1-F2 a été identifiée (PR8, WSN, H5N1) [519,520]. Une étude a également démontré une interaction entre la protéine MAVS du poulet et les PB1-F2 issue de virus H9N2 et H5N1 [510]. Troisièmement, la protéine PB1-F2 d'une souche H7N9, bien que n'interagissant pas directement avec MAVS, bloque l'interaction entre MAVS et TRIM31 nécessaire à son activation. Quatrièmement, une interaction entre la protéine PB1-F2 de la souche WSN et CALCOCO2 a été décrite [521]. Cette dernière est impliquée dans la signalisation MAVS à deux niveaux par son interaction avec TRAF6 et TBK1. Enfin, cinquièmement, la protéine PB1-F2 du virus à l'origine de la grippe espagnole agit en amont de MAVS par son interaction avec le senseur cellulaire de la famille des DEAD box hélicases DDX3 [522]. A l'instar de RIG-I, l'activation de DDX3 suite à la reconnaissance d'ARNv se traduit par une induction de la signalisation MAVS, que PB1-F2 inhibe.

Dans des expériences basées sur des transfections, l'ensemble des études précédemment citées s'accordent sur le point que l'action de PB1-F2 sur MAVS se traduit par une inhibition de la voie IFN-I. En conditions infectieuses, une spécificité de souche se manifeste. Les PB1-F2 des virus PR8, H7N9 et H1N1 1918 maintiennent une action inhibitrice

sur la synthèse d'IFN [520,522,523]. Au contraire, dans le cas du virus WSN, une fonction pro-IFN est observée, à la fois *in vitro* [524] et *in vivo* [498]. Cette activité serait plutôt exercée sur des phases tardives de l'infection car non décelable à 8 heures pi (ie ~ un cycle viral).

La signalisation MAVS constitue également une voie d'activation du facteur de transcription pro-inflammatoire NF- κ B. Dans le cadre de l'interaction de la protéine PB1-F2 du virus WSN avec CALCOCO2, une induction de l'activité de NF- κ B a été notée. CALCOCO2 favorisant l'activité de TRAF6, cette fonction est potentialisée par PB1-F2, amplifiant en conséquence la réponse inflammatoire [521]. Une étude s'oppose à cette observation en décrivant une inhibition de l'activité NF- κ B médiée par les PB1-F2 du virus PR8 et de souches H5N1 HPAI [525]. Un modèle proposé est basé sur une interaction de PB1-F2 avec IKK β . En conséquence, le complexe IKK ne serait plus apte à libérer NF- κ B de sa séquestration cytoplasmique. Par ailleurs, les protéines PB1-F2 exprimées des souches HPAI H5N1 et LPAI H9N2 interagissent également toutes deux avec la IKK β du poulet [510]. Toutefois, seule la PB1-F2 H9N2 agit sur NF- κ B, en inhibant son activité. Cela semble faire sens vis-à-vis de leur pathogénicité respective chez le poulet. La souche H9N2 étant faiblement pathogène, une réponse inflammatoire moins importante que celle induite par un virus hautement pathogène est concordante.

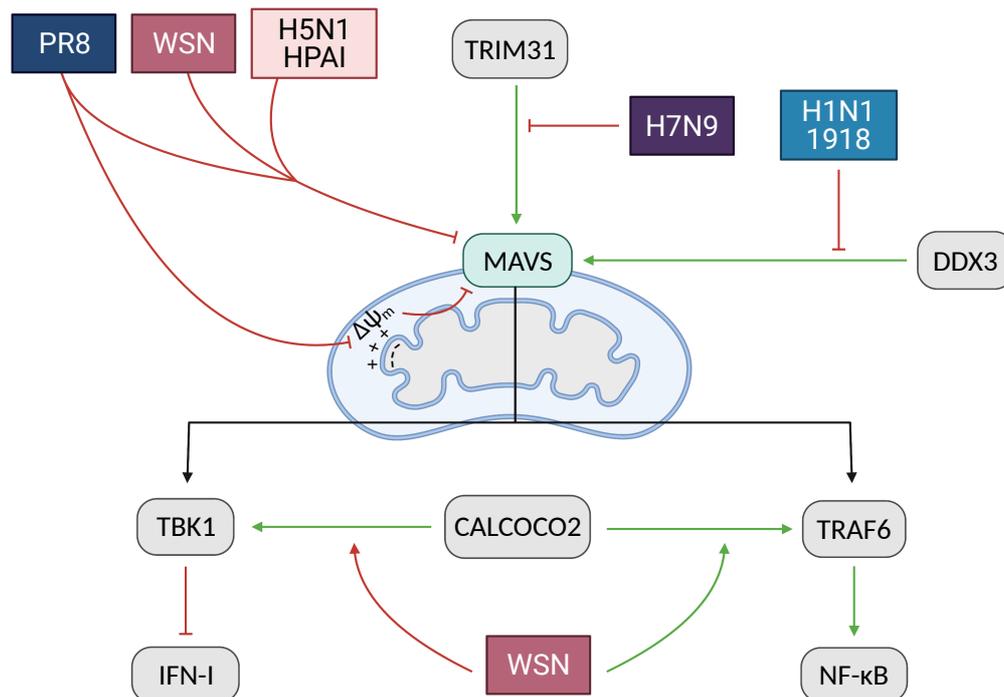


Figure 26 : bilan des actions de PB1-F2 sur la cascade MAVS.

En résumé, bien qu'une modulation de l'activité de MAVS par PB1-F2 soit indéniable, l'issue sur la réponse IFN et inflammatoire est à l'image de ce qui est observé *in vivo* : souche spécifique. Il est notable qu'un effet pro-inflammatoire de PB1-F2 est très nettement identifié *in vivo*. Ainsi, il semble peu probable que l'inhibition de l'activité du facteur de transcription NF- κ B médiée par l'interaction avec IKK β prenne le dessus en condition infectieuse. La compréhension globale de l'action de PB1-F2 reste ainsi incomplète et fait intervenir plusieurs

voies interdépendantes.

Restriction souches aviaires/mammifères

La sous-unité PA du complexe polymérase interagit avec la protéine anti-apoptique HAX-1 [526,527]. Initialement, il a été supposé que cette interaction pourrait constituer une voie par laquelle les IAV régularaient la mort cellulaire. Il s'est avéré que HAX-1 constitue en réalité un facteur inhibant l'import nucléaire de PA, limitant ainsi la réplication virale. Cependant, il semble que les PA d'origine aviaire soient plus sensibles à l'action de HAX-1 [528]. Les protéines PB1-F2, d'origine aviaire comme humaine, interagissent également avec HAX-1 [528,529]. Par cette interaction compétitive, la protéine PB1-F2 d'un virus H5N1 HPAI parvient à contrecarrer l'effet inhibiteur qu'exerce HAX-1 sur PA [528]. En cellules épithéliales pulmonaires humaines, PB1-F2 permet ainsi de lever une restriction d'hôte propre aux virus aviaires.

1.4.4.2.b Cellules immunitaires

Effet pro-apoptotique

Plusieurs études indépendantes ont observé une induction de l'apoptose par PB1-F2 en cellules immunitaires infectées (macrophages ou monocytes) [41,507,530–532]. En ce sens, un rôle pro-apoptotique de PB1-F2 semble plus pertinent au sein de ces types cellulaires qu'en cellules épithéliales. Encore une fois, ce résultat a été quasi-exclusivement observé avec la souche PR8. La phosphorylation de deux résidus situés dans la région N-terminale (T27 et S35) est de plus nécessaire [530]. La protéine NLRX1 protège les macrophages de l'apoptose médiée par PB1-F2. Elle interagit avec cette dernière au sein des mitochondries, privant en conséquence PB1-F2 d'exercer ses fonctions [533].

Impact sur l'inflammasome NLRP3

En modèle murin, l'instillation de peptides synthétiques basés sur les séquences PB1-F2 des souches H1N1 PR8 et d'un virus H7N9 est associée à une augmentation de la concentration en IL1 β dans les lavages bronchoalvéolaires [508,534]. Cela implique donc que PB1-F2 contribue à l'activation de l'inflammasome NLRP3. La fonction pro-inflammatoire de PB1-F2, évaluée par le recrutement de leucocytes dans le tissu pulmonaire, est réduite chez des souris NLRP3^{-/-}. Ainsi, l'activation de cet inflammasome constitue un point important des mécanismes définissant le pouvoir pathogène de PB1-F2.

L'ensemble des approches développées *in vitro* ont été conduites sur des cellules immunitaires (macrophages). Comme cela a été évoqué précédemment, bien que NLRP3 semble fonctionnel dans les cellules épithéliales respiratoires, les données bibliographiques suggèrent que la contribution de cet inflammasome dans la réponse cellulaire est plus critique

au sein des cellules immunitaires. La présence de la protéine PB1-F2 recombinante dans le milieu extracellulaire ne suffit pas à induire l'activation de NLRP3, un « amorçage » par l'ajout de lipopolysaccharides est nécessaire [508,534]. Cela suggère que PB1-F2 n'initie pas l'activation de NLRP3 mais contribue à l'amplification du phénomène dans un contexte de stress cellulaire.

Il est important de noter que la localisation intra ou extracellulaire de PB1-F2 conditionne l'action de la protéine. En effet, récemment, l'infection de macrophages avec des virus H5N1 et H3N2 a permis d'identifier un effet opposé de PB1-F2, inhibant alors l'activité de NLRP3 [535]. Les auteurs proposent que PB1-F2 inhibe l'interaction entre NLRP3 et la kinase NEK7, évènement nécessaire à l'oligomérisation de l'inflammasome. Une inhibition de NLRP3 a également été observée lors de l'expression intracellulaire de la protéine PB1-F2 du virus PR8 et d'une souche H7N9 [511,536].

L'ensemble de ces informations suggèrent une cinétique d'action de la protéine PB1-F2 en cellules immunitaires. Premièrement, la protéine PB1-F2 exprimée au cours du cycle viral inhibe l'activation de l'inflammasome NLRP3 au sein des macrophages alvéolaires. Elle favorise de plus leur mort par apoptose. Ces cellules ne seraient ainsi plus en mesure d'exercer leur rôle de phagocytes ni d'appuyer les cellules épithéliales dans la synthèse de cytokines et chimiokines afin d'alerter l'organisme. Cela pourrait ainsi argumenter le délai induit par PB1-F2 dans l'initiation de la réponse immunitaire parfois observé *in vivo* [500–502,537]. Dans un second temps, les protéines PB1-F2 libérées dans l'espace extracellulaire vont, au contraire, favoriser la réponse inflammatoire *via* l'inflammasome NLRP3. Cela souligne la dualité de la protéine PB1-F2 qui promeut la mort et le recrutement de cellules immunitaires selon le contexte.

1.4.4.2.c Relation structure-fonction

La diversité qui caractérise PB1-F2 au niveau de sa séquence et de ses fonctions est également retrouvée à l'échelle de sa structure. Les premiers travaux s'attachant à caractériser la structure de PB1-F2 ont utilisé pour modèle des peptides synthétiques basés sur la séquence de la souche PR8. Dans un milieu aqueux, PB1-F2 présente une structure aléatoire désordonnée propice à la formation d'oligomères [538]. Des ponts disulfure formés par le résidu cystéine en position 42 permettraient l'oligomérisation de PB1-F2. Cependant, une interaction entre les régions N et C-terminales et la protéine a également été observée indépendamment de cette cystéine. A l'inverse, dans un solvant organique mimant un environnement membranaire compte tenu de sa nature amphiphile, le trifluoroéthanol (TFE), des structures secondaires se forment, limitant les assemblages de PB1-F2. Les auteurs proposent un modèle où PB1-F2 présenterait une hélice α importante en région C-terminale et deux petites hélices α adjacentes en région N-terminale. Cependant, si le domaine C-terminal présente une forte propension à former une telle structure, le domaine N-terminal serait principalement désordonné car sa capacité à former des hélices α est réduite. Par ailleurs, l'hélice α en région C-terminale présenterait une organisation particulière : les résidus cationiques et hydrophobes seraient

concentrés sur des faces opposées de l'hélice. En conséquence, cela permettrait à PB1-F2 d'interagir avec les membranes chargées négativement.

Par la suite, une étude s'est attachée à caractériser la structure de PB1-F2 en se basant sur un panel de protéines recombinantes diversifié (issues de souches d'origine humaine et aviaire). La structure aléatoire en milieu aqueux ainsi que la formation d'hélices α en présence de TFE ont été confirmées. Toutefois, dans d'autres milieux mimant un environnement membranaire - acétonitrile, SDS, présence de liposomes - la formation de feuillets β a également pu être identifiée [539]. La proportion de feuillets β la plus importante a été observée avec la PB1-F2 issue d'une souche H5N1 et la plus faible avec la souche PR8. Par ailleurs, les différentes protéines PB1-F2 étudiées sont présentes sous forme monomérique dans du TFE alors qu'elles s'oligomérisent dans de l'acétonitrile ou en présence de SDS. Dans le dernier cas, la formation de fibres amyloïdes a pu être observée, en lien avec l'adoption d'une structure secondaire en feuillets β (Figure 27). PB1-F2 peut également s'organiser sous la forme d'oligomères amorphes [540].

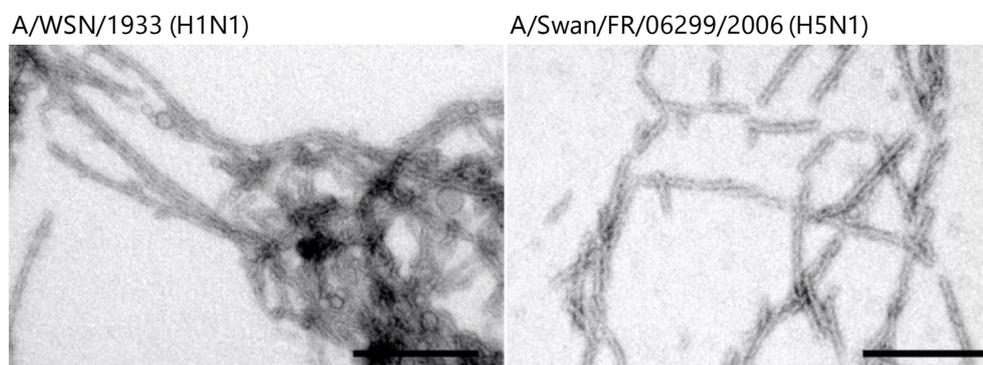


Figure 27 : fibres amyloïdes de PB1-F2.

Observation au microscope électronique de fibres formées par la protéine PB1-F2 du virus WSN ou d'un virus H5N1 en présence de 0,01% de SDS. Barres = 200 nm. Adapté de [539].

La structure de PB1-F2 évolue au cours de l'infection : monomérique lors des premières phases, elle s'accumule ensuite sous forme d'oligomères- β solubles [524,541]. Ce changement de conformation pourrait justifier le fait que l'expression de PB1-F2 n'est plus détectée à des temps post-infection tardifs, les anticorps utilisés ne reconnaissant pas les formes oligomérisées de PB1-F2. L'agrégation de PB1-F2 sous forme de fibres amyloïdes a été associée à des propriétés fonctionnelles. En effet, à l'inverse des oligomères amorphes insolubles, la présence de certaines formes fibrillées dans le milieu de culture de cellules épithéliales et monocytes est cytotoxique [540]. Cependant, il est importante de noter que la formation de fibres amyloïdes en contexte infectieux semble ne se produire qu'en monocytes [539,542]. Cela peut être relié au fait que PB1-F2 présente une fonction pro-apoptotique en cellules immunitaires mais pas de façon consensuelle en cellules épithéliales. De plus, l'activation de l'inflammasome NLRP3 par PB1-F2 semble être propre à des formes de poids moléculaire élevé [534]. Ainsi, à l'instar des fibres amyloïdes A β [368], la forme agrégée de PB1-F2 sous forme de fibres amyloïdes pourrait constituer un signal d'activation extracellulaire de NLRP3.

En résumé, les propriétés variables de PB1-F2 pourraient être le reflet de la diversité de structure de la protéine, qui adopte des conformations différentes en fonction de son

environnement.

1.4.5 PB1-F2 favorise les surinfections bactériennes

Comme cela a été évoqué précédemment, le développement d'une surinfection bactérienne constitue un facteur de risque important et est fréquemment observé chez les patients présentant une forme sévère d'infection. Ce point a été particulièrement critique dans le cas de la grippe espagnole. Des analyses anatomopathologiques ont en effet indiqué que la majorité des décès avait pour origine une - voire des - surinfection(s) bactérienne(s) [543]. De façon intéressante, la protéine PB1-F2 favorise ce phénomène. Un modèle d'infection de souris avec la souche PR8, WT ou son homologue Δ F2 incapable d'exprimer PB1-F2, suivi par une seconde infection par un pneumocoque a été développé. Cela a permis d'observer que l'expression de PB1-F2 favorise une surinfection bactérienne [544]. De plus, en mutant les acides aminés différents entre les PB1-F2 PR8 et H1N1 1918 au sein du segment PB1 du virus PR8, les auteurs ont observé que la colonisation bactérienne du tissu pulmonaire est amplifiée dans le cas de la PB1-F2 1918.

Hors contexte infectieux, l'instillation du domaine C-terminal de la protéine PB1-F2 de la souche PR8 favorise également une colonisation bactérienne chez la souris [544]. *A contrario*, le domaine N-terminal n'a aucun effet sur la sensibilité des animaux au pneumocoque. De plus, une étude a permis d'identifier que le motif cytotoxique I68, L69, V70 porté par la PB1-F2 de la souche PR8 constitue un élément déterminant la contribution de la protéine au développement d'une surinfection bactérienne [506]. Enfin, le motif pro-inflammatoire 62L, 75R, 79R, 82L identifié chez les virus H3N2 a également été associé à une colonisation bactérienne plus importante [503].

Les études évoqués précédemment sont toutefois descriptives et, actuellement, les mécanismes par lesquels PB1-F2 contribue au développement d'une surinfection bactérienne n'ont pas été démontrés. Par ailleurs, ce phénomène n'a pas été étudié chez un hôte aviaire.

1.4.6 Bilan des propriétés de PB1-F2

Compte tenu de l'importante variabilité inter-souche des fonctions de PB1-F2, il est délicat de dresser un schéma général des propriétés de cette protéine. Un modèle résumant les modes d'action principaux est proposé en Figure 28. Il semble important de retenir que PB1-F2 interfère avec les voies cellulaires de la réponse immunitaire innée, bien que le sens des régulations et le point post-infection auquel s'exerce les fonctions de PB1-F2 soient variables.

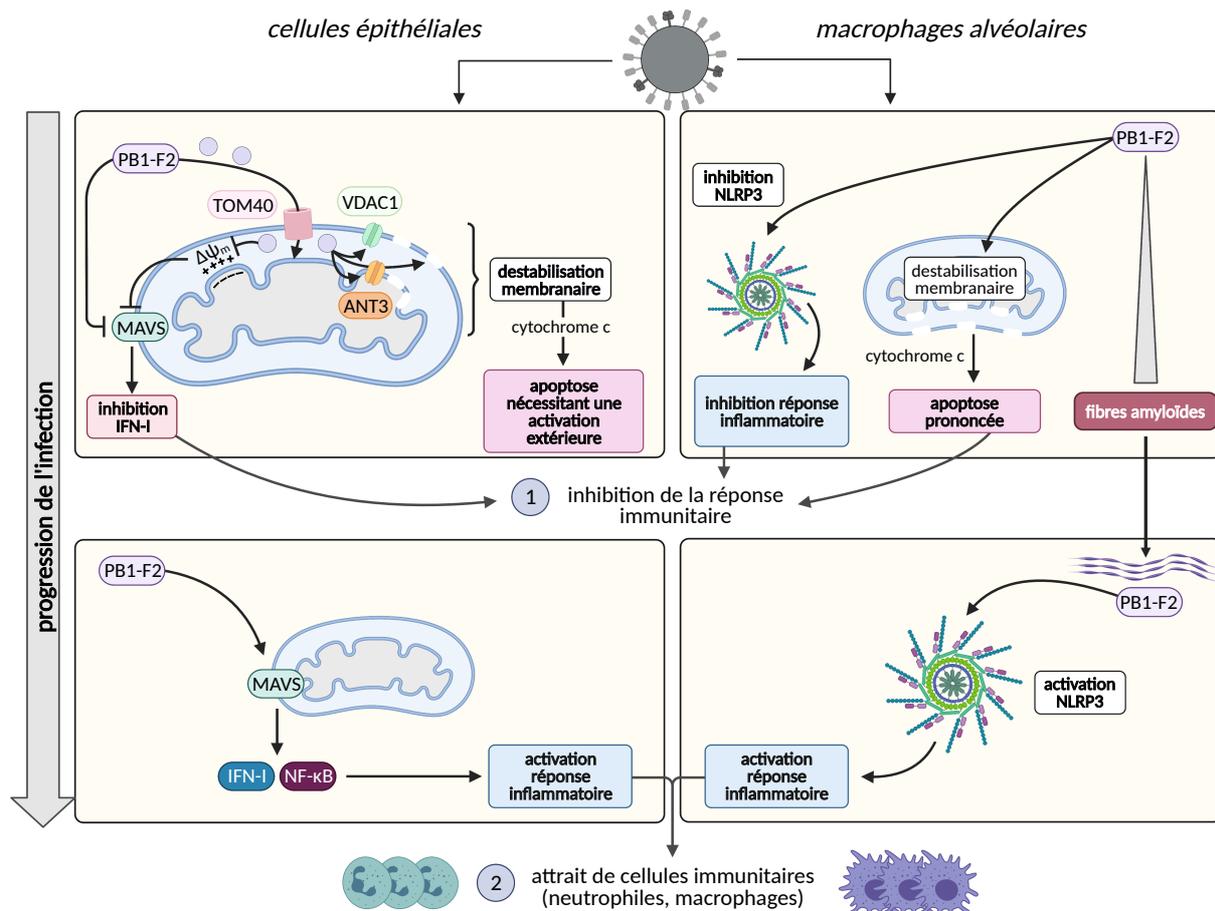


Figure 28 : bilan schématique des actions de PB1-F2 sur le fonctionnement cellulaire.

Au cours de ce projet de thèse, les modèles développés se sont basés sur les protéines PB1-F2 exprimées par les virus A/Turkey/Italy/977/1999 (H7N1 LPAI) et A/Scotland/20/1974 (H3N2). Un alignement de ces deux protéines est présenté en Figure 29. Les deux séquences peptidiques sont relativement similaires, un taux d'identité de 77,8% étant observé. Pour exemple, ce taux chute à 56% lors du comparatif entre la PB1-F2 d'un autre virus H3N2 saisonnier (A/Taiwan/220/2004) et aviaire LPAI (A/chicken/Vietnam/HU1-1050/2014 (H9N2)). La position des principaux motifs peptidiques associés à une action de PB1-F2 sur la pathogénicité est également identifiée. Les deux PB1-F2 étudiées ne portent aucune des formes complètes de ces motifs. Toutefois, la protéine exprimée par le virus H3N2 Scotland arbore trois résidus sur quatre du motif pro-inflammatoire identifié chez les souches H3N2 (LHRL plutôt que LRRL). Cela suggère que cette PB1-F2 pourrait présenter une fonction pro-inflammatoire plus prononcée que celle observée avec d'autres virus saisonniers.

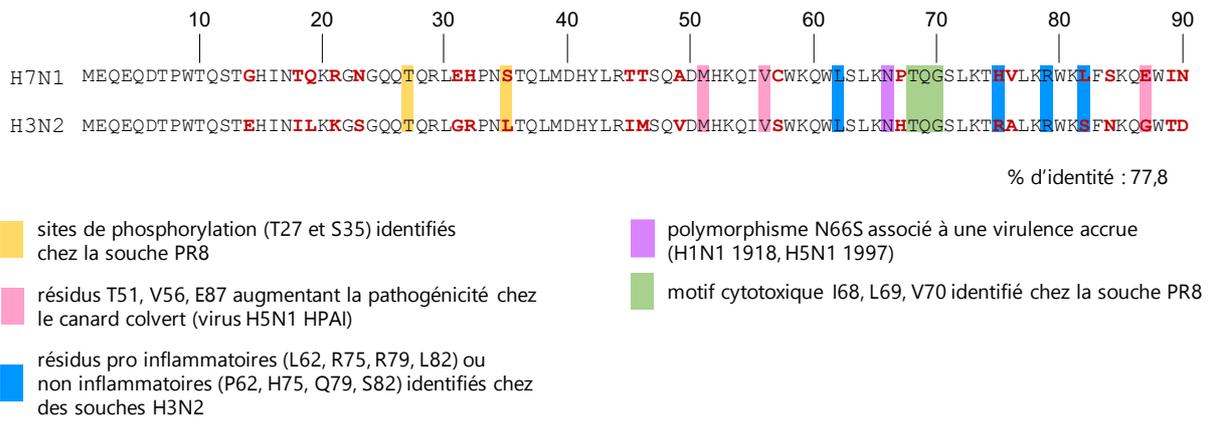


Figure 29 : comparatif des protéines PB1-F2 de l'étude.

Les acides aminés colorés en rouge identifient les résidus variant entre les PB1-F2 exprimées par les virus A/Turkey/Italy/977/1999 (H7N1) et A/Scotland/20/1974 (H3N2).

2. Problématique & objectifs

La gestion des virus influenza constitue une problématique importante en matière de santé publique. Sur la période 1995-2015 et à l'échelle mondiale, les virus saisonniers ont été à l'origine de 290 000 à 645 000 décès annuels. Les virus influenza A (IAV) possèdent un large spectre d'hôtes au sein duquel des franchissements de la barrière d'espèce et des réassortiments de matériel génétique viral surviennent. Ces phénomènes sont favorables à l'émergence de virus inédits chez l'Homme et présentant un potentiel pathogène et pandémique préoccupant.

La protéine PB1-F2 est un facteur de virulence des IAV chez les mammifères, notamment compte tenu de son exacerbation de la réponse inflammatoire. La majorité des études conduites se sont premièrement appuyées sur la protéine issue de la souche H1N1 PR8. Les résultats obtenus avec ce modèle sont cependant difficilement généralisables à l'ensemble des PB1-F2 existantes et, suite à l'élargissement du panel de souches de PB1-F2 étudiées, certaines propriétés définies ont été sujettes à controverses. Notamment, dans le cas des souches aviaires, un rôle atténuateur de la virulence a plutôt été identifié. Ces observations sont appuyées par un polymorphisme important. Si l'expression d'une PB1-F2 fonctionnelle est majoritairement conservée chez les espèces aviaires, cette tendance s'inverse chez l'Homme, particulièrement dans le cas des sous-types H1N1. Ces éléments suggèrent ainsi un rôle de PB1-F2 dans l'adaptation d'une souche virale à son hôte.

De 1997 à 2013, les souches virales aviaires transmises à l'Homme appartenaient majoritairement au sous-type H5N1 HPAI. En 2013, un virus H7N9 LPAI a émergé en Asie et a causé à ce jour le plus grand nombre de cas d'infections humaines. La circulation à bas bruit des virus LPAI dans les élevages avicoles complexifie la gestion du risque associé. Par ailleurs, les virus LPAI fournissent régulièrement des segments viraux au cours des réassortiments. Notamment, dans le cas des virus pandémiques H2N2 1957 et H3N2 1968, émergés suite à un réassortiment virus aviaire/mammifère. Le segment PB1 sélectionné a été celui issu du virus aviaire, probablement LPAI. Cela souligne ainsi la compatibilité d'un segment aviaire PB1 au sein d'un génome viral d'origine humaine. Outre l'impact sur l'activité polymérase du virus, l'apport d'un segment 2 aviaire implique également une expression de la protéine PB1-F2 aviaire au sein d'un hôte mammifère.

L'ensemble des éléments de contexte précédents nous ont conduit à construire un projet visant à caractériser les propriétés des protéines PB1-F2 issues d'une souche aviaire et humaine chez leur hôte natif respectif ainsi que dans un contexte de franchissement de la barrière d'espèce ou de virus réassortant pour la PB1-F2 aviaire. Le but de ce projet est donc d'améliorer les connaissances relatives aux déterminants de la pathologie des virus influenza à la lumière des modulations de la virulence médiées par PB1-F2. Nous avons émis l'hypothèse que la modulation de la réponse de l'hôte médiée par PB1-F2 contribue à l'adaptation d'une souche virale à son hôte. Les objectifs de ce projet de thèse se sont décomposés en deux axes.

Le premier objectif fixé a été la caractérisation des modulations de la réponse de l'hôte induites par la protéine PB1-F2 à la fois en modèles cellulaires et murin. Un virus H3N2 a été

choisi comme modèle de virus humain car les sous-types H3N2 expriment majoritairement une protéine PB1-F2 fonctionnelle, contrairement aux sous-types H1N1. Un virus H3N2 est ainsi plus représentatif des souches exprimant naturellement PB1-F2. Un virus H7N1 LPAI a été choisi comme modèle de virus aviaire car la très grande majorité des caractérisations de protéines PB1-F2 d'origine aviaire ont été réalisées à partir de virus HPAI. Utiliser un virus LPAI permettait d'apporter des informations différentes et complémentaires des travaux déjà produits. Les virus LPAI constituent un risque pour l'Homme car des contaminations humaines avec ces virus sont régulièrement recensées. De plus, la surveillance de la circulation des virus LPAI en élevage est délicate compte tenu de l'absence de signes cliniques évidents. Nous avons produit les virus H3N2 et H7N1 incapables d'exprimer PB1-F2 ($\Delta F2$). Nous avons également produit un virus chimérique H3N2/H7N1 en remplaçant uniquement le segment 2 natif du virus H3N2 par celui H7N1 (noté C PB1) et sa version $\Delta F2$ (C PB1 $\Delta F2$).

Identifier les interactants d'une protéine offre la possibilité d'appréhender les voies cellulaires modifiées par la protéine considérée et donc la conséquence globale de son expression sur le fonctionnement cellulaire. Nous avons émis l'hypothèse que la variabilité des fonctions de PB1-F2 était le reflet d'interactomes différentiels. Dans un second temps, nous avons ainsi cherché à définir les interactomes des PB1-F2 étudiées afin d'apporter une précision mécanistique aux modulations de la réponse de l'hôte étudiées lors du premier volet du projet. Techniquement, nous avons opté pour une méthode relativement récente qui s'appuie sur une biotine ligase (BioID2). La fusion de BioID2 à PB1-F2 conduit à la biotinylation des protéines situées à proximité du complexe et sont alors assimilées à des interacteurs potentiels de PB1-F2. L'objectif a été de définir l'interactome de la protéine PB1-F2 issue du virus H7N1 en cellules épithéliales pulmonaires aviaires et de le comparer avec celui des PB1-F2 H7N1 et H3N2 au sein du modèle cellulaire humain équivalent. En s'appuyant sur la comparaison de ces trois interactomes, nous avons souhaité identifier les fonctions partagées des protéines PB1-F2 étudiées ou au contraire celles spécifiques à une souche virale et/ou un hôte considéré.

3. Matériels et méthodes

3.1 Culture des lignées cellulaires

Les lignées cellulaires 293T, A549 et MDCK ont été achetées à l'organisme ATCC (American Type Culture Collection). La lignée CLEC213 a été immortalisée par l'équipe I3M [545] (UMR ISP, INRAE) et transmise par le Dr Pascale Quéré. La lignée BEAS-2B est un don du Dr Mustapha Si-Tahar (équipe Infection respiratoire & Immunité, Inserm U1100). La lignée DF1 est un don du Dr Romain Volmer (équipe IHAP, UMR 1225 INP ENVT-INRAE). Les cellules 293T et A549 ont été cultivées en milieu DMEM à 37°C. Les cellules BEAS-2B, DF1, et CLEC213 ont été cultivées en milieu DMEM F-12 à 37°C pour les deux premiers types et à 41°C pour le troisième cité. Les cellules MDCK ont été cultivées en milieu MEM à 37°C. Tous les types cellulaires ont été incubés dans une atmosphère régulée à 5% de CO₂. Les milieux de culture utilisés ont été supplémentés avec 10% de SVF non décomplémenté, 2 mM de L-glutamine, 100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Par la suite, l'appellation « milieu complet » désignera un milieu de culture supplémenté avec de la L-glutamine, de la pénicilline/streptomycine et du SVF non décomplémenté.

3.2 Production des virus de l'étude

3.2.1 Génétique inverse

Les virus inclus dans l'étude ont été produits par génétique inverse *via* un système composé de 8 plasmides pRF483, chacun codant un segment du génome viral. Ce plasmide est un dérivé du pHW200 et permet une transcription bidirectionnelle [546]. En effet, l'unité de transcription de l'ARN polymérase 1 au sein de laquelle est insérée l'ADNc viral est flanquée par un promoteur de l'ARN polymérase 2 et un signal de polyadénylation (Figure 30). La coexpression des 8 plasmides permet donc la production de particules virales par la synthèse de l'ensemble des ARN viraux et messagers codant les protéines virales.

Le système de génétique inverse de la souche A/Turkey/Italy/977/1999 (H7N1) a été construit par l'équipe IHAP (UMR 1225 INP ENVT-INRAE) et nous a été fourni par le Dr Mariette Ducatez. Le système de génétique inverse a été développé à partir d'une souche LPAI prélevée sur une dinde lors des épizooties qui ont touché le nord de l'Italie en 1999. Le système de génétique inverse de la souche A/Scotland/20/1974 (H3N2) a été réalisé au sein de notre équipe par le Dr Bruno Da Costa. Il s'agit d'un virus isolé chez l'Homme et murinisé. Le système de génétique inverse a été développé à partir d'un isolat fourni par l'institut Pasteur.

Les plasmides codant PB1 n'exprimant pas la protéine PB1-F2 ont été obtenus en mutant dans l'ORF de PB1-F2 la sérine 12 (TCA) en codon stop (TAA). Cette mutation, silencieuse pour PB1, a été réalisée à l'aide du kit de mutagenèse dirigée Quickchange (Agilent Technologies). Elle permet d'annihiler l'expression d'une PB1-F2 fonctionnelle sans perturber celle des autres protéines codées par le segment 2 (PB1 et PB1-N40). La persistance de la

mutation introduite au sein du stock viral a été vérifiée par séquençage du segment d'ADNc obtenu après extraction de l'ARN viral issu de cellules infectées suivie d'une rétrotranscription spécifique au segment PB1.

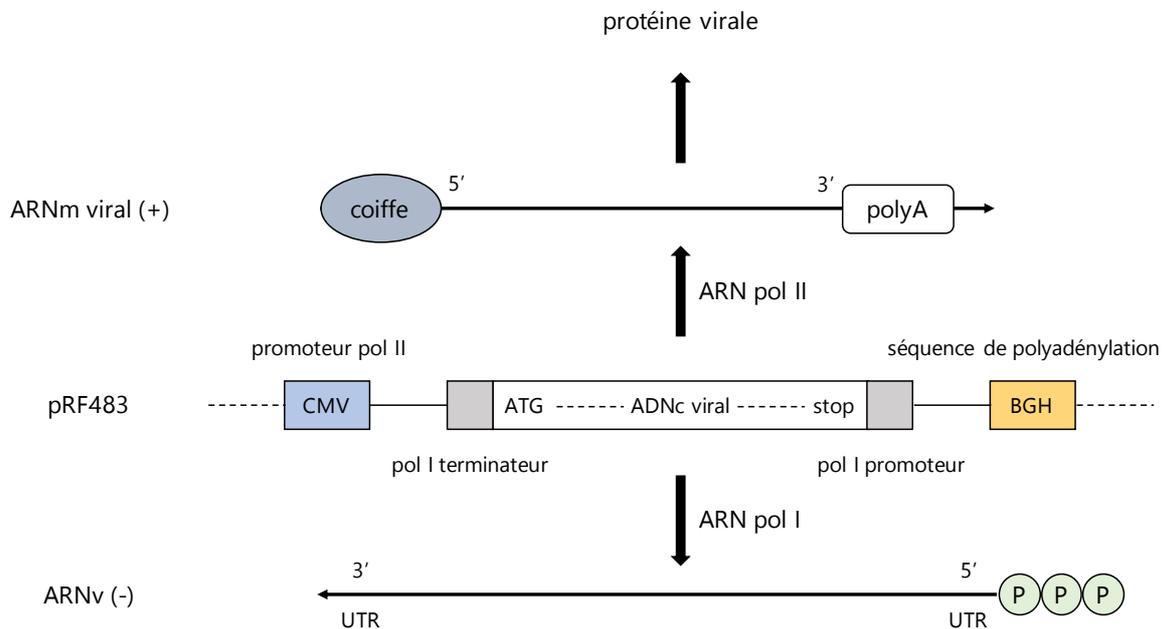


Figure 30 : production de virus à partir du plasmide pRF483 à transcription bidirectionnelle. Adapté de [546].

A J0, des plaques de 6 puits ont été ensemencées avec une co-culture de cellules 293T et MDCK, respectivement 0,7 et 0,3.10⁶ cellules par puits dans du milieu DMEM complet. Puis, à J1, les cellules ont été transfectées avec un mélange contenant les 8 plasmides de génétique inverse (0,5 µg ADN/segment). Les plasmides ont été homogénéisés dans du milieu OptiMEM à une concentration de 0,02 µg ADN/µl. Le FuGENE HD (Promega #E2311) a été utilisé comme agent de transfection avec un ratio de 3 µl pour 1 µg d'ADN. Le mélange de transfection a été incubé durant 15 min à température ambiante (TA) puis versé au goutte-à-goutte sur toute la surface du puits. A J2, le milieu de culture a été remplacé par du milieu sans SFV et supplémenté en trypsine traitée à la TPCK (Worthington #LS003740, 1 µg/ml). Le surnageant de culture a été reporté à J3 sur des cellules MDCK ensemencées en plaque de 6 puits (1.10⁶ cellules/puits) et cultivées en milieu MEM supplémenté avec 1 µg/ml de trypsine (Worthington). Le surnageant de culture a été prélevé lorsqu'un effet cytopathogène (ECP) était observable puis clarifié par une centrifugation à 4000g durant 10 min à 4°C et enfin aliquoté pour conservation à -80°C. Un deuxième report sur MDCK du surnageant de co-culture a éventuellement été effectué dans le cas où un ECP ne serait pas survenu 48 heures après le report n°1.

3.2.2 Construction de virus encodant la nanoluciférase

La production de virus dont le génome inclut la nanoluciférase (virus nanoluc) a été permise grâce aux travaux de l'équipe du Dr Andrew Mehle. A partir de la souche A/WSN/1933 (H1N1), son équipe a construit un segment 3 encodant la nanoluciférase dont l'insertion

n'impacte pas la capacité répliquative du virus généré [547]. L'organisation de la construction qui nous a été transmise est schématisée dans la Figure 31. Un peptide 2A autoclivant [548] permet de séparer les protéines fusionnées afin de ne pas compromettre les fonctions de PA. De plus, l'empaquetage du segment 3 n'est pas régi uniquement par les régions non transcrites (UTR) situées aux extrémités 5' et 3' de l'ARNv. En effet, une partie des séquences de l'ORF immédiatement adjacentes aux UTR est également requise [549–551]. Notamment, les 40 derniers nucléotides de l'ORF sont, au minimum, nécessaires au processus [551]. En conséquence, les 50 derniers nucléotides de la séquence codant PA ont été répétés en aval de celle codant la nanoluciférase afin de restaurer une continuité entre les éléments nécessaires à l'empaquetage du segment. Suggérant que cette redondance pouvait être néfaste pour la stabilité de la construction, l'équipe de Dr Mehle a choisi d'introduire des mutations silencieuses à la fin de la séquence du gène PA, au sein des 50 nucléotides répétés. Cette région est ainsi nommée « codon swap ».

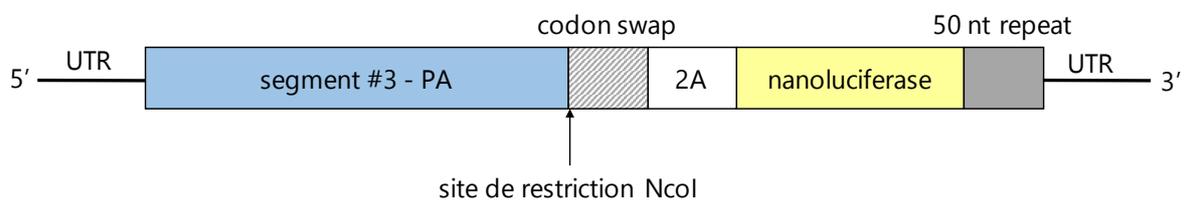


Figure 31 : schéma de la construction PA-nanoluc.

Nous avons transposé cette construction au sein des vecteurs pRF483 PA H7N1 et H3N2. Pour cela, le site NcoI faisant la jonction entre la séquence codant la protéine PA et celle codant le codon swap a été généré par une mutation silencieuse : le codon CCC_TGG (proline-leucine) devenant CCA_TGG. Par ailleurs, le vecteur pRF483 possède un site de restriction NcoI qui a donc été substitué par mutagenèse dirigée également. Nous avons inséré, suite à une digestion unique par l'enzyme NcoI, la séquence codant le bloc codon swap-peptide 2A-nanoluciférase. Les 50 nucléotides répétés pour garantir l'empaquetage du segment proviennent ainsi de la séquence propre du gène PA considéré. La séquence insérée a été amplifiée à partir du vecteur fourni par l'équipe du Dr Mehle (amorce sens 5'-CACGGGCCATGGGTTCTGCTGAACGCTAGCTGGTTAATA-3' et antisens 5'-TTTAAACCATGGCTACGCCAGAATGCGTTCGCACAGCCGC-3', le site de restriction étant dans les deux cas NcoI).

3.3 Infections des lignées cellulaires

Les cellules ont étéensemencées dans du milieu complet à J0 de façon à ce qu'elles soient confluentes lors de l'infection réalisée 24 heures plus tard. Pour la suite des étapes, les milieux utilisés n'étaient plus supplémentés avec du SVF car celui-ci inhibe l'infection virale. A J1, les cellules ont été premièrement rincées trois fois avec du milieu puis incubées durant 2 heures au contact de l'inoculum viral. Ce dernier a été préparé dans un volume de milieu réduit afin de favoriser les contacts virus-cellules et les plaques de culture étaient placées sur un agitateur basculant durant cette phase. Enfin, l'inoculum viral a été remplacé par du milieu neuf

et les cellules ont été maintenues jusqu'au temps indiqué. Lorsque que la MOI (« multiplicity of infection » i.e. nombre de particules virales par cellule) appliquée était inférieure à 0,5, le milieu de culture post-infection (pi) a été supplémenté avec de la trypsine traitée à la TPCK (Worthington) selon la concentration indiquée. En effet, dans cette situation, la loi de Poisson estime un taux d'infection inférieur à 50%, la population cellulaire infectée n'est ainsi pas majoritaire. La propagation de l'infection est dépendante des nouveaux virions formés au cours de la première phase d'infection. Or, l'activation des protéines HA des virus utilisés dans cette étude est dépendante de l'ajout de trypsine.

3.4 Amplification des inocula viraux

Les inocula utilisés au cours de cette étude sont issus de l'amplification d'un aliquot conservé du report n°1 ou 2 produit par génétique inverse d'un virus considéré. Pour cela, des flacons de culture cellulaire T25 ont étéensemencés avec 3.10^6 cellules MDCK par flacon dans du milieu complet. Les cellules ont été infectées 24 heures plus tard à une MOI de 0,001 et le milieu post-infection supplémenté avec 1 µg/ml de trypsine. Le surnageant a été récupéré à environ 48 heures pi (selon l'apparition de l'ECP) puis clarifié par une centrifugation à 4000g durant 10 min à 4°C avant d'être aliquoté pour conservation à -80°C.

3.5 Titrage viral

Des plaques de 12 puits ont étéensemencées à raison de $0,45.10^6$ cellules MDCK par puits dans du milieu complet. Les cellules ont été infectées 24 heures plus tard avec des dilutions en série de 10 en 10 du virus à titrer. L'inoculum viral a été remplacé par 2 ml de milieu de titrage composé de MEME 3X (complémenté avec 100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine), de L-glutamine à 2 mM, de bicarbonate de sodium à 0,25%, d'agarose à 0,4% (Bio-Rad #1620100) et de trypsine à 1 µg/ml (Worthington). La texture gélifiée du milieu appliqué obtenue grâce à l'agarose permet de limiter la propagation des virus à un espace en deux dimensions et donc l'apparition de plages de lyse. Au troisième jour post-infection, 1 ml d'une solution de formaldéhyde (Sigma #252549) diluée à 3,7% dans du PBS a été ajouté pour fixer le tapis cellulaire. Après 1 heure d'incubation, cette solution ainsi que le milieu de titrage gélifié ont été retirés puis les tapis cellulaires colorés avec une solution de cristal violet composée de 10% de cristal violet (Sigma #HT90132), 3,7% de formaldéhyde et 20% d'éthanol. Enfin, après rinçages à l'eau, les plages de lyse ont été comptées.

3.6 Cinétiques de réplication virale

3.6.1 Cellules aviaires

Des plaques de 12 puits ont étéensemencées avec $0,6.10^6$ cellules CLEC213 par puits dans du milieu complet. A J1, les cellules ont été infectées à une MOI de 0,01 et le milieu post-

infection a été complétement avec 20 ng/ml de trypsine (Worthington). Aux temps pi indiqués, les surnageants de culture ont été prélevés et les cellules lysées en utilisant le tampon du kit Nano-Glo luciferase assay sytem (Promega #N1110) dilué au demi dans du PBS (200 µl/puits). La mesure de l'activité nanoluciférase a été quantifiée à l'aide d'un appareil Tecan Infinite M200 PRO en engageant 30 µl de lysat additionnés de 30 µl de substrat issu du kit cité précédemment dilué au 5000^{ème} dans du PBS.

3.6.2 Cellules humaines

Des plaques de 24 puits ont étéensemencées avec $0,15 \cdot 10^6$ cellules BEAS-2B par puits dans du milieu complet, puis les infections ont été réalisées à J1. La cinétique de réplication des virus non porteurs de la cassette nanoluciférase a été réalisée en infectant à une MOI de 0,01. Concernant celle des virus nanoluc, une MOI de 0,01 a été appliquée pour les virus de fond génétique H7N1 (WT et $\Delta F2$) et 0,1 pour ceux de fond H3N2 (WT, $\Delta F2$ ainsi que les deux chimères). Dans le cas des deux cinétiques, les milieux post-infection ont été complétement avec 0,25 µg/ml de trypsine (Worthington). Aux temps pi indiqués, les surnageants de culture ont été prélevés et les cellules lysées en utilisant le tampon du kit Nano-Glo luciferase assay sytem (Promega) dilué au demi dans du PBS (100 µl/puits). La mesure de l'activité nanoluciférase quantifiée à l'aide d'un appareil Tecan Infinite M200 PRO en engageant 30 µl de lysat additionnés de 30 µl de substrat issu du kit cité précédemment dilué au 5000^{ème} dans du PBS.

3.7 Usage de rapporteurs luciférase

3.7.1 Étude de l'effet de la co-expression de PB1-F2 et de protéines 14-3-3 sur l'activité NF- κ B et IFN

Afin de tester l'impact de différentes conditions sur l'activité des protéines IFN β et NF- κ B, des plasmides codant la luciférase firefly et dont l'expression est sous le contrôle d'un promoteur activé par l'une des deux protéines ont été utilisés. Le signal bioluminescent généré est rapporté au taux de transfection évalué par la fluorescence de la GFP co-transfectée. Nous supposons qu'une cellule ayant intégré le plasmide rapporteur aura également intégré celui codant la GFP (ainsi que tous les autres plasmides inclus dans la condition testée).

	amorce sens 5' → 3'	amorce antisens 5' → 3'
H7N1	AGTGCTCTCGAGATGGAACAGGAACAGGATACAC site de restriction XhoI	GGGGCCTCTAGATCAGTTTATCCACTCTTGTGGCTG site de restriction XbaI
H3N2		AATCGTGTGCGACTCAGTCTGTCCACCCTTGT site de restriction Sall

Tableau 5 : amorces utilisées pour la construction des vecteurs pCI PB1-F2.

Les constructions pCI PB1-F2 ont été obtenues suite à l'amplification par PCR des ORF respectifs à partir du plasmide pRF483 PB1 correspondant. Les amorces utilisées sont détaillées

dans le Tableau 5. Des plaques de 24 puits ont étéensemencées avec $2,5 \cdot 10^5$ cellules 293T par puits dans du milieu complet, puis les transfections ont été réalisées 24 heures plus tard. Une quantité totale de 0,6 μg d'ADN a été transfectée par puits, l'apport pour chaque type de plasmide étant précisé dans le Tableau 6. Lorsque cela était nécessaire, les quantités de plasmides ont été harmonisées avec un plasmide pCI n'incluant aucun ORF. Le protocole de transfection est présenté en page 74 (3.2.1 Génétique inverse). La polyéthylèneimine (PEI) a été utilisée comme agent de transfection avec un ratio de 3 μl pour 1 μg d'ADN. Les cellules ont été lysées à 40 heures post-transfection dans 60 μl de tampon de lyse (25 mM de Tris pH 8, 10% de glycérol, 1% de Triton X-100, 10 mM de MgCl_2 , 2mM d'EDTA et 1 mM de DTT). La mesure du signal fluorescent produit par la GFP a été réalisée à partir de 30 μl de lysat cellulaire ($\lambda_{\text{excitation}} = 480 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 520 \text{ nm}$) à l'aide d'un appareil Tecan Infinite M200 PRO. L'activité luciférase a été mesurée également à partir de 30 μl de lysat additionnés de 60 μl de substrat (1 mM de DTT, 5 mM d'ATP et 10 μM de D-luciférine (Synchem #S039), solvant = tampon de lyse) à l'aide d'un appareil IVIS 200 (PerkinElmer).

plasmide	quantité transfectée (ng)
pCI GFP	50
pGL3 IFN β -luc protéine humaine, luciférase firefly	100
pNF- κ B-luc (protéine humaine, luciférase firefly)	100
pCI-neo 3xFlag-MDA5 (protéine humaine)	50
pEF-BOS J19 Δ RIG-I protéine humaine constitutivement active	50
pCI PB1-F2 H7N1	300
pCI PB1-F2 H3N2	300
pCS2 HA-YWHAH protéine humaine 14-3-3 η , Addgene #116887	100
pcDNA3.1 YWHAE-HA protéine humaine 14-3-3 ϵ , Addgene #48797	100

Tableau 6 : détail des plasmides utilisés dans les expériences rapporteurs luciférase.

3.7.2 Évaluation de l'activité IFN sur cellules infectées

Des plaques de 24 puits ont étéensemencées avec $8 \cdot 10^4$ cellules BEAS-2B par puits dans du milieu complet, puis les transfections ont été réalisées 24 heures plus tard. Une quantité totale de 0,5 μg d'ADN a été transfectée par puits divisée entre les deux plasmides suivants : pGL3 IFN β -luc (0,3 μg) décrit précédemment et pCMV mCherry (0,2 μg). Le signal fluorescent produit par la mCherry permet de rapporter le signal luciférase généré au taux de transfection. Le protocole de transfection est présenté en page 74 (3.2.1 Génétique inverse). Le FuGENE HD (Promega) a été utilisé comme agent de transfection avec un ratio de 4 μl pour 1 μg d'ADN. Les cellules ont été infectées à 24 heures post-transfection à une MOI de 1 et enfin lysées à 16 heures pi dans 100 μl de PLB (« passive lysis buffer », 1 M de Tris pH 7,9 ; 1 M de MgCl_2 ; 10% de Triton X-100 ; 20% de glycérol et 1 mM de DTT). Le signal fluorescent produit

par la mCherry a été mesuré à partir de 25 µl de lysat cellulaire ($\lambda_{\text{excitation}} = 580 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 620 \text{ nm}$). L'activité de la luciférase firefly a également été mesurée en engageant 25 µl de lysat additionnés de 50 µl de substrat (1 µM de D-luciférine (Synchem #S039), 1 mM d'ATP et 1 mM de DTT, solvant = PLB). Les deux mesures ont été réalisées à l'aide d'un appareil Tecan Infinite M200 PRO.

3.8 Purification de protéines PB1-F2 recombinantes

Les ORF des protéines PB1-F2 H7N1 et H3N2 ont été clonés dans un vecteur pET-22(b+) (noté pET22) afin de permettre la production en *Escherichia coli* des protéines recombinantes possédant un His-tag en position C-terminale. Les ORF respectifs ont été amplifiés à partir du plasmide pRF483 PB1 correspondant (amorces détaillées dans le Tableau 7).

	amorce sens 5' → 3'	amorce antisens 5' → 3'
H7N1	AGCCCGATCATATGGAACAGGAACAGGATACACC site de restriction NdeI	GGTACGCTCGAGGTTTATCCACTCTTGTTGCTG site de restriction XhoI
H3N2		AATCAGCTCGAGGTCTGTCCACCCTTGTTGTTG site de restriction XhoI

Tableau 7 : amorces utilisées pour la construction des vecteurs pet22-PB1-F2-His-tag.

Des bactéries compétentes BL-21 Rosetta ont été transformées avec les plasmides pET22-PB1-F2-His-tag et cultivées dans du milieu L jusqu'à obtention d'une densité optique comprise entre 0,4 et 0,6 mesurée à 600 nm. L'expression des protéines a été induite par l'ajout d'isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside à 1 mM final puis les cultures bactériennes ont été incubées 4 heures à 37°C sous agitation. Les cultures bactériennes ont été centrifugées à 5000g durant 15 min à 4°C puis les culots bactériens ont été lysés avec un tampon composé de 50 mM de Tris pH 7,5 ; 10 mM d'EDTA et 0,1% de Triton X-100. Après 30 min d'incubation à 37°C et une étape de sonication, les lysats ont été centrifugés à 10 000g durant 30 min à 4°C. Les protéines PB1-F2-His-tag s'accumulent sous forme de corps d'inclusion cytoplasmiques non solubles, ainsi les culots obtenus ont été incubés jusqu'à solubilisation dans un tampon composé de 20 mM de Tris pH 7,4 ; 0,5 M de NaCl ; 5 mM d'Imidazole et 8 M d'urée. Les lysats ont été clarifiés par centrifugation à 10 000g durant 30 min à 4°C. Les surnageants ont ensuite été purifiés par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC). La colonne (HiTrap IMAC) a été préalablement chargée en ions Ni²⁺ et équilibrée avec le tampon de solubilisation avant l'injection des lysats. Un rinçage de la colonne a été effectué (20 mM de Tris pH 7,4 ; 0,5 M de NaCl ; 0,8 M d'Imidazole et 8 M d'urée) puis les protéines fixées à la colonne ont été éluées. Les fractions obtenues ont été analysées par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie. Les fractions d'intérêt ont été soumises à une étape de purification par chromatographie d'exclusion stérique en utilisant une colonne de billes de Sepharose (HiLoad Superdex 200) équilibrée avec un tampon composé de 20 mM de Tris pH 7,4 ; 0,5 M de NaCl et 8 M d'urée. Les fractions obtenues ont été de nouveau analysées par SDS-PAGE et celles pertinentes dessalées à l'aide d'une colonne HiPrep équilibrée avec un tampon contenant 5 mM d'acétate d'ammonium à pH 5. La qualité des protéines PB1-F2 ainsi purifiées a été

analysée une dernière fois par SDS-PAGE avant leur lyophilisation pour conservation à -20°C.

3.9 Évaluation de la capacité de PB1-F2 à fibriller

La propension des protéines PB1-F2 à former des fibres a été évaluée suite à une induction de la fibrillation par l'ajout de SDS. La Thioflavine T (ThT) a été utilisée comme marqueur de la quantité de protéines PB1-F2 présentes sous forme fibrillée. Concrètement, le mélange suivant a été préparé dans un volume total de 100 µl : 5 µM de protéine recombinante (solubilisée dans un tampon d'acétate de sodium 5 mM à pH 5), 25 µM de ThT et 0,01% de SDS (inférieur à la concentration micellaire critique). La mesure du signal fluorescent a été réalisée après 30 min d'incubation à l'aide d'un appareil Tecan Infinite M200 PRO ($\lambda_{\text{excitation}} = 435 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = [450 ; 600] \text{ nm}$).

3.10 Détermination des interactomes par l'approche BioID2

3.10.1 Principe de la méthode

En 2012, une nouvelle approche est venue étayer l'arsenal de techniques disponibles afin d'identifier des partenaires cellulaires protéiques. Développée par le Dr Kyle Roux et son équipe, elle repose sur l'utilisation d'une biotine ligase [552]. La biotine (vitamine H) est un coenzyme synthétisé par les plantes et la plupart des procaryotes. Il est essentiel au fonctionnement métabolique de tous les organismes. Hydrosoluble, la biotine est fonctionnelle après sa fixation par liaison covalente au site actif de certaines carboxylases jouant un rôle important dans diverses voies métaboliques (lipogénèse, glycogénogénèse, synthèse d'acides aminés) [553]. Ces enzymes catalysent le transfert du groupement carboxylate dérivé du CO₂ vers des métabolites cellulaires en s'appuyant sur la biotine comme transporteur [554]. La biotinylation est ainsi une modification post-traductionnelle qui consiste en l'attachement de biotine à une lysine incluse dans un motif tétrapeptidique AMKM spécifique [553]. La réaction se divise en deux étapes détaillées en Figure 32. La biotine ligase catalyse premièrement l'activation de la biotine par fixation d'un groupement AMP. La molécule de biotinoyl-AMP ainsi formée reste liée au site actif de la biotine ligase jusqu'à ce que celle-ci identifie un motif de biotinylation présent sur une carboxylase biotine-dépendante. La fixation de la biotine à la lysine de ce motif est issue d'une substitution nucléophile : l'amine primaire présente sur le carbone ε de la lysine constitue le groupe nucléophile attaquant la fonction anhydride d'acide du biotinoyl-AMP. La biotine restera fixée à la carboxylase tout au long de la durée de vie de l'enzyme [553]. Cette propriété ainsi que la très forte affinité du complexe biotine-streptavidine ($K_D = 10^{-15} \text{ M}$) [555] permettant de purifier efficacement les protéines biotinylées ont suscité un intérêt quant à l'usage d'une biotine ligase en tant que marqueur de partenaires cellulaires.

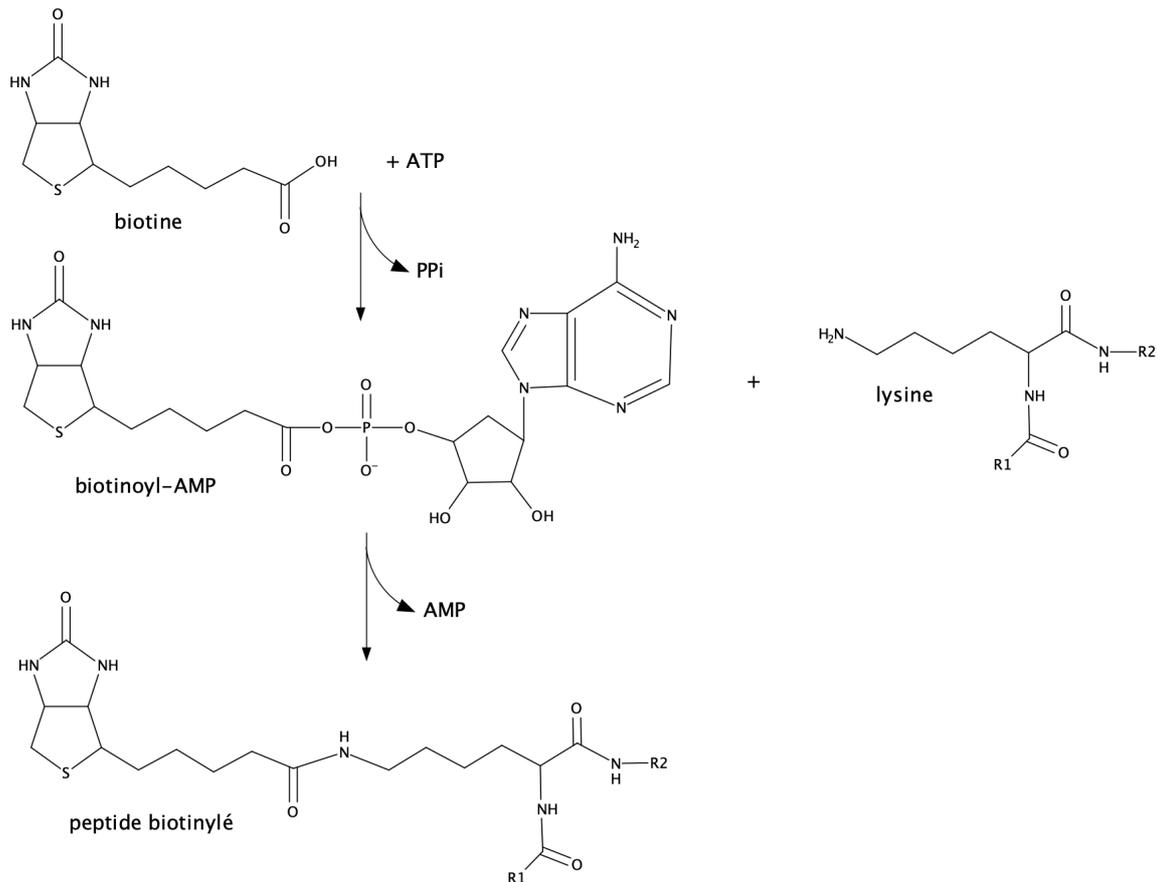


Figure 32 : synthèse organique d'un peptide biotinylé.

Le développement de cette approche s'est appuyé sur une biotine ligase exprimée par la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) nommée BirA. Deux propriétés de cette enzyme ont été identifiées comme obstacle à une utilisation optimale. Premièrement, sa spécificité de réaction inhérente au groupe des biotine ligases, la biotinylation étant en effet un phénomène relativement rare. Seules une et quatre carboxylases porteuses du motif nécessaire ont été identifiées respectivement chez *E. coli* [556] et la souris [557]. De plus, BirA possède un domaine de liaison à l'ADN en extrémité C-terminale [558] lui permettant d'agir comme facteur répresseur de la voie de synthèse biologique de la biotine [559]. Des travaux ont permis l'identification d'une mutation (R118G) au niveau de la boucle d'interaction avec la biotine de BirA se traduisant par une affinité pour le biotinoyl-AMP très réduite [560]. L'application de cette modification réside en la possibilité d'utiliser le mutant (BirA*) en tant que biotinylateur universel. En effet, une affinité moindre pour la forme active de la biotine permettrait sa libération dans l'environnement cellulaire et donc la biotinylation de lysines indépendamment de la reconnaissance du motif spécifique mais selon la proximité de la protéine [560]. L'expression de BioID au sein d'un complexe protéique dont l'organisation structurale est connue a permis d'identifier que les peptides biotinylés se situent dans un rayon d'environ 10 nm autour de l'enzyme [561]. Cependant, cette observation est très empirique et peu robuste, ainsi il ne s'agit pas d'une valeur absolue. Toutefois, une faible distance telle que 10 nm est corroborée par la réactivité de la fonction anhydride d'acide qui, étant facilement hydrolysable, suggère une courte durée de vie du biotinoyl-AMP. L'expression d'une protéine d'intérêt

fusionnée à BioID résulte en la biotinylation des protéines situées dans un environnement très proche du complexe ce qui suggère des interactions avec la protéine étudiée. La mutation R118G citée est également associée à une perte de la capacité d'interaction avec l'ADN [562]. Suite à ces observations, l'usage de BirA* (également nommée BioID) a été mis en pratique dans plusieurs études s'attachant à définir des interactomes [563–567].

Une optimisation de BioID a ensuite été présentée en 2016 [568]. Le Dr Roux et son équipe ont identifié une biotine ligase (BioID2) chez une autre souche de bactérie, *Aquifex aeolicus*, légèrement plus petite que BirA* car elle ne possède naturellement pas de domaine de liaison à l'ADN (27 contre 35 kDa). De la même façon, une mutation a été réalisée au niveau de la boucle d'interaction de BioID2 avec la biotine de façon à perdre la spécificité stricte de biotinylation (R40G). Le rayon de biotinylation est évalué à 10-40 nm, ce qui rejoint l'estimation d'une dizaine de nanomètres proposée pour BioID. Enfin, une efficacité de biotinylation supérieure de BioID2 a été observée. Cette propriété de BioID2 ainsi que sa taille réduite constituent ses atouts envers son prédécesseur. L'usage d'une biotine ligase comme outil d'identification d'interactants offre la possibilité d'une étude cinétique et l'accumulation d'information. En effet, la biotinylation étant permanente, l'identification des protéines marquées retrace l'historique des interactions réalisées au cours de l'expression de la protéine d'intérêt fusionnée à BioID2 et permet ainsi de prendre en considération des interactions transitoires. Cela s'oppose aux approches d'immunoprécipitation plus classiques dans lesquelles seules les protéines interagissant à un instant donné peuvent être analysées. De plus, la très forte affinité biotine-streptavidine annonce une purification des interactants efficace ainsi qu'un bruit de fond réduit. Nous avons donc opté pour cette approche afin de définir l'interactome des protéines PB1-F2.

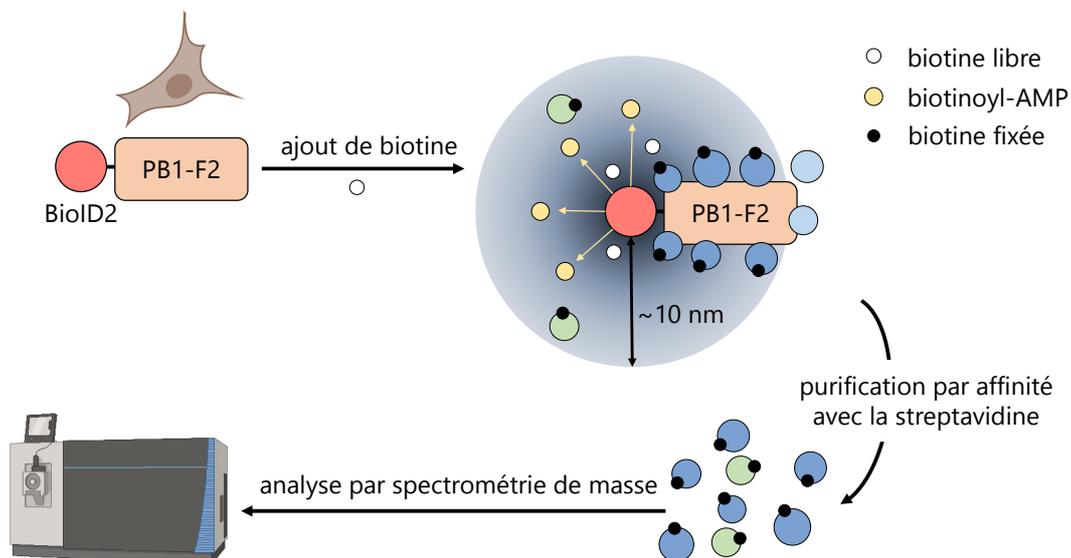


Figure 33 : principe de fonctionnement de l'approche BioID2.

3.10.2 Constructions BioID2

Les ORF des protéines étudiées ont été clonés dans un vecteur pcDNA3.1 BioID2-HA (Addgene #36047). Les amorces utilisées sont précisées dans le Tableau 8 (sites de restriction NheI et BamHI pour les amorces sens et antisens respectivement). L'expression de ces constructions permet ainsi la synthèse de la protéine d'intérêt associée à une cassette BioID2-HA en position C-terminale.

	amorce sens 5' → 3'	amorce antisens 5' → 3'
GFP	TTTAAAGCTAGCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC	GTATTAGGATCCCTTGACAGCTCGTCCATGCCG
H7N1 PB1-F2	AACAGGGCTAGCATGGAACAGGAACAGGATACACC	AGGCCAGGATCCGTTTATCCACTCTGTTTGCTG
H7N1 NS1	TCCTCCGCTAGCATGGATTCCAACACGATAACCTC	AAAGGGGGATCCAACCTCTGACTCAACTCGTCG
H3N2 PB1-F2	GACTCTGCTAGCATGGAACAGGAACAGGATACACC	GACTTCGGATCCGTCTGTCCACCCTGTTTGT
H3N2 NS2	TTGTGCGCTAGCATGGATTCCAACACTGTGTC	AGCGGAGGATCCATCAGCCATCTTATCTCTTCG

Tableau 8 : amorces utilisées pour la construction des vecteurs pcDNA3.1 BioID2-HA.

3.10.3 Immunofluorescence

Des cellules A549 ont étéensemencées dans des plaques de 12 puits dans du milieu complet et sur des lamelles à raison de 4.10^5 cellules par puits. Le milieu de culture a été remplacé 24 heures plus tard par du milieu OptiMEM supplémenté avec de la D-biotine (Sigma #B4639, solubilisée dans du DMSO) à une concentration finale de 50 μ M, puis les transfections ont été réalisées. Une quantité totale de 1 μ g d'ADN a été transfectée par puits. Le protocole de transfection est présenté en page 74 (3.2.1 Génétique inverse). Le FuGENE HD (Promega) a été utilisé comme agent de transfection avec un ratio de 4 μ l pour 1 μ g d'ADN. Vingt-quatre heures post-transfection, le milieu a été remplacé par une solution de formaldéhyde à 3,7% diluée dans du PBS afin de fixer les cellules. Après 15 min d'incubation à TA, les cellules ont été rincées 3 fois avec du PBS puis perméabilisées durant 10 min avec une solution contenant 0,2% de Triton-X100 dilué dans du PBS. Trois rinçages ont été effectués avec du PBS puis les sites non spécifiques saturés par application durant 1 heure d'un tampon composé de 2% de BSA et 0,05% de Tween[®]20, le solvant étant du PBS. Les anticorps utilisés ont été dilués dans le tampon de saturation et incubés durant 2 heures à TA. Leur détail est précisé dans le Tableau 9. Entre chaque étape de marquage, 3 lavages dans un tampon PBS-Tween[®]20 à 0,05% ont été réalisés. Enfin, les cellules ont été rincées 3 fois avec du PBS avant de réaliser le montage des lames en utilisant un milieu contenant du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole, Molecular Probes, #15247528) permettant de marquer les noyaux cellulaires.

anticorps	espèce	référence produit	dilution
anti-HA	lapin	Sigma #H6908	1/100
anti-lapin Alexa Fluor [®] 488	chèvre	abcam #ab150077	1/2000
streptavidine Alexa Fluor [®] 594	-	Molecular Probes [™] #10626153	1/500

Tableau 9 : détail des anticorps utilisés en immunofluorescence.

3.10.4 Purification de protéines biotinylées

Des flacons de culture cellulaire T175 ont étéensemencés avec 13.10^6 cellules A549, 15.10^6 cellules CLEC213 ou 18.10^6 cellules 293T dans du milieu complet. Les transfections ont été réalisées 24 heures plus tard. Une quantité de 50 μg d'ADN a été transfectée par flacon. Le protocole de transfection est présenté en page 74 (3.2.1 Génétique inverse). Le FuGENE HD (Promega) a été utilisé comme agent de transfection avec un ratio de 4 μl pour 1 μg d'ADN. Le milieu de culture a été supplémenté avec de la D-biotine (Sigma, solubilisée dans du DMSO) à une concentration finale de 50 μM . Vingt-quatre heures post-transfection, le milieu de culture a été remplacé par du milieu neuf supplémenté avec 50 μM de D-biotine. Quarante-huit heures post-transfection, les cellules ont été décollées par traitement à la trypsine puis centrifugées à 1200 rpm durant 5 min à TA. Le culot cellulaire a été rincé avec du PBS à 4°C puis centrifugé de nouveau (2200 rpm, 5 min, 4°C). Cette étape a été répétée une seconde fois puis les cellules ont été lysées dans 3,5 ml de tampon de lyse (150 mM de NaCl ; 0,1% de SDS ; 1% d'Igepal ; 0,5% de désoxycholate de sodium ; 1 mM d'EDTA ; 25 mM de Tris pH 7,4 ; 1 mM de DTT et inhibiteurs de protéases). Après une incubation de 10 min à 4°C, les lysats ont été centrifugés à 16 000g durant 30 min à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. Les surnageants ont été prélevés et filtrés à l'aide d'une membrane d'ultrafiltration ayant un poids moléculaire nominal limite de 3 kDa (MERCK #UFC8003) dans le but de concentrer les protéines et éventuellement d'exclure la D-biotine qui serait présente sous forme libre. Les surnageants ont ainsi été placés sur un filtre et centrifugés durant à 5000g durant 45 min et à 4°C. Les éluats obtenus ont été incubés avec 250 μl de billes magnétiques couplées à la streptavidine (Invitrogen™, #11205D) durant toute une nuit à 4°C sous agitation douce afin de purifier les protéines biotinylées de l'extrait total. Les billes ont été préalablement équilibrées par 4 rinçages successifs : 3 avec du PBS et 1 avec du tampon de lyse. Après l'étape de fixation, les billes ont été premièrement rincées avec du SDS à 2%. Un second rinçage a été réalisé avec un tampon composé de 500 mM de NaCl, 1 mM d'EDTA, 1% de Triton-X100, 50 mM d'HEPES et 0,1% de désoxycholate de sodium. Les billes ont ensuite été lavées avec un troisième tampon (300 mM de NaCl ; 1 mM d'EDTA ; 0,5% de désoxycholate ; 0,5% d'Igepal et 10 mM de Tris pH 8). Enfin, trois lavages dans du Tris 50 mM pH 7,4 ont été réalisés. Afin d'éluer les protéines fixées, les billes ont ensuite été reprises dans 30 μl d'un tampon Laemmli 5X (25 mM Tris-HCl ; 192 mM glycine ; 10% SDS ; 25% glycérol et 0,01% bleu de bromophénol) et l'ensemble incubé durant 15 min à 95°C. Les éluats ont été séparés des billes et conservés à -20°C.

3.10.5 Western Blot

Afin d'évaluer le profil des protéines biotinylées purifiées, 10% des éluats ont été séparés par SDS-PAGE sur un gel de polyacrylamide 12% dans le but d'être analysés par Western Blot et coloration au bleu de Coomassie. Dans le premier cas, après la migration, le gel a été incubé pendant 15 min dans le tampon de transfert (25 mM de Tris-HCl ; 192 mM de glycine pH 8,3 ; 20% éthanol) puis électrotransféré sur une membrane de nitrocellulose 0,2 μm

(Bio-Rad #1620112) par application d'une tension électrique de 18 V durant 45 min. La membrane a été saturée durant 1 heure à TA dans du PBS contenant 2% de BSA et 0,05% de Tween®20. La membrane a ensuite été incubée dans du tampon de saturation contenant de la streptavidine couplée à la HRP (Horseradish Peroxidase, abcam #ab7403, dilution 1/5000) durant toute une nuit à 4°C sous agitation douce. La membrane a été rincée 3 fois dans du PBS puis incubée durant 5 min dans la solution Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad #1705060). La chimioluminescence a été acquise à l'aide d'un appareil ChemiDoc (Bio-Rad).

Afin d'évaluer l'expression des constructions BioID2, 40 µg de protéines extraites du lysat total de cellules transfectées avec les différents vecteurs ont été analysés par Western Blot. L'anti-HA cité dans la partie « Immunofluorescence » a été utilisé comme anticorps primaire dilué au millième. Après 3 rinçages de la membrane réalisés avec du PBS, l'anticorps secondaire (anti-lapin HRP, KPL #5450-0010, dilution 1/5000^{ème}) a été incubé durant 2 heures. La mesure de la chimioluminescence a été réalisée comme décrit précédemment.

3.10.6 Analyse par spectrométrie de masse

Les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées en collaboration avec Céline Henry, Lydie Correira et Aaron Millan-Oropeza de la plateforme INRAE - PAPPISO (plateforme d'analyse protéomique de Paris sud-ouest).

3.10.6.1 Digestion des protéines sur gel

Suite à la purification des protéines biotinylées, une migration courte sur gel dénaturant de polyacrylamide commercial (Bio-Rad #4561095) des volumes réservés des éluats a été réalisée afin de concentrer l'ensemble des protéines dans un volume de gel restreint. La position des protéines groupées a été identifiée par coloration au bleu de Coomassie et la bande de gel correspondante découpée afin de réaliser une digestion sur gel des protéines. Le gel a été décoloré par rinçage avec une solution A (10% acide acétique, 40% éthanol) puis B (50% acétonitrile (ACN), 50% bicarbonate d'ammonium), chacune incubée durant 15 min. Cette association de lavages a été réalisée jusqu'à disparition du bleu de Coomassie. Le gel a été ensuite incubé dans une solution d'ACN 100% afin de le déshydrater. Une solution de DTT à 10 mM a été ajoutée afin de réduire les protéines et l'ensemble maintenu à 56°C durant 30 min sous agitation orbitale. L'alkylation a été réalisée par incubation du gel dans une solution de iodoacétamide à 55 mM durant 45 min, à l'obscurité et sous agitation orbitale. Le gel a ensuite été rincé avec la solution B puis déshydraté. La Trypsine Gold (Promega #V5280) a été utilisée afin de digérer les protéines. Le gel a été saturé par incubation sur glace dans une solution contenant 200 ng de trypsine (le solvant étant une solution de bicarbonate d'ammonium à 50 mM). Le volume a été ajusté de façon à couvrir la totalité du gel. Une fois que la totalité de la solution a été absorbée, le gel a été placé à 37°C durant toute une nuit. Puis, 10 µl d'une solution de bicarbonate d'ammonium à 50 mM a été ajoutée. Le surnageant a été prélevé après 10 min d'incubation. Les peptides séquestrés dans le gel ont été extraits

par ajout de 50 µl d'une solution contenant 0,5% d'acide trifluoroacétique (TFA) et 50% d'ACN. Après une incubation de 15 minutes, le surnageant a été prélevé. Enfin, 30 µl d'une solution d'ACN 100% ont été ajoutés sur le gel et le surnageant prélevé une fois le gel déshydraté. L'ensemble des surnageants a été regroupé puis concentré à l'aide d'un évaporateur centrifuge. Les peptides séchés obtenus ont été resuspendus dans une solution contenant 0,1% de TFA et 2% d'ACN.

3.10.6.2 Séparation et détection des peptides par LC-MS/MS

Les peptides ont été séparés par chromatographie en phase liquide. Un système incluant une pré-colonne en dérivation a été utilisé (pré-colonne : ThermoFisher Scientific #163589, colonne : ThermoFisher Scientific #164540). Un flux de 20 µl/min pour la pré-colonne et de 300 nl/min pour la colonne a été appliqué. L'analyse a été conduite à l'aide d'un Orbitrap Fusion Lumos Tribrid (Thermo Scientific) utilisé en tandem avec un analyseur quadripôle. L'ionisation des peptides a été réalisée par électronebulisation (2800 V). Les spectres de masse ont été acquis sur un intervalle allant de 400 à 1500 m/z et avec une résolution de 120 000 (valeur AGC : $5 \cdot 10^5$) (MS1). Les cycles ont été espacés de 3s, intervalle durant lequel les ions les plus abondants ont été fragmentés (MS2) avec une énergie de collision de 30%. Une résolution de 30 000 (valeur AGC : $5 \cdot 10^4$) et une fenêtre d'exclusion dynamique de 80 secondes ont été appliquées. Les peptides identifiés ont été analysés à l'aide du logiciel X! Tandem Alanine (2017.2.1.4) et confrontés aux bases de données UniprotKB_HomoSapiens_sp26314_26032018 pour les échantillons produits en cellules A549 et UniprotKB_G_Gallus_sp2291_04062018 pour ceux produits en cellules CLEC213. Seules les protéines identifiées avec au minimum 2 peptides spécifiques ont été conservées.

3.11 Expériences *in vivo* en modèle murin

3.11.1 Lignées utilisées et infection

Les souris femelles BALB/c ont été achetées au centre d'élevage JANVIER LABS. Les animaux étaient âgés de 8 semaines en début de protocole. Les souris BALB/c NF-κB-luciférase firefly (NF-κB-luc) sont issues de l'élevage conduit à la plate-forme expérimentale d'infectiologie du centre INRAE Île de France (IERP, site de Jouy-en-Josas). Cet élevage a pu être initié grâce au centre d'élevage du CDTA (département de Cryopréservation, Distribution, Typage et Archivage) appartenant à l'unité TAAM (Typage et Archivage des Animaux Modèles) du CNRS. En effet, ce département conserve le sperme d'animaux de la souche C57BL/10SnJ (B10) dont le génome intègre une cassette NF-κB-luc. Le pelage noir des souris B10 étant peu adapté à la mesure de luminescence, des femelles BALB/c ont été croisées avec des mâles B10 NF-κB-luc puis, à la suite de 6 rétrocroisements successifs, une lignée BALB/c NF-κB-luc a été obtenue. Les animaux utilisés étaient âgés de 8 à 14 semaines.

Les protocoles ont été réalisés dans une animalerie confinée de niveau de sécurité biologique 2 (IERP). Les animaux ont été anesthésiés par injection en intra-péritonéale d'un mélange de kétamine/xylazine (60 mg/kg et 12 mg/kg respectivement) puis infectés par l'administration en intra-nasale de 50 μ l d'inoculum viral dilué dans du PBS. Les souris du groupe contrôle ont reçu 50 μ l de PBS seul. Les animaux ont été observés quotidiennement afin de relever les signes cliniques (poids et température). Les points limites des expérimentations ont été fixés à une perte de poids supérieure à 25% du poids initial et/ou une température rectale inférieure à 32°C.

3.11.2 Évaluation de la perméabilité pulmonaire et intestinale

Le réactif FITC-dextran (isothiocyanate de fluorescéine-dextran, Sigma #46944) a été utilisé comme marqueur de la perméabilité pulmonaire et intestinale. Il s'agit d'un polymère d'anhydroglucose de faible poids moléculaire (4 kDa) et n'interagissant pas avec les protéines membranaires, caractéristiques lui permettant de franchir les barrières épithéliales et endothéliales. Le signal fluorescent mesuré dans le sérum des animaux est ainsi corrélé positivement au niveau de perméabilité de l'organe considéré.

Pour étudier la perméabilité pulmonaire, les animaux ont reçu en intra-nasale 50 μ l d'une solution contenant 30 mg de FITC-dextran par kg dilués dans du PBS. Dans le cas de la perméabilité intestinale, 200 μ l incluant 500 mg/kg dilués dans du PBS ont été administrés par gavage. Le sang des animaux a été prélevé au niveau de la veine faciale 1 heure post-traitement pour la sphère respiratoire et 1h30 pour la sphère digestive. Les échantillons ont été centrifugés à 5000 rpm durant 10 min et à 4°C, étape répétée avec le surnageant récupéré afin d'en isoler le sérum. La mesure de fluorescence a été réalisée en engageant 10 μ L de sérum ($\lambda_{\text{excitation}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 528 \text{ nm}$).

3.11.3 Analyse histologiques

Le traitement des échantillons pour analyse histologique a été réalisé en collaboration avec la plateforme INRAE - @BRIDGE (Marthe Vilotte et Julie Rivière).

Le lobe pulmonaire gauche des animaux a été prélevé pour analyse histologique. Les tissus ont été fixés durant 24 heures dans une solution de paraformaldéhyde à 4% diluée dans du PBS, transférés dans l'éthanol à 70% puis stockés à 4°C. Chaque lobe a été inclus en paraffine et des sections de 5 μ m ont été découpées puis une coloration Hémalum-Éosine-Safran a été réalisée. Le niveau d'infiltration cellulaire au sein des tissus a été évalué avec le logiciel Fiji. Les images ont été binarisées, les zones correspondant à des cellules ont ainsi été converties en blanc et les zones lacunaires en noir. Cette dichotomie permet d'identifier et donc de mesurer la surface du tissu occupée par des cellules. Le rapport de cette surface sur celle de tissus totaux indique le taux d'occupation cellulaire et donc le niveau d'infiltration. Les espaces correspondants aux bronchioles ont été exclus car, bien que lacunaires, ils ne sont pas directement concernés par l'infiltration.

3.11.4 Analyse des paramètres respiratoires

L'analyse des cycles respiratoires des souris a été réalisée par pléthysmographie. D'un point de vue sémantique, ce terme regroupe toutes les techniques qui permettent de mesurer des variations de volumes. Nous avons utilisé cette approche sur animaux vigiles. La souris est placée dans une cloche divisée en deux chambres, A et B (Figure 34A). Un flux d'air constant est maintenu à travers la chambre A. Un capteur mesure la différence de pression entre les deux chambres, la B servant de référence car isolée des variations de pression exogènes au système. Toutes les modifications du différentiel sont attribuées aux mouvements respiratoires de l'animal qui perturbent la pression de la chambre A. L'importance des variations de pression et les durées associées permettent de définir les cycles respiratoires de la souris dont un exemple est modélisé en Figure 34B.

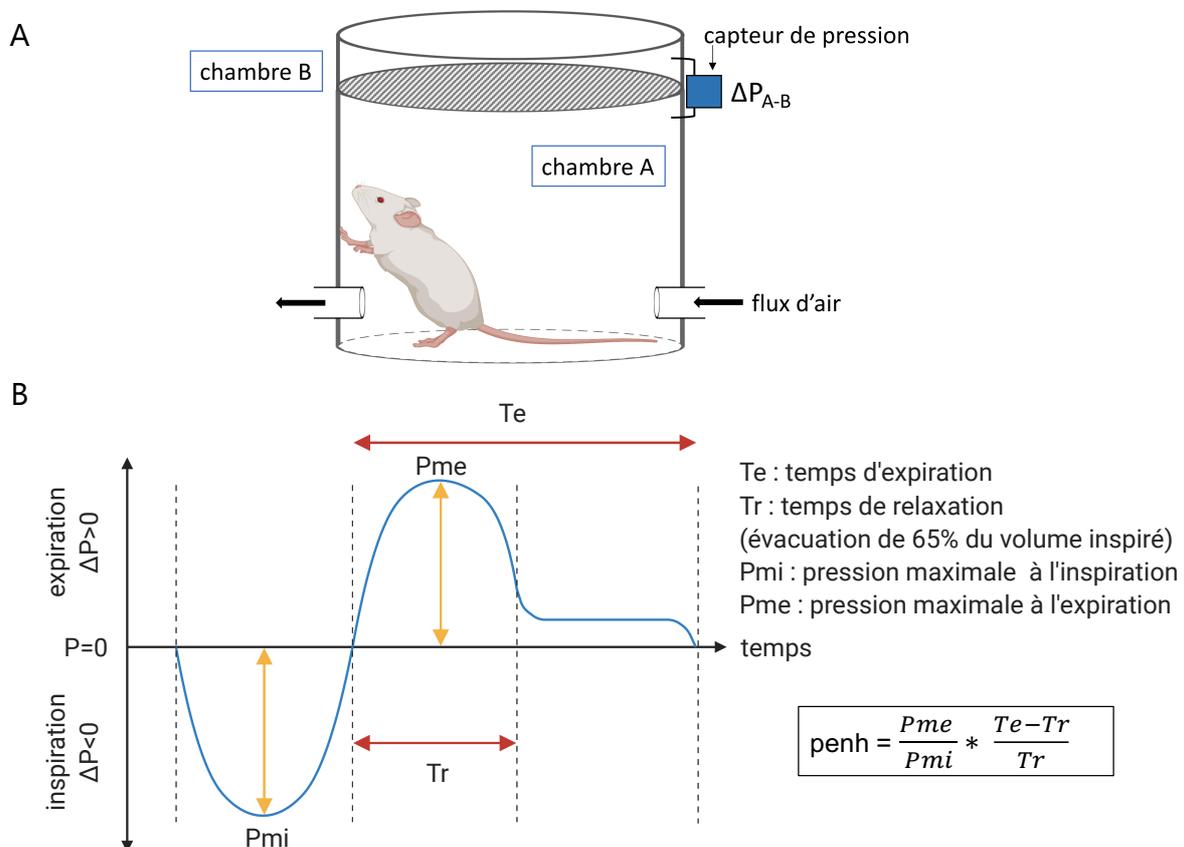


Figure 34 : méthode d'évaluation de paramètres respiratoires chez la souris.

Principe de fonctionnement d'un pléthysmographe [A] et présentation d'un cycle respiratoire ainsi que des paramètres mesurés [B].

La $penh$ est un indicateur déduit à partir de différents paramètres déterminés par les cycles respiratoires. Une diminution de la pression maximale à l'expiration ou une augmentation du temps de relaxation (évacuation de 65% du volume courant) sont deux événements conduisant à une augmentation de la $penh$ et témoignent d'une difficulté à l'expiration. Cette dernière étant passive, un gradient de pression entre l'air atmosphérique et celui intra-alvéolaire est nécessaire. Le recrutement cellulaire lié à l'état inflammatoire du poumon infecté implique une surpopulation cellulaire à l'interface épithélium respiratoire-air

inspiré. Le volume disponible pour accueillir ce dernier au niveau des alvéoles et bronchioles est donc réduit compte tenu de cette obstruction ce qui n'est pas favorable à l'expiration. En conséquence, une difficulté à l'expiration témoigne d'une bronchoconstriction associée au niveau inflammatoire pulmonaire. En ce sens, la penh est donc un indicateur reflétant la détresse respiratoire de l'animal.

L'évaluation des cycles respiratoires a été réalisée à l'aide d'un pléthysmographe (emka technologies). Les souris ont été placées au sein de la chambre adéquate et les mouvements respiratoires ont été suivis jusqu'à ce que l'appareil ait pu discerner au minimum 10 cycles complets. Les paramètres déduits des cycles respiratoires d'un animal correspondent ainsi à la moyenne des résultats issus de 10 mesures minimum.

3.11.5 Mesure de signaux bioluminescents

Les souris ont été anesthésiées par l'inhalation d'un mélange isoflurane/O₂ et les substrats administrés par voie intra-nasale : 50 µl de PBS contenant de la D-luciférine à 10 mM (Synchem #S039, 7 mg/kg) ou de la furimazine (substrat issu du kit Nano-Glo® luciferase assay system (Promega) dilué 1/50) pour les mesures respectives de l'activité luciférase firefly et nanoluciférase. Dans le cas d'une expérience, l'administration du substrat de la luciférase firefly par voie intra-péritonéale a été testée : 150 µl de PBS contenant de la D-luciférine à 10 mM (21 mg/kg) ont été injectés à l'aide d'une seringue tuberculine. Les acquisitions ont été réalisées 1 min après l'injection du substrat à l'aide d'un appareil IVIS 200 (PerkinElmer). L'analyse a été réalisée avec le logiciel associé Living Image qui permet une visualisation du signal luminescent représenté par de fausses couleurs superposées sur la photographie des animaux. Le flux de photons a été quantifié dans des zones d'intérêt puis normalisé par rapport à la surface de celles-ci. Le temps d'acquisition a été défini automatiquement par l'appareil de façon à optimiser le signal bioluminescent.

3.12 Extraction de l'ARN total et analyse par PCR quantitative

3.12.1 Extraction - cultures cellulaires

L'ARN total issu de lignées cellulaires en culture a été extrait en utilisant le kit RNeasy plus kit (QIAGEN #74136). Des plaques de 12 puits ont étéensemencées avec 0,6.10⁶ cellules CLEC213 ou 0,35.10⁶ cellules BEAS-2B par puits. Puis, 24 heures après, les cellules ont été infectées à une MOI de 3. Les cellules ont été lysées à 8 heures post-infection avec 350 µl de tampon RLT complété avec 1% de β-mercaptoéthanol. L'ensemble des étapes du processus d'extraction ont été réalisées à TA. L'ADNg (ADN génomique) présent dans l'échantillon a premièrement été éliminé grâce à une colonne fixant spécifiquement celui-ci (12 000g, 30s). Un volume d'éthanol 70% a été ajouté à l'éluat puis l'ensemble a été homogénéisé et déposé sur une seconde colonne fixant l'ARN (12 000g, 30s). La colonne a été lavée avec 700 µl de tampon RW1 (12 000g, 30s) afin d'éliminer les biomolécules non spécifiques. Les sels

résiduels ont ensuite été éliminés par deux lavages successifs avec 500 µl de tampon RPE (12 000g durant 30s puis 2 min). Enfin, après séchage de la colonne (16 000g, 1 min), l'ARN total a été élué dans 30 µl d'eau RNase-free puis dosé par quantification de l'absorbance à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific) et enfin stocké à -80°C.

3.12.2 Extraction - poumons de souris

Les extractions relatives aux infections de souris NF-κB-luciférase ont impliqué la totalité du lobe gauche des animaux. Les extractions relatives à l'infection de souris BALB/c ont impliqué la totalité du lobe droit des animaux. Les tissus ont été placés dans de la glace carbonique immédiatement après prélèvement puis conservés à -80°C.

Le TRI-REAGENT® a été utilisé comme méthode d'isolation de l'ARN total. Le tissu pulmonaire engagé a été placé dans un tube à vis contenant des billes en céramique (Minéralix #N1100) et 1 ml de TRI-REAGENT®. L'ensemble a été placé dans un homogénéisateur de tissus (Precellys Tissue Homogenizer) dont le cycle programmé était deux fois 15s à 6000 rpm afin de broyer le tissu par collision avec les billes. Après 5 min d'incubation à TA permettant la dissociation des complexes nucléoprotéiques, les billes et les débris cellulaires ont été culottés par centrifugation à 12 000g durant 5 min à 4°C. Le surnageant a été récupéré et additionné de chloroforme (200 µl). Après 15s d'agitation et 15 min d'incubation à TA, l'ensemble a été centrifugé à 15 000g durant 15 min à 4°C. Trois phases sont alors discernables : les ARN se situent dans la phase aqueuse supérieure tandis que les ADN et les protéines dans l'interphase et/ou la phase organique. La phase aqueuse a été récupérée et les ARN précipités par l'ajout d'isopropanol (500 µl). Après mélange au vortex et un temps d'incubation de 10 min à TA, l'ensemble a été centrifugé 10 min à 4°C à 12 000g. Le culot d'ARN obtenu a été lavé deux fois avec de l'éthanol 75% puis séché à l'air libre avant d'être repris dans 200 µl d'eau RNase-free, dosés au NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific) et enfin conservé à -80°C.

3.12.3 Rétrotranscription des ARN

3.12.3.1 Rétrotranscription non spécifique

L'expression des gènes de l'hôte a été évaluée suite à une rétrotranscription non spécifique de l'ARN total extrait à l'aide du kit iScript™ (Bio-Rad #17250). La réaction a été réalisée dans un volume total de 20 µl incluant : 1 µL de transcriptase inverse iScript, 4 µl de tampon iScript contenant notamment des oligonucléotides hexamères aléatoires et 1 µg d'ARN. Le volume a été ajusté avec de l'eau RNase-free. Le thermocycleur a été programmé à 46°C durant 20 min puis 1 min à 95°C afin d'inactiver l'enzyme. Le volume du produit de réaction a été ajusté à 100 µl avec de l'eau Milli-Q® (MERK, eau ultra pure de type 1) puis les ADNc conservés à -20°C.

3.12.3.2 Rétrotranscription spécifique de gènes viraux

Pour le géotypage de virus ou la quantification absolue du génome viral au sein d'échantillons, une rétrotranscription spécifique des ARNv PB1 ou M1 a été réalisée à l'aide de la transcriptase inverse SuperScript™ II (Invitrogen™ #180640). Dans un volume total de 12 µl, 1 µg d'ARN total, 2 pmol d'amorce spécifique (détail dans le Tableau 10) et 1 µl d'un mélange de dNTP (chacun à 10 mM) ont été incubés 5 min à 65°C. Puis, 4 µl de tampon « 5X First-Strand » et 2 µl de DTT à 0,1 M ont été ajoutés au mélange réactionnel. Après homogénéisation, l'ensemble a été incubé à 42°C durant 2 min. La transcriptase inverse a ensuite été ajoutée (1 µl) et le volume total ajusté à 20 µl avec de l'eau RNase-free. L'ensemble a enfin été incubé à 42°C durant 50 min puis 15 min à 70°C afin d'inactiver l'enzyme. Les ADNc obtenus ont été conservés à -20°C.

Dans le cas du séquençage d'ARNv, les ADNc ont été amplifiés par PCR avec une polymérase haute fidélité Phusion (Thermo Scientific #F530). La réaction a été réalisée en engageant 3 µl d'acides nucléiques rétrotranscrits. Les amorces sens utilisées (Tableau 10) ont ensuite permis le séquençage des produits obtenus.

		amorce 5' → 3'
H7N1	rétrotranscription ARNv PB1 et amplification par PCR - PB1 sens	TTACTTTTCTTGAAAGTGCCAG
	rétrotranscription ARNv M1	AGATCGCGCAGAGACTTGAAGA
	amplification par PCR - PB1 antisens	GGGTGTTGCAATTGCCCGTCTC
H3N2	rétrotranscription ARNv PB1 et amplification par PCR - PB1 sens	GAAAGTTCCAGCGCAAATGCC
	rétrotranscription ARNv M1	ATCGCGCAGAGACTTGAAGATG
	amplification par PCR - PB1 antisens	GCTCCTAGCTAGAGTTTCAACA

Tableau 10 : liste des amorces utilisées pour la rétrotranscription et le séquençage d'ARNv.

3.12.4 PCR quantitative

Les amorces utilisées en PCR quantitative (qPCR) ont été définies à l'aide de l'outil PerlPrimer en incluant, lorsque que cela était possible, une jonction d'une région intronique et exonique de façon à ce que seul un ARN épissé puisse être amplifié. Ce design permet ainsi de discriminer une amplification de l'ADNg correspondant au segment d'ARNm considéré en cas de contamination résiduelle de l'échantillon en ADNg après extraction. Certains gènes tels que ceux codant les différents types d'interférons ne possèdent cependant pas d'intron.

La qPCR est une méthode permettant d'évaluer la quantité relative ou absolue d'un gène transcrit au sein d'un échantillon. L'amplification par PCR du segment d'ADNc d'intérêt est réalisée en présence d'un agent capable de se lier aux acides nucléiques, le SYBR Green (cyanine asymétrique). La fixation de ce dernier induit un changement de conformation permettant l'émission d'un signal fluorescent. La mesure de la fluorescence à chaque cycle de la réaction permet d'évaluer le taux de fixation du SYBR Green et donc par corrélation la quantité de segment générée par l'amplification. Le résultat de cette réaction est le cycle seuil (noté Ct) représentant le nombre de cycles requis afin que le signal fluorescent mesuré soit

significativement plus élevé que la ligne de base définie selon les paramètres de l'appareil utilisé.

La réaction a été conduite dans un volume total de 20 μL incluant 10 μL de SYBR Green (Bio-Rad #1725122), 8 μL d'eau Milli-Q®, 1 μL d'ADNc et 1 μL du couple d'amorces du gène d'intérêt à 10 μM (amorces recensées dans le Tableau 11). L'appareil CFX Connect (Bio-Rad) paramétré selon le programme suivant a été utilisé :

- dénaturation initiale et activation de la polymérase : 3 min à 95°C
- phase d'amplification : 40 cycles incluant 10s à 95°C puis 30s à 60°C
- courbe de fusion : incrémentation de la température sur l'intervalle [60-95°C] de 0,5°C toutes les 5s avec mesure de la fluorescence à chaque température appliquée. L'augmentation par paliers de la température induit la dissociation progressive des produits double brin de l'amplification du gène transcrit d'intérêt et donc une décroissance du signal fluorescent compte tenu de la libération du SYBR Green. La température correspondant au maximum de dissociation est par définition le point de fusion du segment d'ADNc considéré. Ce paramètre est dépendant de la longueur ainsi que du taux de GC, il est donc caractéristique d'un segment d'ADNc. La courbe de fusion permet ainsi de vérifier la spécificité de la qPCR.

Le niveau d'expression relatif d'un gène transcrit dans un échantillon considéré a été déterminé selon les étapes présentées en Figure 35. En pratique, trois gènes de ménage ont été utilisés : celui codant la protéine hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HPRT), la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et la bêta-tubuline (βTub) pour les qPCR sur les échantillons issus de culture de cellules épithéliales. Pour les échantillons issus de poumons de souris, les gènes codant la protéine HPRT, la bêta-actine (βAct) et la βTub ont été utilisés.

Dans le cas d'une rétrotranscription spécifique de l'ARNm viral M1, le niveau d'expression a été évalué de façon absolue par extrapolation à partir d'une gamme standard générée par des dilutions en série de 10 en 10 du plasmide pRF483 incluant le segment M (H7N1 ou H3N2) de concentration initiale 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La gamme a été définie en engageant 1 μL des dilutions 10^{-4} à 10^{-9} dans la réaction. La conversion de la quantité d'ADN évaluée dans un échantillon en nombres de copies du gène M1 est détaillée en Figure 36.

<p>Pour un gène d'intérêt dans un échantillon donné :</p> <p>(E₁) $\Delta Ct = \frac{\sum_{k=1}^N Ct_{GOI(ts)} - Ct_{HKG(ts)_k}}{N}$</p> <p>(E₂) calibrateur = $\frac{\sum_{k=1}^N Ct(m)_{GOI(ref)} - Ct(m)_{HKG(ref)_k}}{N}$</p> <p>(E₃) $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \text{calibrateur}$</p> <p>(E₄) RGE = $2^{-\Delta\Delta Ct}$</p>	<p>Ct_{GOI(ts)} : Ct du gène d'intérêt obtenu pour l'échantillon testé</p> <p>Ct_{HKG(ts)} : Ct du gène de ménage obtenu pour l'échantillon testé</p> <p>Ct(m)_{GOI(ref)} : Ct moyen des réplicats biologiques du groupe de référence pour le gène d'intérêt</p> <p>Ct(m)_{HKG(ref)} : Ct moyen des réplicats biologiques du groupe de référence pour le gène de ménage considéré</p> <p>GOI : gène d'intérêt (« gene of interest »)</p> <p>HKG : gène de ménage (« housekeeping gene »)</p> <p>N : nombre total de gènes de ménage utilisés</p> <p>RGE : expression relative du gène d'intérêt (« relative gene expression »)</p> <p>ts : échantillon traité (« treated sample »)</p>
---	---

Figure 35 : méthode de traitement des données de PCR quantitative.

<p>nombre de copies = $\frac{q * N_A}{s * Aw_{(pb)} * 10^9}$</p>	<p>q : quantité ADN (ng)</p> <p>N_A : nombre d'Avogadro (6,022.10²³ mol⁻¹)</p> <p>s : taille de l'amplicon (pb)</p> <p>Aw_(pb) : poids moléculaire moyen d'une paire de base (650 Da)</p>
---	---

Figure 36 : détermination du nombre de copies d'un gène dans un échantillon.

Tableau 11 : liste des amorces utilisées en PCR quantitative.

espèce	gène	amorce sens 5' → 3'	amorce antisens 5' → 3'
gallus gallus	βTub	GCCACTGGCGGTAATATGT	CGAAGTTATCGGGTCTGAAGAT
	Cx43	GTCTGTACCAACCCTCTTGTA	CCATCATTCTGGACCACCTT
	GAPDH	CTGGAGAAACCAGCCAAGTAT	TGTATCCTAGGATGCCCTTC
	HPRT	GGATGACCTCTCAACCTTGAC	TTGACCAACAACTGGCCAC
	IFNβ	GCATTACATCCATCACCTTGAG	TTGTGCTGTAGGAAGTTGTGG
	IL18	GGTGAAATCTGGCAGTGGAA	CTCTTATCTTCTACCTGGACGC
	IL8L2	CCATTCAAGATGTGAAGCTGAC	CTCTCCATCCTTTAGAGTAGCT
	ITGβ6	CCCAAGAGAATTACACAGATTCAG	AATTTCCACTTCTGAAACGGG
homo sapiens	βTub	CTTTGTATTTGGTCAGTCTGGG	GTACCACATCCAGGACAGAAT
	CCL5	TACCATGAAGGTCTCCGC	GACAAAGACGACTGCTGG
	CREB3	AGTACAGCTTCTGGAGGAAC	CTAGTAGGACCAAGATGCAGG
	Cx43	CCATCTTCATCATCTTCATGCTG	CTTCCCTTAACCCGATCCTTAA
	GAPDH	GCCTCAAGATCATCAGCAATG	CATGGACTGTGGTCATGAGTC
	HIF1α	CTGGATGCTGGTGATTGGATA	ACCATCATCTGTGAGAACCAT
	HPRT	CTGGCGTCGTGATTAGTGAT	TAGTCCATGAGGAATAAACACCC
	IFITM3	TACTCCGTGAAGTCTAGGGAC	ATGAGGATGCCAGAATCAG
	IFNβ	CAGCAGTTCAGAAGGAGGA	AGCCAGGAGGTTCTCAACAA
	IL1β	TGTACGATCACTGAACTGCA	CATGGAGAACCACCTTGTG
	IL6	GGCACTGGCAGAAAACAACC	GCAAGTCTCCTCATTGAATCC
	IL8	CAAGAGCCAGGAAGAAACCA	GTCCACTCTCAATCACTCTCAG

	ITGβ6	AACTCTAAACGGAGCTGCAT	TCTTCTTCACTGATGGTCGC
	Mx1	AGGTCAGTTACCAGGACTAC	ATGGCATTCTGGGCTTTATT
mus musculus	βAct	CCTTCTTGGGTATGGAATCCTGT	CACTGTGTTGGCATAGAGGTCTTTAC
	βTub	CAACTTTATCTTTGGTCAGAGTGG	CAGGCAGTCACAATTCTCAC
	casp1	CATGGCTGACAAGATCCTGAG	ACATGATCACATAGGTCCCCT
	CCL5	ATCTTGCAGTCGTGTTGTCA	TCCTAGCTCATCTCCAAATAGTTG
	CXCL10	GCCGTCATTTTCTGCCTCAT	GCTTCCCTATGGCCCTCATT
	HPRT	TGACACTGGCAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
	IFNα	CTAGGCTCTGTGCTTTCCTG	CTCTTGTTCTGAGGTTATGAGTC
	IFNβ	ATGAACAACAGGTGGATCCT	TCTTCTCCGTCATCTCCATAGG
	IFNβ	ATGAACAACAGGTGGATCCT	TCTTCTCCGTCATCTCCATAGG
	IL1β	TTTGACAGTGATGAGAATGACC	AATGAGTGATACTGCCTGCC
	IL6	CTGGGAAATCGTGAAATGAG	TTTCTGCAAGTGCATCATCG
	ITGβ6	CAACCCTTGCAGTAGTATCC	CTCGGCATCATCAGTTAATGG
	Kcni4	GAGCTTCAGATTCTTTACAGAGG	TATGTGGTGGAGTCTCCCTG
	MxA	GTGGTAGTCCCAAGCAATGT	TGCTGACCTCTGCACTTGAC
	RELB	CTTTGCCTATGATCCTTCTGC	GAGTCCAGTGATAGGGGCTCT
	souche virale	gène	amorce sens 5' → 3'
H3N2	M1	ACCAATCCTGTACCTCTGA	CCATTCCCATTGAGGGCATT
H7N1	M1	GCTAAAGACAAGACCAATCCT	CTCCATTCCCATTAGGGCA

3.13 Étude de la capacité répliquative sur œufs embryonnés des virus H7N1-nanoluc

3.13.1 Développement embryonnaire

Les œufs fécondés de poules PA12 White Leghorn EOPS (exempt d'organisme pathogène spécifique) ont été achetés à l'élevage conduit par la plate-forme d'infectiologie expérimentale du centre INRAE Val de Loire (site de Tours). Les œufs ont été réceptionnés à J0 de développement embryonnaire, ce dernier étant initié lors de leur mise en couveuse au laboratoire. Les œufs ont été incubés à 37,7°C, avec une humidité relative de 53% et soumis à un retournement horaire.

3.13.2 Infection d'œufs embryonnés

L'infection a été réalisée à 11 jours de développement embryonnaire. Pour cela, les œufs ont été mirés afin de localiser la position de la membrane allantoïque. Puis, la coquille a été poncée de façon à ce que cette dernière soit apparente. Une aiguille enfoncée verticalement jusqu'à la garde à travers cet espace dégagé a permis l'injection dans le liquide allantoïque de l'inoculum viral. Ce dernier incluait, pour un œuf, 50 PFU diluées dans un volume total de 100 µl de PBS complété avec 100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml de

streptomycine. La portion de membrane allantoïque dégagée a ensuite été recouverte d'un adhésif. Les œufs ont enfin été replacés en couveuse (paramètres d'incubation identiques).

3.13.3 Mesure de la bioluminescence sur œufs embryonnés infectés avec un virus encodant la nanoluciférase

Le signal bioluminescent produit a été mesuré grâce à un appareil IVIS 200 (PerkinElmer). Le mode opératoire décrit lors de l'infection a également été appliqué pour l'injection du substrat de la nanoluciférase *via* la même portion de membrane allantoïque dégagée. Le substrat utilisé provient du kit Nano-Glo® luciferase assay system (Promega) et a été utilisé dilué au 20^{ème} dans du PBS (300 µl/œuf). Suite à l'injection du substrat, l'œuf a été retourné trois fois de façon à homogénéiser le substrat injecté dans le volume de liquide allantoïque. Après 3 minutes d'incubation, l'activité de la nanoluciférase a été mesurée *in ovo*. Le temps d'acquisition a été défini automatiquement par l'appareil de façon à optimiser le signal bioluminescent. Puis, 6 minutes après l'injection du substrat, l'embryon a été extrait de la coquille et rincé deux fois dans du PBS afin d'éliminer le signal issu du liquide allantoïque et donc non spécifique des cellules de l'embryon. L'activité de la nanoluciférase a été mesurée dans 100 µl de liquide allantoïque puis sur l'embryon isolé. Le signal bioluminescent a été quantifié à l'aide du logiciel Living Image sur l'ensemble de la surface de l'entité considérée puis rapporté à la surface de la zone définie.

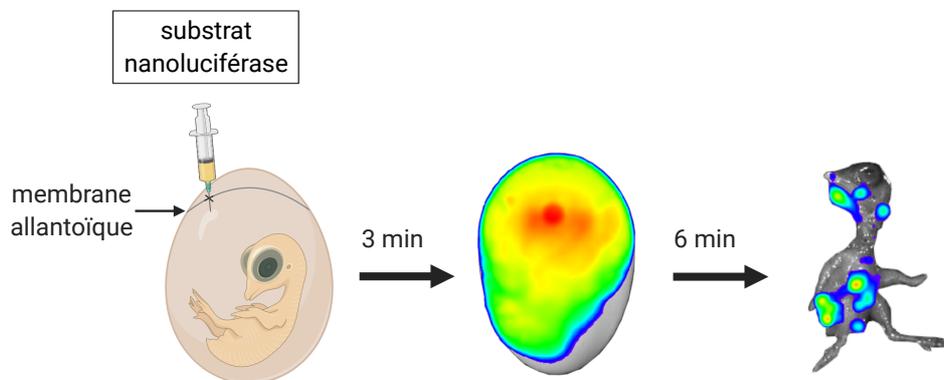


Figure 37 : mesure d'un signal bioluminescent sur un embryon de poule infecté par un virus nanoluc.

4. Résultats

4.1 Étude des propriétés de PB1-F2 en modèles *in vitro*

4.1.1 Caractérisation des virus de l'étude

Les travaux ont été conduits en s'appuyant sur les souches A/Turkey/Italy/977/1999 (H7N1) et A/Scotland/20/1974 (H3N2) comme modèles respectifs d'un virus aviaire faiblement pathogène et d'un virus d'origine humaine, produits tout deux par génétique inverse afin d'éviter toute dérive du fond génétique viral. Dans le but d'évaluer la contribution de PB1-F2 au cours de l'infection, des virus mutants incapables d'exprimer cette protéine, notés par la suite $\Delta F2$, ont été produits. La stratégie adoptée a été d'introduire un codon stop en position 12 du cadre de lecture de PB1-F2, résultant en la synthèse d'un peptide non fonctionnel tout en maintenant la régulation traductionnelle du segment 2. La mutation introduite est silencieuse au sein de l'ORF chevauchant de PB1 et sa présence a été vérifiée par séquençage des ARNv. Son effectivité à l'échelle protéique n'a pas pu être validée par défaut d'anticorps adapté. Toutefois, une étude s'est appuyée sur l'insertion de la GFP en aval des séquences codant les protéines PB1, PB1-N40 et PB1-F2 [569] afin de valider l'abolition de l'expression de PB1-F2 par cette stratégie de mutation et vérifier que celle-ci n'a pas d'impact sur le niveau d'expression des deux autres protéines codées par le segment 2 [488]. De plus, des travaux conduits précédemment au sein du laboratoire avec la souche H7N1 ont permis de s'assurer que cette stratégie de mutation $\Delta F2$ n'impactait pas la réplication en quantifiant le génome viral par PCR quantitative [570].

Afin de caractériser les propriétés de PB1-F2 dans un modèle de réassortiment virus aviaire/humain, nous avons construit un virus chimérique H3N2/H7N1 en remplaçant uniquement le segment 2 natif du virus H3N2 par celui H7N1 (noté C PB1) ainsi que son homologue incapable d'exprimer PB1-F2 (C PB1 $\Delta F2$).

De manière à faciliter l'évaluation de la capacité de réplication des virus, notamment au cours d'expériences conduites *in vivo*, nous avons souhaité développer des virus intégrant une cassette rapportrice, en l'occurrence une luciférase. Notre choix s'est porté sur la nanoluciférase compte tenu de la taille réduite de cette protéine en comparaison avec les luciférases Firefly et Renilla (Tableau 12). La luciférase Gaussia, bien que de taille équivalente, est une enzyme sécrétée [571]. Cette propriété est peu adaptée à un suivi de la réplication virale *in cellulo* puisque la sécrétion de l'enzyme peut induire une sous-estimation de l'activité de réplication dans les lysats cellulaires. Par ailleurs, il ne serait pas envisageable de mesurer le signal luminescent dans le surnageant de culture en tant que reflet de l'avancée de l'effet cytopathogène puisque l'origine de l'enzyme dans le milieu extracellulaire serait difficile à déterminer.

luciférase	taille (kDa)	substrat	longueur d'onde d'émission (nm)
Firefly	61	D-luciférine	560
Renilla	36	coelenterazine	480
Gaussia	20	coelenterazine	480
Nanoluciférase	19	furimazine	460

Tableau 12 : comparatif des propriétés des luciférases couramment usitées.

Afin de produire des virus H3N2 et H7N1-nanoluciférase (virus nanoluc, notés NL), nous sommes appuyés sur les travaux conduits par l'équipe du Dr Andrew Mehle. Celle-ci a en effet construit un segment PA encodant la nanoluciférase [547] à partir de la souche A/WSN/1933 (H1N1). Le détail de la construction est précisé en Figure 31 et les différents éléments sont explicités dans le matériels et méthodes (en page 74).

Le segment PA a été choisi en tant que site d'insertion de la nanoluciférase car une étude a permis d'observer que la protéine PA tolère la fusion d'une protéine exogène à son extrémité C-terminale [572]. Par sécurité, l'équipe de Dr Mehle a toutefois ajouté un peptide auto-clivant entre PA et la nanoluciférase. Par ailleurs, l'empaquetage des segments viraux n'est pas uniquement régi par les régions UTR, certains nucléotides limitrophes de l'ORF sont également inclus au sein des motifs nécessaires [549–551]. Afin de ne pas réduire l'efficacité d'empaquetage du segment support de l'insertion, une continuité entre les extrémités N et C-terminales et les régions UTR est donc essentielle. L'insertion d'un gène rapporteur en position C-terminale implique ainsi la nécessité de restaurer l'unité fonctionnelle associée à l'empaquetage par une répétition des nucléotides critiques en aval du gène exogène. Or, dans le cas du segment PA, la séquence nucléotidique identifiée est plus courte que dans d'autres segments viraux, notamment PB2 [551] et HA [573], ce qui a appuyé sa sélection.

Dans le but de caractériser les virus de l'étude et notamment de s'assurer que les délétions $\Delta F2$ ou l'insertion de la nanoluciférase n'ont pas d'impact sur la production de particules virales dans nos modèles, nous avons réalisé des cinétiques de réplication en cellules aviaires et humaines.

4.1.1.1 Cinétiques de réplication en cellules aviaires

En cellules épithéliales pulmonaires de poulet (CLEC213), tout au long de la cinétique, la délétion de PB1-F2 ne modifie pas la capacité répliquative de la souche H7N1 que ce soit en termes de particules virales produites (Figure 38A) ou de l'activité nanoluciférase (Figure 38B). De plus, les deux types de cinétiques présentent un profil relativement similaire : un pic de réplication est atteint à 24 heures pi dans le premier cas et un peu plus précocement dans le second (16 heures pi). Ce décalage reflète probablement le fait que la traduction des ARNm viraux permettant la production de la nanoluciférase précède la libération des particules virales produites. De plus, dans les deux approches, une décroissance de la réplication virale suit immédiatement le point d'activité maximale ce qui témoigne de la faible stabilité des éléments tracés.

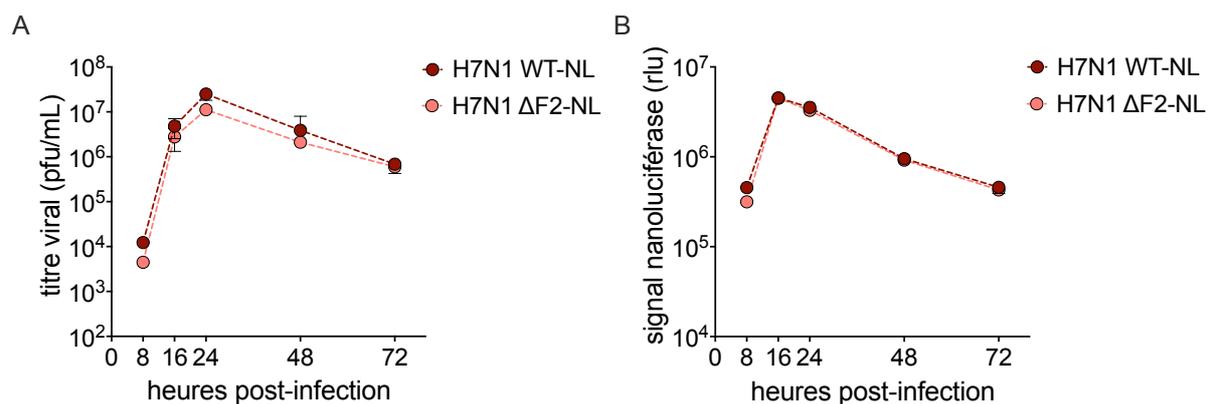


Figure 38 : cinétique de réplication des virus H7N1 en cellules aviaires.

Des cellules CLEC213 ont été infectées avec les virus H7N1 WT ou Δ F2 ainsi que leur homologue encodant la nanoluciférase à une MOI de 0,01. Aux temps post-infection indiqués, les particules virales présentes dans le milieu de culture ont été quantifiées [A] ou l'activité nanoluciférase a été mesurée dans le lysat cellulaire [B]. Les données représentent la valeur moyenne \pm écart type (n=3).

Par conséquent, en cellules aviaires, le suivi du signal généré par la nanoluciférase reflète ainsi globalement bien le titre viral associé et la délétion de PB1-F2 n'induit pas de conséquence sur la réplication du virus H7N1.

4.1.1.2 Cinétiques de réplication en cellules humaines

En cellules bronchiques humaines (BEAS-2B), la cinétique de réplication de la souche H7N1 par mesure des particules virales produites présente un profil similaire à celui observé en cellules aviaires. Le pic d'activité maximal se situe également à 24 heures pi et la quantité de virus atteinte en ce point est équivalente à celle mesurée en cellules aviaires (Figure 39A). Cette observation n'est pas retrouvée dans le cas de la cinétique réalisée par suivi de l'activité luciférase. En effet, le pic de réplication se produit ici bien plus tardivement, à 48 heures pi plutôt que 16 heures pi en cellules aviaires (Figure 39B). Ainsi, le temps nécessaire pour atteindre le maximum d'activité traductionnelle de la souche H7N1 est augmenté en cellules humaines, sans que cela ne se traduise pas une dégradation du rendement de production de particules virales. Cela refléterait des conditions d'accès à la machinerie cellulaire moins optimales pour le virus aviaire en cellules humaines. La délétion de PB1-F2 se traduit par un léger impact sur la cinétique de réplication. La mesure de la luminescence générée par la nanoluciférase révèle un léger ralentissement de la réplication virale en absence de la protéine PB1-F2, cependant, cela ne modifie pas le point pi auquel survient le pic d'activité ni sur la valeur maximale associée. Concernant la production de particules virales, un très léger décalage du pic est notable : il est en effet atteint à 24 heures pi dans le cas du virus H7N1 WT et à 32 heures pi pour son homologue Δ F2. La concentration maximale en particules virales est toutefois similaire. De plus, dans le cas des cellules infectées avec le virus H7N1 Δ F2, nous observons un plateau entre 32 et 48 heures pi et une vitesse de dégradation des virus produits réduite par rapport au virus WT. Ainsi, l'expression de la protéine PB1-F2 pourrait avoir un impact négatif sur la stabilité des particules virales. Les modulations évoquées semblent toutefois plutôt modérées et les virus H7N1 WT ou Δ F2 (encodant ou non la nanoluciférase)

présentent ainsi des cinétiques de réplication globalement analogues.

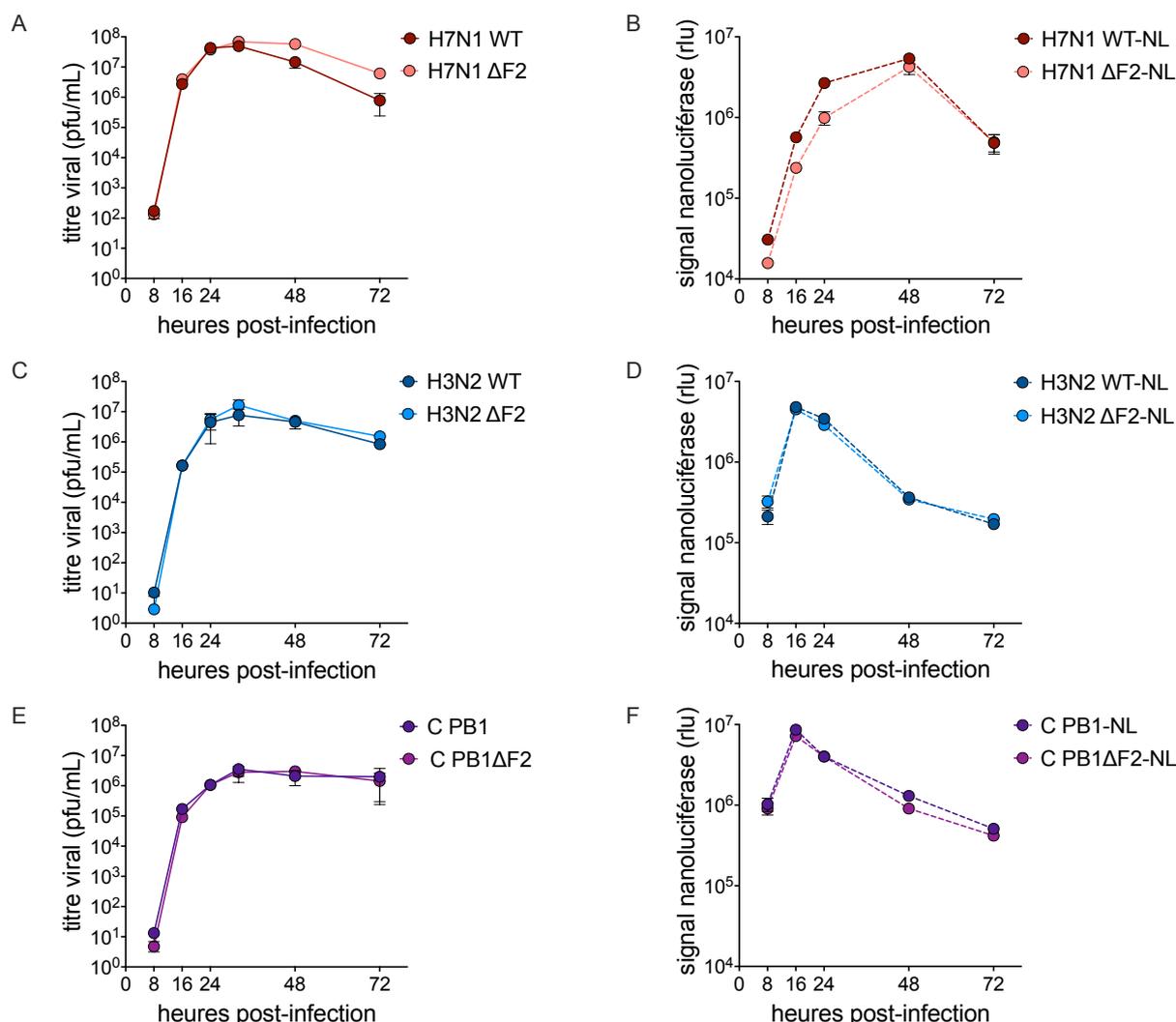


Figure 39 : cinétiques de réplication en cellules humaines des virus de l'étude.

Des cellules BEAS-2B ont été infectées avec les virus H7N1 WT, H7N1 ΔF2, H3N2 WT, H3N2 ΔF2, C PB1 ou C PB1ΔF2 à une MOI de 0,01. Les infections avec les virus homologues encodant la nanoluciférase ont été réalisées à une MOI de 0,01 pour les virus aviaires (H7N1 WT ou ΔF2-nl) ou 0,1 pour les virus de base H3N2 (WT, ΔF2, C PB1, C PB1 ΔF2-NL). Aux temps pi indiqués, les particules virales présentes dans le milieu de culture ont été quantifiées [A;C;E] ou l'activité nanoluciférase a été mesurée dans le lysat cellulaire [B;D;F]. Les données représentent la valeur moyenne ± écart type (n=3).

Dans le cas de la souche H3N2, la délétion de PB1-F2 ne présente pas de conséquence sur la réplication virale. Nous n'observons aucune différence entre les cinétiques des virus H3N2 WT et ΔF2 à la fois par la quantification des particules virales (Figure 39C) et de l'activité nanoluciférase (Figure 39D). Comme avec la souche H7N1 en cellules humaines, les profils des deux types de cinétiques diffèrent. Le pic d'activité est atteint plus précocement lors de la mesure du signal nanoluciférase : 16 heures pi alors que ce point se situe à 32 heures pi par quantification des particules virales. Par ailleurs, une décroissance brutale du signal survient peu après le pic d'activité. Ce résultat n'étant pas observé avec le virus H7N1, cela pourrait suggérer un effet lytique plus important du virus H3N2. La nanoluciférase serait libérée dans le milieu de culture ce qui, en conséquence, réduirait le signal luminescent mesuré dans le lysat

cellulaire.

Le virus C PB1 présente des cinétiques de répllication très similaires au virus H3N2 WT (Figure 39E et Figure 39F). Le remplacement du segment PB1 natif par celui du virus H7N1 n'impacte ainsi pas l'efficacité répllicative. Cela souligne la compatibilité de cette association de segments viraux en cellules humaines et appuie donc la pertinence de ce modèle de virus réassorti. Par ailleurs, la délétion de PB1-F2 en contexte chimérique ne modifie pas non plus les propriétés du virus.

Les cinétiques réalisées soulignent la contribution mineure de la protéine PB1-F2 dans la définition de la capacité répllicative des virus étudiés en modèles *in vitro*. Ces résultats permettent d'envisager des analyses sans risque que les résultats ne soient biaisés par une différence de répllication en l'absence de PB1-F2. La mesure du signal produit par la nanoluciférase ne génère pas systématiquement une cinétique de répllication identique à celle obtenue par quantification des particules virales. Toutefois, la comparaison de l'activité répllicative de deux virus en considérant leur version nanoluc ou leur homologue sans cassette donne le même résultat. Cela valide l'usage de la mesure de l'activité nanoluciférase comme méthode de comparaison des capacités répliquatives.

4.1.2 Caractérisation de la réponse cellulaire

Afin d'étudier l'impact de la protéine PB1-F2 sur la réponse de l'hôte, des cellules CLEC213 et BEAS-2B ont été infectées avec les différents virus afin de quantifier l'expression de gènes codant des protéines. L'analyse a été réalisée à 8 heures pi.

4.1.2.1 Modèle cellulaire aviaire

Les expressions relatives de gènes liés à la réponse inflammatoire (IL18, IL8L2), antivirale (IFN β , Mx1) ont été quantifiées ainsi que le génome viral basé sur l'ARNv M1. Compte tenu de la propension de PB1-F2 à former des pores au sein des membranes [512,540], nous nous sommes interrogés quant à l'impact - autre que mécanique - que ce stress pouvait engendrer. Nous avons supposé que ce phénomène pût notamment modifier les voies cellulaires liées à l'adhérence. En ce sens, l'expression du gène codant l'intégrine $\beta 6$ (ITG $\beta 6$) a également été étudiée. Sur le panel de gènes étudiés, la protéine PB1-F2 n'a pas été associée à une modulation particulière (Figure 40). Globalement, les ratios d'induction des gènes étudiés sont relativement peu élevés, notamment pour l'IFN β (Figure 40C). Cela est surprenant car les CLEC213 étant très sensibles à l'infection, un effet cytopathogène était déjà décelable à 8 heures pi. L'état avancé de dégradation cellulaire pourrait être associé à un impact négatif sur la stabilité des ARNm étudiés. Par ailleurs, une légère induction de l'expression de l'ITG $\beta 6$ est toutefois notable ce qui soulignerait un impact de l'infection sur l'adhérence de la cellule hôte à la lame basale. Les intégrines activent également différentes voies cellulaires liées à la transduction, notamment la voie de signalisation PI3K-AKT qui joue un rôle majeur dans l'homéostasie cellulaire en régulant divers processus du cycle cellulaire [574]. La surexpression

de l'ITGβ6 induite par l'infection pourrait ainsi refléter un état d'alerte de la cellule qui multiplierait la production de senseurs de messagers extracellulaires.

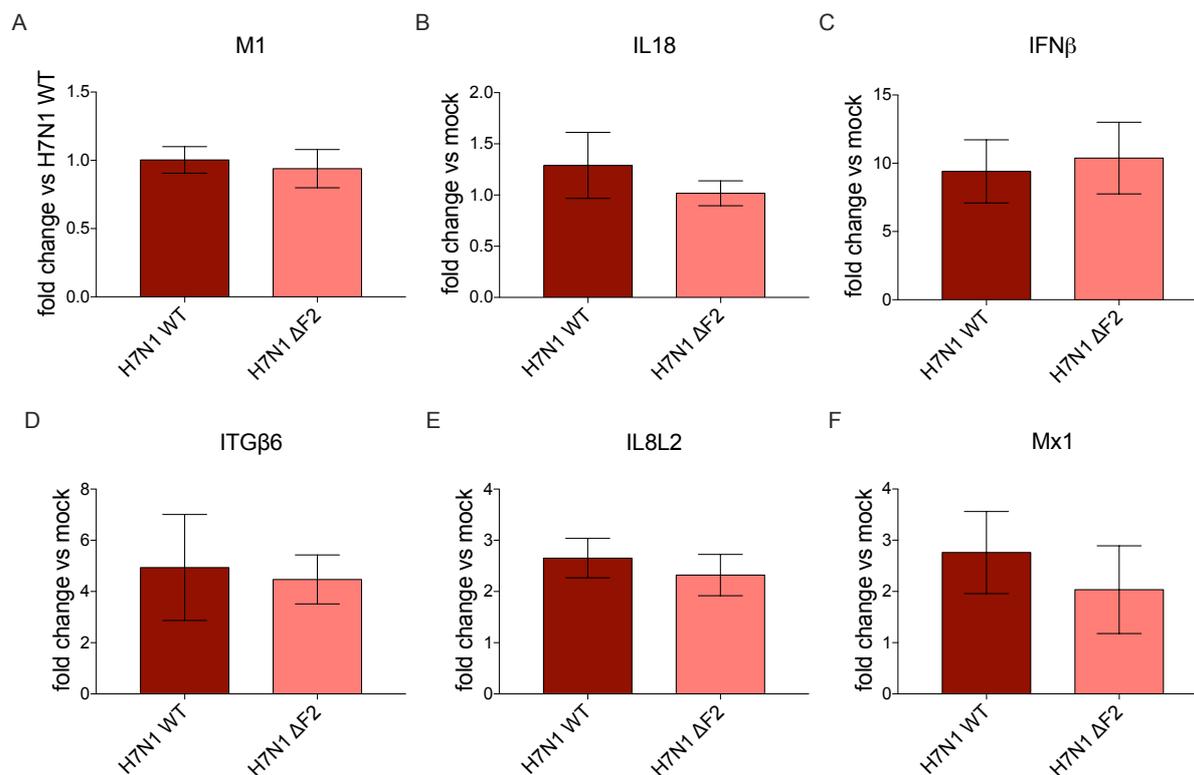


Figure 40 : analyse de l'impact de PB1-F2 sur la réponse transcriptomique en cellules aviaires.

Des cellules CLEC213 ont été infectées avec les virus H7N1 WT ou ΔF2 à une MOI de 3. L'ARN total a été extrait à 8 heures pi et l'expression relative des transcrits codant les gènes M1 [A], IL18 [B], IFNβ [C], ITGβ6 [D], IL8L2 [E] et Mx1 [F] a été quantifiée par qPCR. Les données représentent la valeur moyenne ± écart type (n=3).

Par conséquent, en cellules aviaires, hôte naturel du virus H7N1 et à la lumière des gènes considérés, la protéine PB1-F2 n'est pas impliquée dans la modulation de la réponse inflammatoire et antivirale cellulaire.

4.1.2.2 Modèle cellulaire humain

La même approche a été conduite en cellules BEAS-2B en intégrant un panel de gènes un peu plus large. L'expression des transcrits codés par les gènes suivants a été analysée afin de caractériser la réponse inflammatoire et antivirale : IL8, CCL5, IL1β, IL18, IL6, Mx1, IFITM3 et IFNβ. Afin d'apporter une lecture plus large de la réponse cellulaire, nous nous sommes intéressés aux gènes suivants : ITGβ6, CREB3, Cx43 et HIF1α. La protéine CREB3 est un facteur de transcription impliqué notamment dans la régulation de gènes en réponse à un état de stress du réticulum endoplasmique [575]. CREB3 a été inclus dans l'analyse car un crible double hybride réalisé au sein du laboratoire a identifié cette protéine comme interagissant potentiel de quatre protéines PB1-F2 et notamment celle associée à une souche H3N2 (A/Udorn/72). Par ailleurs, nous nous sommes intéressés à l'activation de la voie liée au stress hypoxique, en ce sens l'expression du gène codant le facteur de transcription HIF1α, notamment activé par une

infection grippale [576], a été étudiée. Nous avons également inclus une connexine (Cx43) afin d’apporter un élément de lecture relatif à la communication intercellulaire. Un facteur décisionnel à la sélection de cette connexine a été l’inhibition de son expression en condition hypoxique [577], ce qui permettait de faire un pont avec le point précédent. Enfin, le génome viral a été relativement quantifié sur la base de l’ARNv M1. Une heat map synthétisant les expressions relatives des gènes cités précédemment selon les différents virus étudiés est présentée en Figure 41. Les échantillons ont pu être distingués selon deux clusters principaux : le premier composé du virus H3N2 WT ainsi que des deux virus chimériques et un second regroupant le virus H3N2 ΔF2 et les virus aviaires H7N1. Ainsi, de façon intéressante, l’infection avec le virus H3N2 ΔF2 induit une réponse cellulaire plus proche de celle associée aux virus H7N1 que celle induite par le virus H3N2 WT.

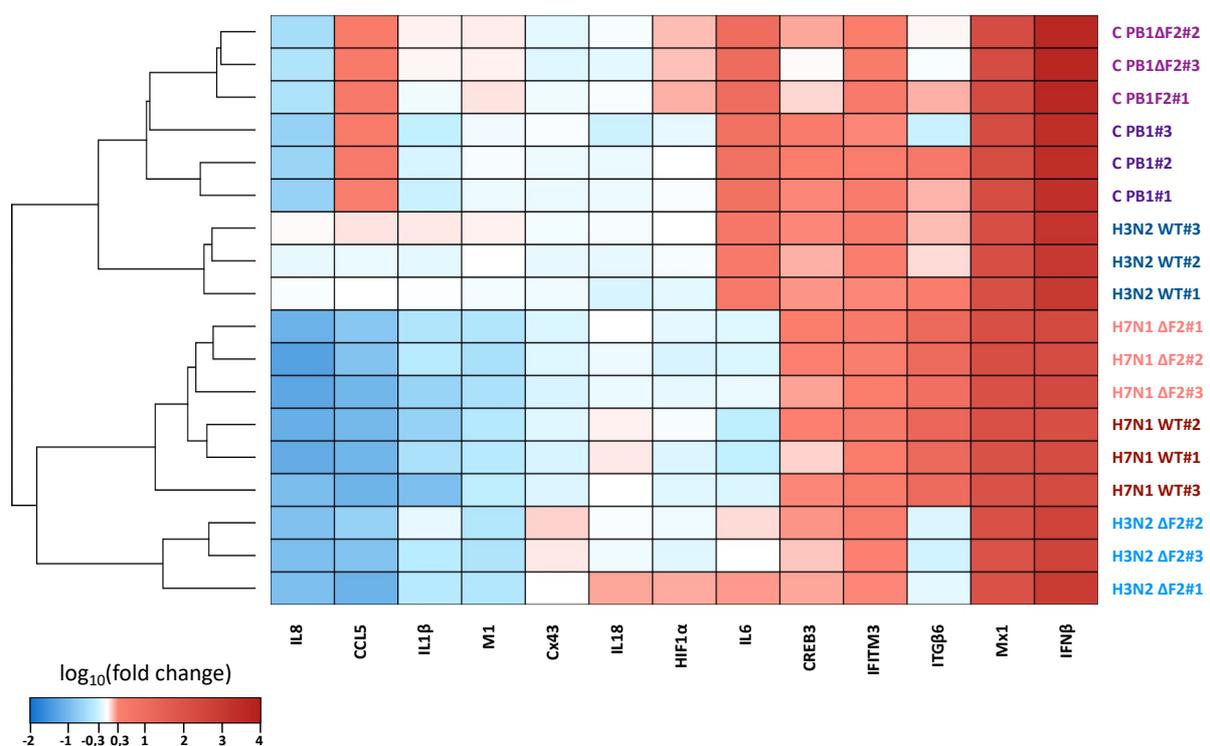


Figure 41 : analyse de l’impact de PB1-F2 sur la réponse transcriptomique en cellules humaines.

Des cellules BEAS-2B ont été infectées avec les virus H7N1, H3N2, C PB1 ou leur homologue ΔF2 à une MOI de 3. L’ARN total a été extrait à 8 heures pi et l’expression relative des transcrits codant les gènes IL8, CCL5, IL1β, M1, Cx43, IL18, HIF1α, IL6, CREB3, IFITM3, ITGβ6, Mx1 et IFNβ été quantifiée par qPCR. La heatmap réalisée à l’aide du logiciel R représente l’expression relative des gènes exprimée en log₁₀(fold change vs H3N2 WT) pour les gènes M1 et CCL5 et en log₁₀(fold change vs mock) pour les autres gènes.

La comparaison intra-virus permet d’identifier une régulation différentielle des gènes codant la chimiokine CCL5, l’IL6 et l’ITGβ6. Les expressions relatives associées à ces gènes sont détaillées en Figure 42. Les gènes codant M1, l’IFNβ et Mx1 sont également représentés afin de mettre en exergue des différences peu décelables sur la heat map. La quantification du génome viral a été comparé au niveau basal représenté par le virus H3N2 WT (Figure 42A). Les virus chimériques C PB1 et C PB1F2 présentent un niveau répliatif équivalent au virus référent, une activité légèrement supérieure étant toutefois observée dans le cas du virus chimérique

mutant vis-à-vis de celui sauvage. La délétion de PB1-F2 n'impacte pas la réplication du virus H7N1, cependant les virus aviaires présentent une quantité d'ARNv M1 réduite de moitié par rapport au virus H3N2 WT, témoignant probablement de conditions moins favorables à leur réplication. Au contraire, la délétion de PB1-F2 au sein du virus H3N2 WT se traduit par une inhibition de l'ordre de 50% de la synthèse d'ARNv. La MOI d'infection employée étant élevée, la presque totalité des cellules sont supposées être infectées (95% selon la loi de Poisson). Ainsi, l'activité de la très grande majorité des cellules analysées est modulée directement par l'infection. Pour les gènes de l'hôte étudiés, l'existence d'une linéarité exacte entre quantité d'ARNv/amplitude de la modulation n'a pas été abordée. Nous pouvons supposer que l'écart observé en termes de matériel génétique viral ne détermine pas l'entière des différences observées entre le virus H3N2 WT et son homologue Δ F2 quant à l'expression des gènes de la cellule hôte.

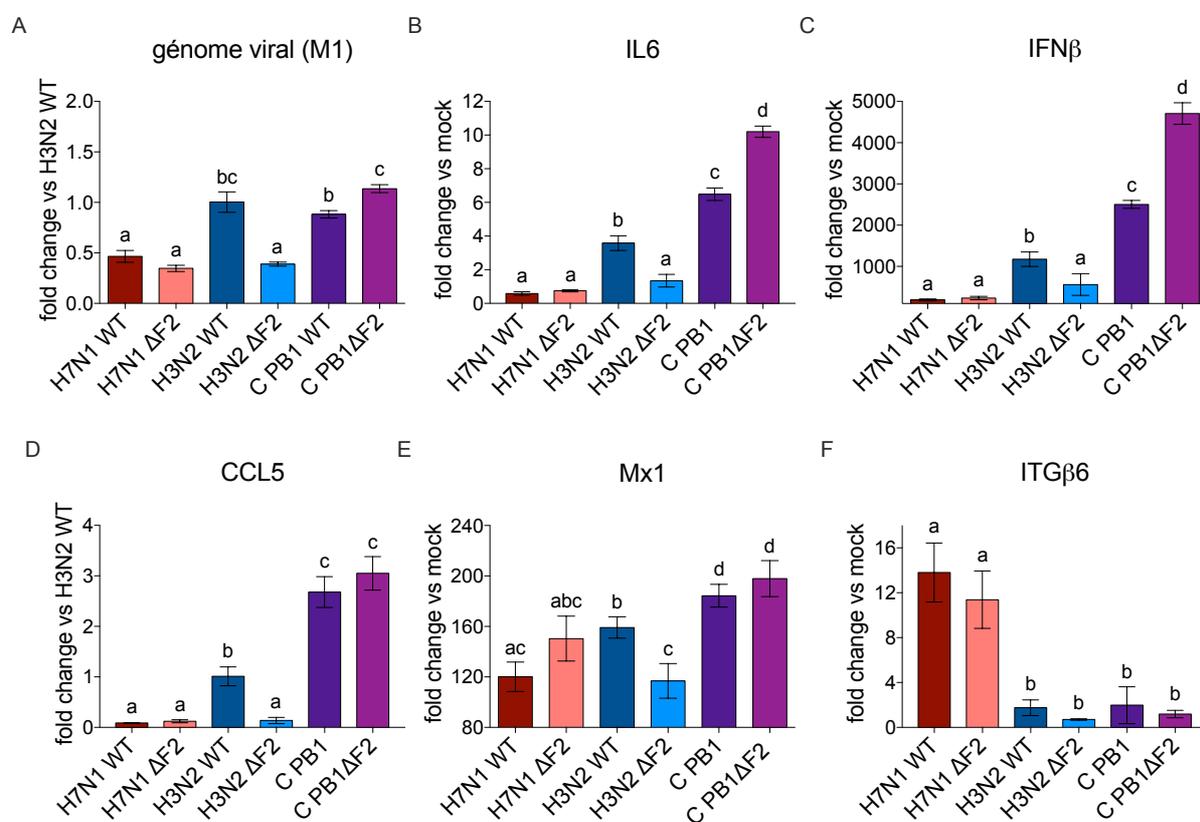


Figure 42 : analyse de l'impact de PB1-F2 sur la réponse transcriptomique en cellules humaines.

Des cellules BEAS-2B ont été infectées avec les virus H7N1, H3N2, C PB1 ou leur homologue Δ F2 à une MOI de 3. L'ARN total a été extrait à 8 heures pi et l'expression relative des transcrits codant les gènes M1 [A], IL6 [B], IFN β [C], ITG β 6 [D], CCL5 [E] et Mx1 [F] a été quantifiée par qPCR. Les données représentent la valeur moyenne \pm écart type (n=3) et ont été comparées par ANOVA à un facteur. Les comparaisons multiples ont été réalisées à l'aide du test de Tukey (seuil de significativité fixé à p-value < 0,05). Deux moyennes sont significativement différentes lorsque les dénominations des groupes associés ne partagent aucune lettre).

Relativement au virus H3N2 WT, la quantification des transcrits IL6 (Figure 42B) et CCL5 (Figure 42E) suggère une activation de la réponse inflammatoire et une chimio-attraction de cellules immunitaires (macrophages, cellules NK, lymphocytes T) plus modérée suite à l'infection avec le virus H7N1. De surcroît, l'amplitude de la réponse IFN β est également

limitée (Figure 42C). Tout comme en cellules aviaires, nous n'observons pas de modulation de la réponse cellulaire par PB1-F2 dans le cas de la souche H7N1 quel que soit le gène considéré. Dans le cas de la souche H3N2, au contraire, nous observons une fonction pro-inflammatoire et antivirale de PB1-F2 compte tenu de l'impact négatif de la délétion sur l'expression de l'IL6 (Figure 42B), IFN β (Figure 42C), CCL5 (Figure 42D) et Mx1 (Figure 42E). L'introduction du segment 2 aviaire au sein du virus H3N2 WT implique une amplification des inductions générées par le virus H3N2 WT sur ces deux voies cellulaires. De façon surprenante, la protéine PB1-F2 apportée par le segment PB1 aviaire semble adopter un comportement opposé. Bien que qu'elle ne présente pas d'activité pro-inflammatoire particulière lorsqu'elle est exprimée par son virus natif, en contexte chimérique, PB1-F2 H7N1 tend ainsi à réduire l'impact du virus C PB1 sur la réponse cellulaire. Par ailleurs, une spécificité aviaire non associée au segment PB1 est notable. En effet, l'expression de l'ITG β 6 (Figure 42F) est fortement induite lors d'une infection avec le virus H7N1 alors que celle-ci est proche du niveau basal dans le cas des virus de base H3N2. Une surexpression de ce gène avait également été observée en cellules aviaires, ce qui pourrait définir une action du virus H7N1 commune aux deux hôtes considérés.

Afin d'obtenir une lecture globale et identifier plus facilement les différences entre les virus considérés, nous avons procédé à une analyse en composantes principales (ACP). Il s'agit d'une méthode factorielle de réduction de dimension permettant de visualiser des individus décrits par plusieurs variables quantitatives. Lorsque plus de trois variables sont engagées, il devient en effet délicat d'appréhender les données. Concrètement, l'ACP extrait l'ensemble de l'information générée par ces variables dans le but de caractériser les individus par des combinaisons linéaires de celles-ci. Ces nouvelles variables, appelées composantes principales, définissent des plans factoriels qui servent de base à une représentation graphique plane des variables initiales. L'interprétation des résultats se restreint généralement aux deux premiers plans factoriels, sous réserve que ceux-ci expliquent la majeure partie de la variance du nuage des variables initiales. L'issue d'une ACP est donc la représentation des données dans un espace à deux (ou trois dimensions) dont les axes correspondent à une combinaison linéaire des variables prises en compte. La part de la variance intergroupes totale expliquée par l'ACP est indiquée sur chaque axe.

Les résultats sont présentés ici en ACP normée, les variables utilisées sont ainsi centrées réduites. En conséquence, les projections des variables sur chaque plan factoriel sont incluses au sein d'un cercle trigonométrique. Plus une variable est projetée vers le bord du cercle, plus elle contribue à définir l'axe considéré et mieux elle est représentée. Cela se traduit par le fait que plus le cosinus de l'angle formé entre l'axe et le vecteur d'une variable est proche de 1 (ou -1 selon le sens de la contribution), mieux celle-ci est représentée. En pratique, le \cos^2 est utilisé puisque déterminable *via* le théorème de Pythagore. Seules les variables dont la valeur absolue du \cos^2 était supérieure à 0,7 ont été conservées. Par ailleurs, deux variables bien représentées et proches l'une de l'autre sont corrélées positivement tandis que deux variables qui s'opposent sont corrélées négativement. Une orthogonalité entre deux variables traduit l'absence de corrélation linéaire. Le raisonnement est identique dans le cas d'un individu : plus celui-ci est projeté proche du cercle, mieux il est décrit par la combinaison de variables

définissant l'axe considéré. Ainsi, il est difficile de tirer des conclusions lorsque les individus sont localisés proche de l'origine du repère, tels que le groupe H3N2 WT (Figure 43C).

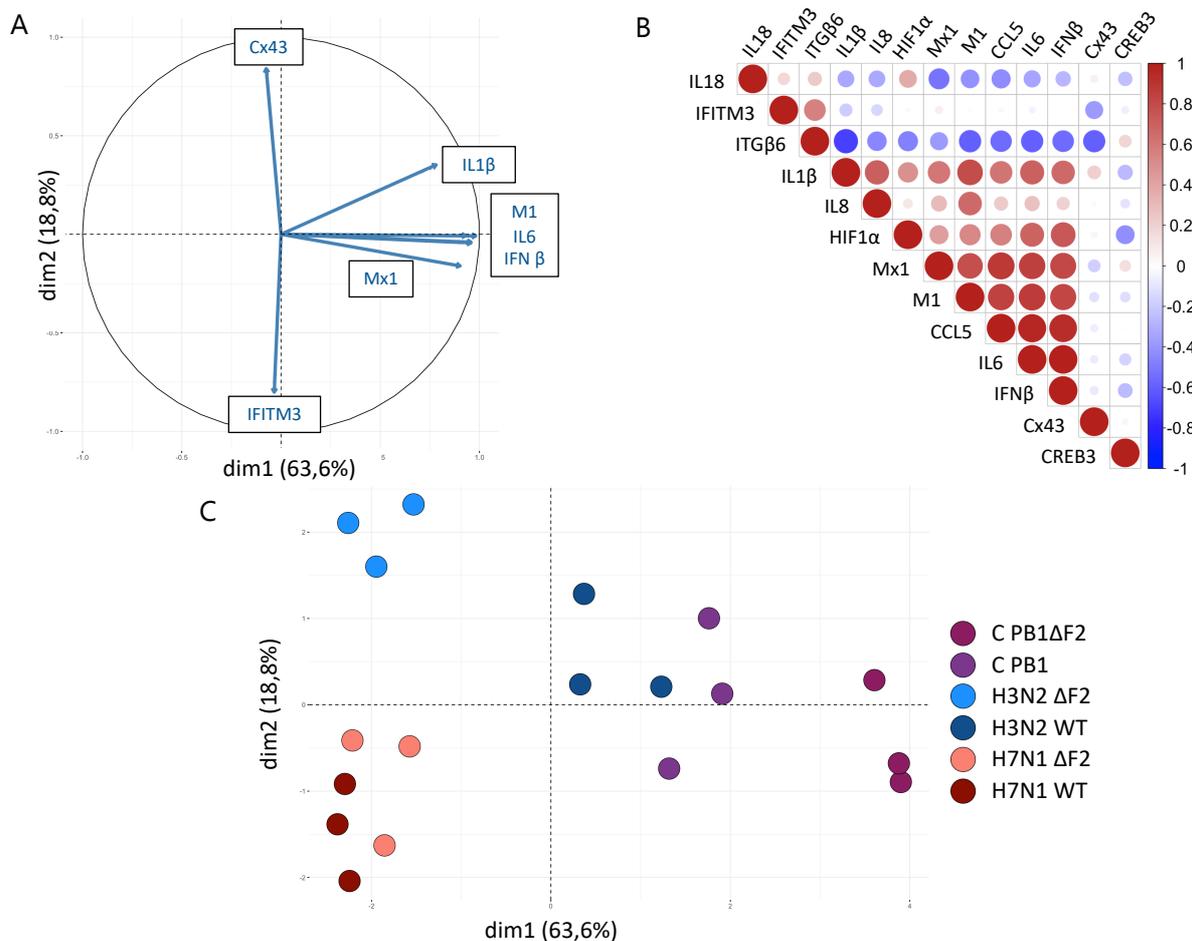


Figure 43 : caractérisation de la réponse cellulaire induite par l'infection par analyse en composantes principales.

Des cellules BEAS-2B ont été infectées avec une MOI de 3 durant 8 heures avec les virus H7N1, H3N2, C PB1 ainsi que leur homologue ΔF2. Une ACP a été réalisée à l'aide du logiciel R avec pour variables les expressions relatives de transcrits codants pour des gènes caractérisant la réponse de l'hôte. Seuls les gènes suffisamment bien représentés par l'ACP ont été conservés ($|\cos^2| > 0,7$). [A] Graphique de corrélation des variables. [B] Matrice de corrélation des variables (coefficient de Pearson). [C] Graphique des individus.

L'ACP réalisée permet d'expliquer plus de 80% de la variance entre les individus, ce qui est relativement satisfaisant, avec une contribution très majoritaire de l'axe 1 (près de 64%) (Figure 43A). Celui-ci est expliqué par des variables contribuant à la réponse inflammatoire (IL6, IL1β, CCL5) ou antivirale (IFNβ, Mx1) et au niveau de réplication virale (M1). Toutes sont corrélées positivement (Figure 43B et Figure 43C). L'axe 1 ségrège les virus étudiés selon trois groupes : les virus aviaires et H3N2 ΔF2/ H3N2 et C PB1/ C PB1ΔF2 ; cités par ordre croissant d'activation de la réponse inflammatoire et antivirale. Les expressions différentielles de certains transcrits observées précédemment entre les virus H3N2 WT et C PB1 en Figure 42 sont ainsi lissées et l'ACP estime que ces virus impactent de façon similaire le fonctionnement cellulaire. Par ailleurs, la contribution de M1 à l'axe 1 souligne l'importance de modérer les différences observées relativement au niveau de réplication virale non homogène entre les virus considérés,

notamment dans le cas du virus H3N2 ΔF2. L'axe 2 est malheureusement peu caractérisé car défini selon seulement deux variables : IFITM3 et Cx43, donc respectivement une fonction relative à la réponse antivirale et à la communication intercellulaire. Il permet de distinguer les virus aviaires du virus H3N2 ΔF2 et, dans une moindre mesure, ce dernier du virus H3N2 WT. De façon intéressante, ces deux variables sont anti-corrélées. Ainsi cela suggère, de façon hypothétique et en généralisant à l'échelle protéique, qu'une induction de la réponse antivirale liée à IFITM3 serait associée en parallèle à un impact *a priori* négatif sur la qualité de la communication intercellulaire.

Compte tenu des résultats générés par la quantification de l'ARNm IFNβ, nous avons par la suite souhaité évaluer l'impact de PB1-F2 sur l'activité IFNβ afin d'apporter une lecture à l'échelle protéique. Pour cela, un plasmide rapporteur luciférase sous le contrôle d'un promoteur présentant un motif de liaison à l'IFNβ a été utilisé. Des cellules BEAS-2B ont été transfectées avec cette construction puis infectées avec les différents virus étudiés. Les quantifications de l'activité luciférase sont présentées en Figure 44. Afin de permettre l'accumulation de la luciférase et ainsi optimiser la mesure du signal luminescent, les cellules ont été lysées à 16 heures pi plutôt que 8 heures pi comme cela était le cas précédemment. Nous observons que la protéine PB1-F2 du virus H3N2 présente une fonction pro-IFNβ. Au contraire, la PB1-F2 aviaire exprimée par le virus H3N2 possède une action opposée à la protéine native puisqu'elle inhibe l'activité IFNβ induite par le virus C PB1. Enfin, dans le cas de la souche H7N1, la protéine PB1-F2 n'est pas impliquée dans la réponse IFNβ développée par la cellule. L'activité IFNβ est donc corrélée ici au niveau de l'expression du gène.

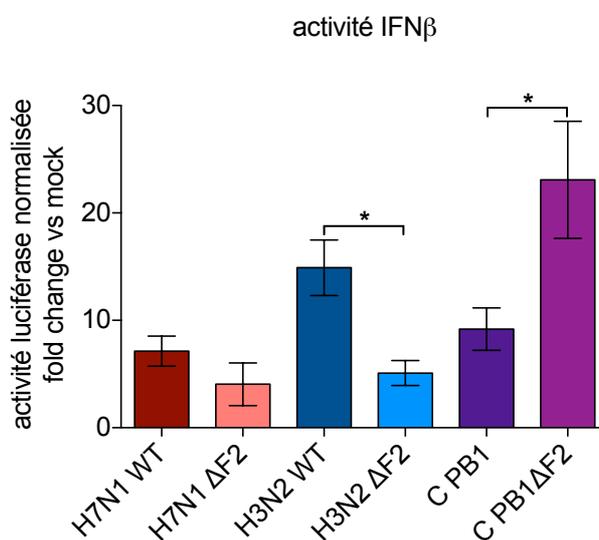


Figure 44 : impact de PB1-F2 sur l'activité IFNβ.

Des cellules BEAS-2B ont été co-transfectées avec les plasmides pIFNβ-luc et pCMV mCherry en tant que rapporteurs respectifs du niveau d'activation de la réponse inflammatoire et du taux de transfection. Ce dernier a été utilisé afin de normaliser les signaux de bioluminescence. Les cellules ont été infectées 24 heures après la transfection avec une MOI de 1. L'activité luciférase a été évaluée dans les lysats cellulaires à 16 heures pi. Les données représentent la valeur moyenne de l'activité luciférase normalisée ± écart type (n=4) ; * : p-value <0,05 (t-test).

Par conséquent, en modèles *in vitro*, nous n'observons pas de modulation de la réponse cellulaire médiée par la protéine PB1-F2 exprimée par le virus H7N1 quelle que soit l'espèce hôte considérée. Ainsi, PB1-F2 ne semble pas constituer un facteur contribuant à la pathogénicité de la souche aviaire étudiée, au regard des gènes considérés ici. Dans le cas de du virus H3N2, PB1-F2 semble présenter une fonction pro-inflammatoire et pro-IFN. L'introduction du segment PB1 aviaire au sein de la souche H3N2 se traduit par une surexpression de gènes liés à la réponse inflammatoire et antivirale. De façon surprenante, la protéine PB1-F2 H7N1 tend à limiter cette régulation apportée par le segment 2 aviaire dans le fond génétique H3N2. L'action de PB1-F2 en contexte chimérique serait ainsi opposée aux fonctions portées par les autres éléments du segment. Cela constituerait ainsi un gain de fonction pour la protéine PB1-F2 H7N1 puisque nous n'avons pas observé de rôle particulier de cette protéine dans la réponse inflammatoire lors de son expression au sein de son contexte viral natif.

4.2 Étude de l'impact de PB1-F2 sur la réponse de l'hôte *in vivo*

Suite aux observations en modèles cellulaires, nous avons souhaité étudier le rôle de la protéine PB1-F2 à l'échelle de l'organisme complet de l'hôte. Bien que pratiques et faciles d'accès, les cellules épithéliales immortalisées dégagent des conclusions caractérisant uniquement le type cellulaire considéré et peuvent ainsi ne pas refléter l'impact réel de l'infection. En effet, la dynamique dimensionnelle, la complexité cellulaire des tissus de l'appareil respiratoire et l'effet des communications intercellulaires inhérentes ne sont ainsi pas prises en considération. De plus, les fonctions de PB1-F2 diffèrent de façon importante entre un modèle de cellules épithéliales ou immunitaires. Le recours à un modèle *in vivo* permet d'englober les différentes propriétés de PB1-F2 et d'étudier son impact global au cours de l'infection. Nous nous sommes en conséquence appuyés sur un modèle d'œufs embryonnés de poule et sur un modèle murin.

4.2.1 Capacité des protéines de l'étude à fibriller

L'organisation structurale de la protéine PB1-F2 est dépendante de son environnement, désordonnée en milieux aqueux [538], elle adopte une structure secondaire composée de feuillets β dans un environnement membranaire [539]. Ce changement d'organisation peut se traduire par la formation d'oligomères solubles [541] et de fibres amyloïdes [539]. Or, les fonctions de PB1-F2 sont dépendantes de sa structure puisque certains assemblages présentent un caractère cytotoxique qui n'est pas retrouvé avec la protéine non structurée [542]. Alors que les cellules épithéliales ne constituent pas un environnement favorable à la formation spontanée de fibres amyloïdes, de telles structures ont été observées dans des monocytes infectés avec un virus exprimant PB1-F2. Par ailleurs, les fonctions de PB1-F2 diffèrent selon la position extra ou intracellulaire de la protéine. Ainsi, l'expression de PB1-F2 dans un modèle *in vivo* intégrant toute la diversité cellulaire permet de considérer ces différents aspects des propriétés de la protéine.

Dans le but de caractériser les protéines PB1-F2 recombinantes exprimées ici, nous avons souhaité évaluer leur propension à s'oligomériser sous forme de fibres amyloïdes. Pour cela, les propriétés de la Thioflavine T (ThT) ont été utilisées. Cette molécule fluorescente reconnaît de façon spécifique les fibres amyloïdes et cette interaction induit un changement de conformation de la ThT se traduisant par un décalage de la longueur d'onde maximale d'émission [578]. Le pic d'émission de la ThT sous forme liée est attendu aux alentours de 490 nm. Ce phénomène permet ainsi d'appréhender la quantité de fibres amyloïdes au sein d'un échantillon considéré et donc ici la quantité de protéines PB1-F2 sous forme fibrillée. La fibrillation de PB1-F2 nécessite une induction par la présence de SDS en tant qu'agent mimant des structures membranaires [539]. La protéine PB1-F2 de la souche A/WSN/1933 a été incluse en tant que contrôle positif et référence car déjà caractérisée précédemment par cette approche dans l'équipe [539]. L'analyse des résultats de mesure de fluorescence est ici empirique et ne donne pas accès à une quantification absolue des fibres amyloïdes présentes.

Toutefois, nous observons que les deux protéines de l'étude sont capables de former des fibres (Figure 45). Le signal mesuré avec la PB1-F2 H3N2 semble quelque peu inférieur à celui généré par la souche H7N1. De plus, un décalage du pic d'émission est notable dans le cas de la PB1 H7N1, ce qui est assez surprenant car cette propriété est inhérente à la ThT et donc non dépendante de son environnement. Cet évènement a été observé dans deux expériences indépendantes.

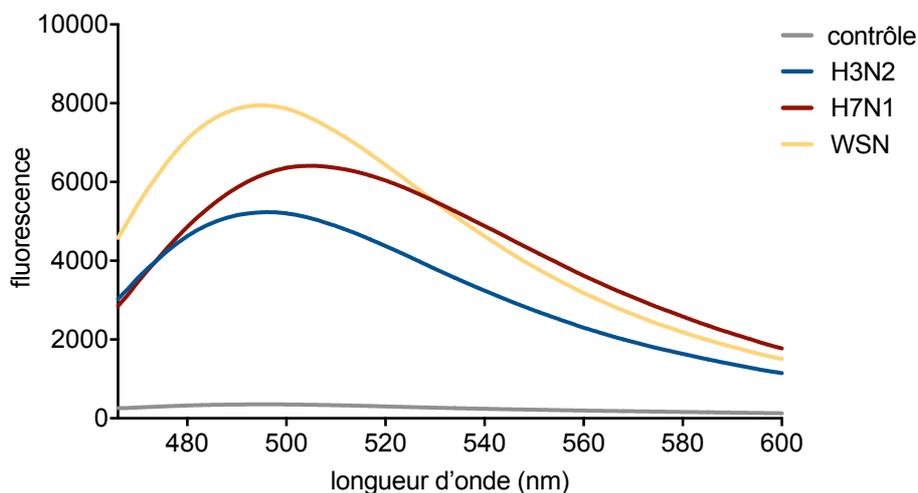


Figure 45 : capacité des protéines PB1-F2 étudiées à former des fibres.

L'augmentation du signal fluorescent produit par la ThT suite à sa liaison avec des structures amyloïdes générées en exposant protéines PB1-F2 recombinantes par du SDS a été mesurée. Les concentrations finales appliquées ont été respectivement 25 μ M, 5 μ M et 0,01%. Les courbes représentent la moyenne de trois réplicats techniques par condition.

Cette approche permet ainsi de valider *in vitro* la capacité des deux protéines PB1-F2 étudiées à adopter une organisation sous forme de fibres amyloïdes, propriété pouvant contribuer au caractère pro-inflammatoire de la protéine.

4.2.2 L'expression de la protéine PB1-F2 n'a pas d'impact sur la capacité répliquative et le tropisme de la souche H7N1 lors de l'infection d'œufs embryonnés

Une étude conduite avec une souche LPAI H9N2 a déterminé que, dans certaines conditions, l'expression de la protéine PB1-F2 réduisait la virulence chez le poulet [488]. De plus, cet évènement s'accompagne d'une prolongation du temps d'excrétion virale au niveau de la sphère oro-pharyngée et d'une diffusion plus fréquente du virus vers la sphère digestive. Compte tenu de ces observations, nous avons ainsi souhaité infecter des poulets avec des virus H7N1 WT et Δ F2 exprimant la nanoluciférase. L'usage de ces virus offrait la possibilité de localiser et de quantifier rapidement et facilement la répliquative virale sur la totalité des tissus de l'animal. Ainsi, en sus de la caractérisation de l'impact de PB1-F2 dans la pathologie du virus et sur la réponse de l'hôte induite, des informations concernant le tropisme dynamique auraient pu être collectées. Toutefois, compte tenu des contraintes de biosécurité, l'infection de poulets par les virus nanoluc n'a pas pu être mise en œuvre et nous nous sommes reportés sur un modèle plus simple à manipuler que constituent les œufs de poule embryonnés. Ainsi,

à 11 jours de développement embryonnaire, des œufs ont été infectés avec 50 PFU des virus H7N1 WT-NL et Δ F2-NL. A 24 heures pi, nous avons observé un taux de mortalité (absence de mouvement de l'embryon et/ou hémolyse des vaisseaux sanguins) plus important chez les œufs infectés avec le virus WT (30% vs 9,5%). Cet écart se réduit à 48 heures pi puisqu'une mortalité importante est survenue au sein du groupe infecté avec le virus Δ F2 (28%) tandis que celle-ci a peu progressé dans le groupe WT (35%). Bien que la différence s'estompe à 48 heures pi, l'expression de PB1-F2 semble être associée au développement d'une pathologie plus rapide et importante. L'activité luciférase des virus a été mesurée à 24 et 48 heures pi. Nous avons opté pour injecter le substrat (furimazine) dans la cavité allantoïque afin de s'appuyer sur le système sanguin de l'embryon comme voie d'accès du substrat à ses cellules. Après un temps d'incubation, les signaux bioluminescents produits ont été mesurés *in ovo*, dans le liquide allantoïque et au niveau de l'embryon. Nous n'avons observé aucune différence significative quels que soient l'entité et le temps post-infection considérés (Figure 46A à F). Ainsi, la protéine PB1-F2 n'est pas impliquée dans la capacité répliquative du virus H7N1-NL sur des œufs embryonnés. Le virus H7N1 Δ F2-NL semble se répliquer plus efficacement, mais il s'agit d'une tendance non supportée par la variabilité des réplicats biologiques.

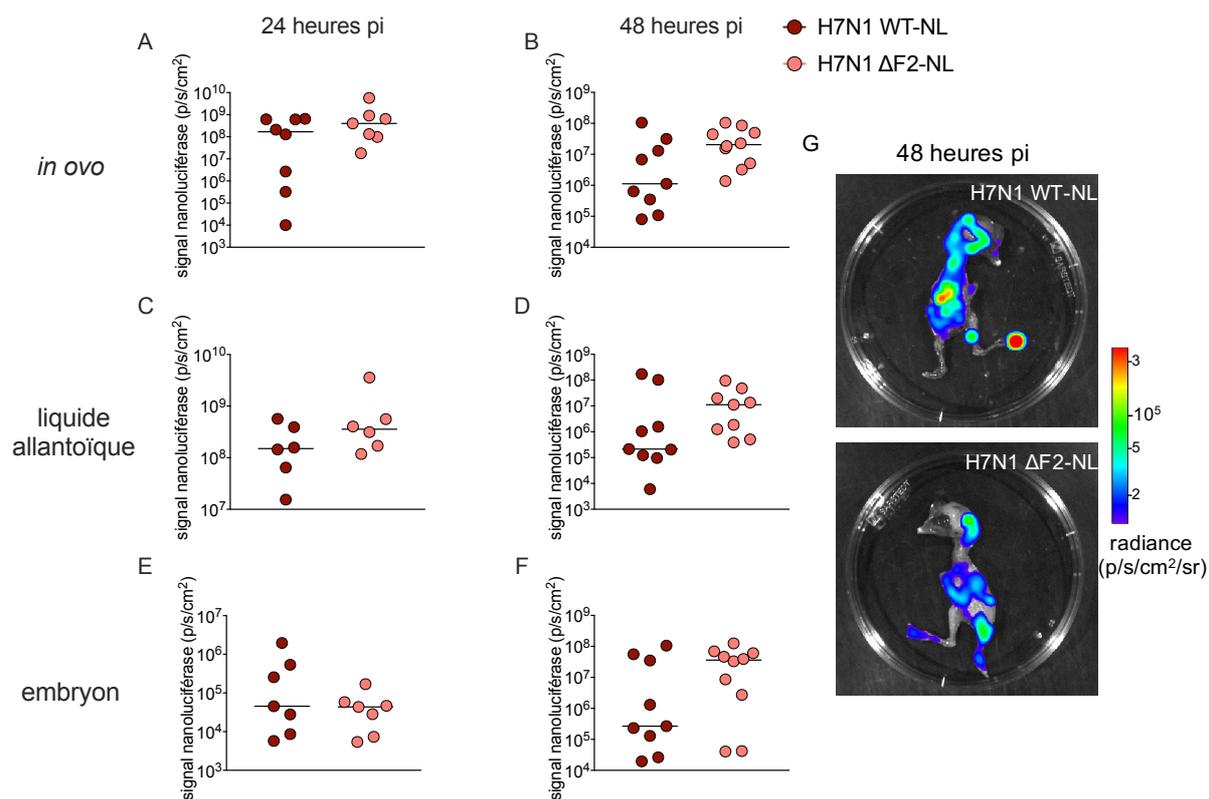


Figure 46 : infection d'œufs de poulet embryonnés avec les virus H7N1 WT-NL et Δ F2-NL.

Des œufs de poule embryonnés ont été infectés à 11 jours de développement embryonnaire avec les virus H7N1 WT-NL ou Δ F2-NL à raison de 50 PFU/œufs. L'activité nanoluciférase a été mesurée à 24 heures pi *in ovo* [A], dans le liquide allantoïque [C] et sur l'embryon [E] ainsi qu'à 48 heures pi sur les mêmes éléments [B;D;F] par injection de furimazine dans le liquide allantoïque. La barre horizontale représente la valeur médiane. [G] Visuels photographiques associés pour un embryon représentatif du groupe considéré. L'échelle correspond à la radiance moyenne (flux total intégré et normalisé par rapport à la surface considérée et l'angle solide, photons/seconde/cm²/stéradian).

Par ailleurs, la localisation des zones de réplication virale n'a pas révélé de tropisme particulier associé à l'expression de PB1-F2 (Figure 46G). Nous observons une activité virale majoritairement localisée au niveau de la tête et de la zone dorsale. Compte tenu du positionnement de l'embryon, il est envisageable que ce phénomène soit en réalité de l'opportunisme et corresponde aux tissus les plus accessibles aux virus.

Ainsi, ces données indiquent que la protéine PB1-F2 semble accélérer la pathologie associée au virus H7N1 sur des œufs embryonnés. Cette observation n'est pas corrélée à une capacité de réplication virale significativement favorisée par l'expression de la protéine ou à une dispersion particulière du virus au sein des tissus de l'embryon.

4.2.3 Contribution de la protéine PB1-F2 dans la pathologie de la souche H7N1 dans un modèle de franchissement de la barrière d'espèce

4.2.3.1 Double acquisition d'activités luciférases en modèle murin

Parmi les travaux décrivant l'impact de PB1-F2 sur la réponse inflammatoire, une étude conduite au sein du laboratoire a identifié une fonction pro-inflammatoire de la protéine issue de la souche WSN (H1N1) chez la souris en contexte infectieux [499]. Un des supports employés est l'usage de souris transgéniques dont le génome intègre une cassette luciférase rapportant l'activité NF- κ B (souris NF- κ B-luciférase ou NF- κ B-luc). La famille NF- κ B regroupe cinq facteurs de transcription inductibles : NF- κ B1, NF- κ B2, RelA, RelB et c-Rel. Ils régulent notamment l'expression de nombreux gènes pro-inflammatoires et constituent une voie d'activation de l'inflammasome NLRP3 (revue [579]). L'insertion de la cassette NF- κ B-luciférase dans le génome des souris résulte en la synthèse de la luciférase firefly sous contrôle d'un promoteur activé par NF- κ B. Le signal bioluminescent généré suite à l'administration du substrat reflète l'activité de la luciférase et donc par extension le niveau inflammatoire de l'animal qui peut être quantifié.

Les expériences précédentes réalisées en modèle cellulaire suggèrent une modulation de la réponse inflammatoire par PB1-F2 différentielle selon la souche virale considérée. L'usage de souris NF- κ B-luciférase nous offre la possibilité de valider *in vivo* ces résultats par une approche cinétique et donc de tenter de cartographier finement l'intervalle d'action de PB1-F2. Une modulation de la réponse inflammatoire pouvant être attribuée à un niveau répliatif inégal, nous avons utilisé pour ces expériences des virus exprimant la nanoluciférase afin d'être en mesure d'évaluer l'activité virale en parallèle de celle NF- κ B. Ainsi, les jours d'acquisition, nous avons premièrement mesuré l'activité de la luciférase firefly (inflammation) puis, 7 heures après, celle de la nanoluciférase (réplication virale). La séquence d'acquisition est basée sur la durée de persistance du signal bioluminescent afin d'éviter de biaiser une mesure par un signal résiduel de l'acquisition précédente. En effet, celle de la nanoluciférase est 2,5 fois plus longue par rapport à la luciférase firefly [580]. Nous avons donc choisi d'évaluer l'activité de la nanoluciférase en second afin de l'espacer au maximum de la mesure de bioluminescence luciférase firefly le lendemain. La décroissance du signal luciférase firefly a été vérifiée de façon

empirique en imageant des animaux sans ajout de substrat au moment de l'acquisition de l'activité de la nanoluciférase (Figure 47).

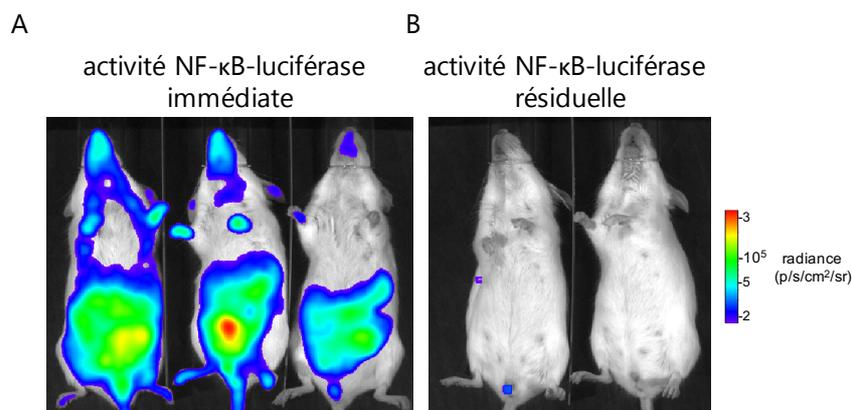


Figure 47 : évaluation de la persistance du signal luciférase firefly.

L'activité luciférase firefly basale a été mesurée sur des souris NF-κB-luc contrôle par injection de D-luciférine par voie intranasale [A]. Puis, 7 heures après, une seconde acquisition a été réalisée sans ajout de substrat afin d'évaluer le signal résiduel [B]. L'échelle correspond à la radiance moyenne (flux total intégré sur l'animal entier et normalisé par rapport à la surface considérée et l'angle solide, photons/seconde/cm²/stéradian).

4.2.3.2 La protéine PB1-F2 H7N1 exacerbe la pathologie en modèle murin

Des souris NF-κB-luc ont été infectées avec une dose 10⁵ PFU par animal de virus H7N1 WT-NL ou son homologue mutant ΔF2-NL. Le suivi physiologique des animaux inclut un relevé quotidien du poids et de la température rectale (Figure 48A et Figure 48B). Il est à noter que la souris ne développe pas de fièvre suite à une infection grippale mais une hypothermie qui est corrélée positivement à la pathogénicité du virus.

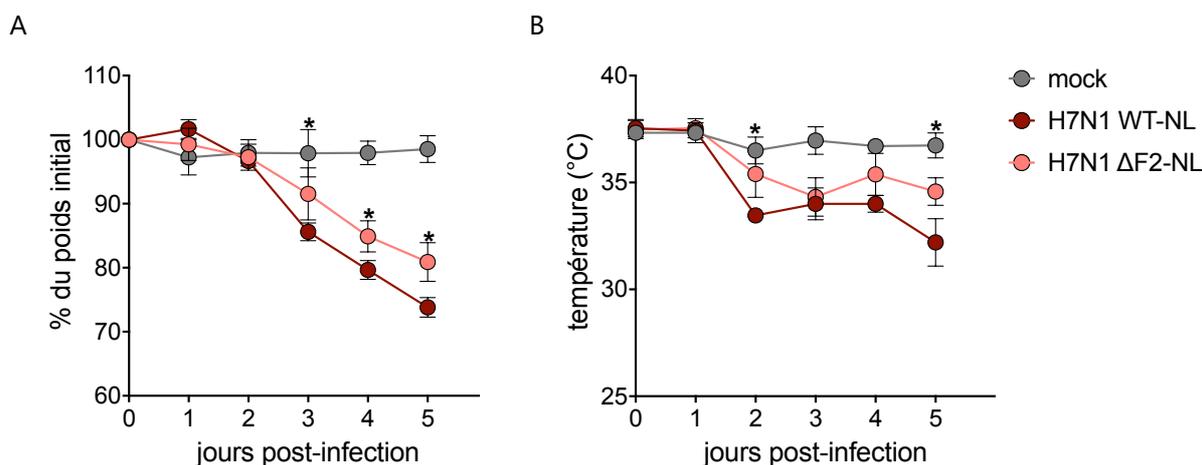


Figure 48 : suivi clinique de souris NF-κB-luc infectées avec les virus H7N1 WT-NL ou ΔF2-NL.

Des souris NF-κB-luc ont été infectées avec les virus H7N1 WT-NL ou ΔF2-NL (n=5) à raison de 10⁵ PFU/animal. Le poids [A] et la température rectale des souris [B] ont été relevés quotidiennement. Les données représentent la valeur moyenne ± écart type ; * : p-value < 0,05 (test de Mann-Whitney, H7N1 WT-NL vs H7N1 ΔF2-NL).

Les animaux ont développé des signes cliniques sévères, notamment ceux appartenant au groupe infecté avec le virus WT-NL qui ont atteint les points limites de l'expérimentation,

ce qui souligne la capacité du virus aviaire H7N1 à infecter un hôte mammifère sans adaptation préalable. La délétion de PB1-F2 est associée à une perte de poids et une hypothermie moins importantes et ce dès l'apparition des signes cliniques pour le poids (3 jours pi). Ainsi, dans ce modèle, PB1-F2 contribue à la pathogénicité de la souche H7N1-NL, agit comme un facteur de virulence et contribue à la mortalité.

En complément de ces éléments, une évaluation des paramètres respiratoires des animaux a également été réalisée par pléthysmographie (présentation de la technique dans le matériels et méthodes, en page 88, 3.11.4 Analyse des paramètres respiratoires). Nous nous sommes appuyés sur la penh, indicateur reflétant la détresse respiratoire de l'animal. Une augmentation de la penh a été observée suite à l'infection par les virus H7N1 WT-NL et Δ F2 (Figure 49). Une tendance de la protéine PB1-F2 à accentuer la détresse respiratoire est notable à 5 jours pi. Cela rejoint les relevés de poids et température qui indiquent des signes cliniques plus sévères lorsque PB1-F2 est exprimée. En outre, cette tendance pourrait souligner une fonction pro-inflammatoire de PB1-F2.

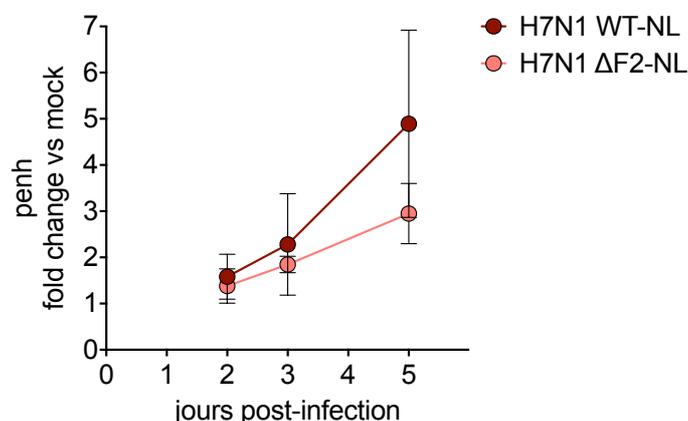


Figure 49 : évaluation de la détresse respiratoire

Des souris NF- κ B-luc ont été infectées avec les virus H7N1 WT-NL ou Δ F2-NL (n=5) à raison de 10^5 PFU/animal. Le niveau de détresse respiratoire a été évalué à 2, 3 et 5 jours pi. Les données représentent la valeur moyenne \pm écart type.

La réplication virale a été quantifiée à 1, 2, 3 et 5 jours pi par mesure de l'activité nanoluciférase. A l'exception du premier jour post-infection, la délétion de PB1-F2 n'est pas associée à une capacité répliquative différentielle par rapport au virus WT (Figure 50A et Figure 50B). Une tendance persiste durant la cinétique mais elle n'est pas significative. Ainsi, selon l'évaluation de l'activité nanoluciférase, les deux virus considérés présentent des cinétiques de réplication globalement similaires. Cela permet d'envisager l'analyse de la réponse de l'hôte sans biais lié à une quantité de virus différente entre les virus H7N1 et WT-NL et Δ F2-NL.

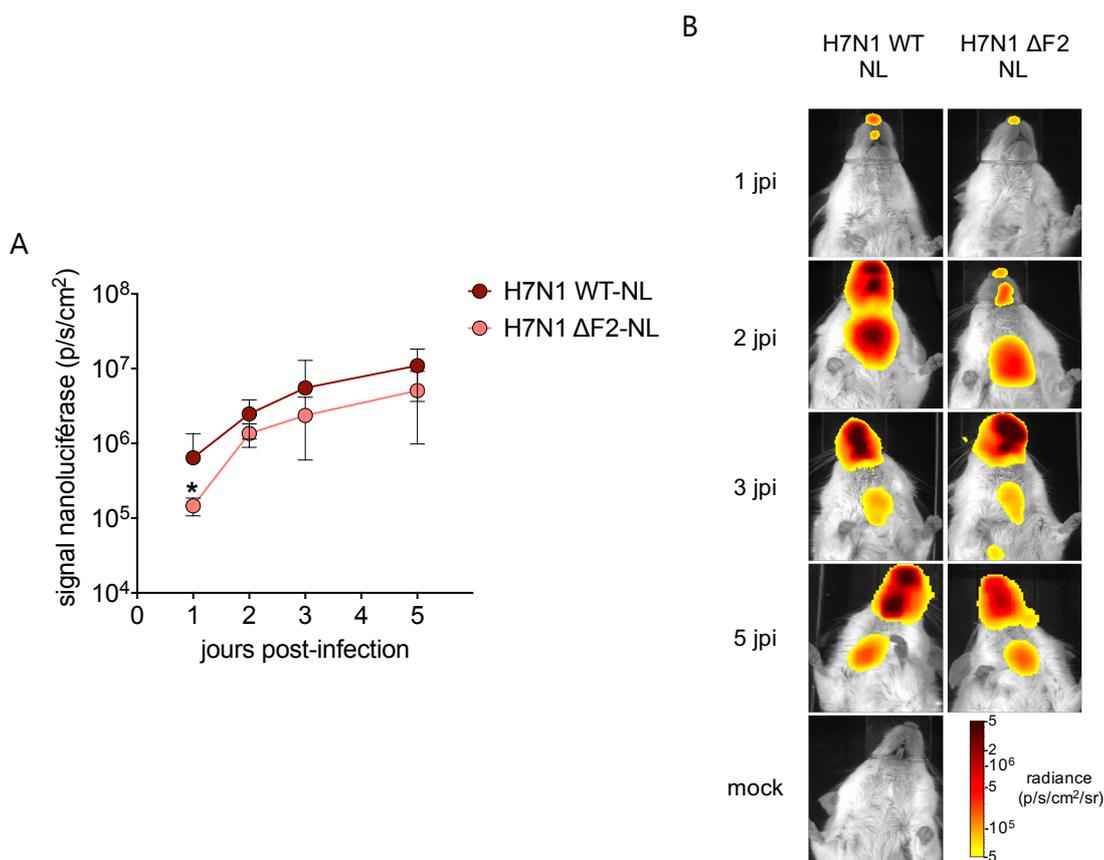


Figure 50 : cinétique de réplication des virus H7N1 WT-NL et ΔF2-NL chez des souris NF-κB-luc.

Des souris NF-κB-luc ont été infectées avec les virus H7N1 WT-NL ou ΔF2-NL (10⁵ PFU/animal). [A] Le signal bioluminescent généré par l'activité nanoluciférase a été mesuré à 1, 2, 3 et 5 jours pi (jpi, n=5 ; excepté à 5 jours pi pour le groupe WT où n=4) par injection de furimazine par voie intranasale. Les valeurs de luminescence représentent le flux total intégré sur la zone du tractus respiratoire et normalisé par rapport à la surface considérée (photons/seconde/cm²). [B] Les visuels photographiques associés sont présentés pour un animal représentatif du groupe considéré. L'échelle correspond à la radiance moyenne (flux total intégré et normalisé par rapport à la surface considérée et l'angle solide, photons/seconde/cm²/stéradian). Les données représentent la valeur moyenne ± écart type ; * : p-value < 0,05 (test de Mann-Whitney).

L'évolution de l'activité NF-κB des animaux a été évaluée en parallèle de la réplication virale. Tandis que les souris infectées avec le virus H7N1 ΔF2-NL présentent un niveau inflammatoire proche de celui observé dans le groupe contrôle tout au long de la cinétique, le virus WT initie une activation de la voie NF-κB à partir de 2 jours pi (Figure 51A et Figure 51B). L'activité NF-κB maximale est atteinte à 3 jours pi dans les deux groupes. Les virus considérés présentant des niveaux de réplication similaires, cette différence peut être associée à des propriétés spécifiques de PB1-F2 et non à une conséquence directe d'une quantité de virus inégale. Cela indique donc une fonction pro-inflammatoire de cette protéine. Cependant, cette observation reste une tendance compte tenu de l'importante variabilité intra-groupe et l'effectif du groupe H7N1 WT-NL réduit à une seule souris à 5 jours pi, les autres ayant dû être euthanasiées car elles présentaient des signes cliniques trop importants. L'expression de PB1-F2 joue ainsi un rôle sur la mortalité induite. De plus, il est intéressant de noter que la localisation des tissus inflammatoires ne se limite pas aux zones de réplication du virus mais s'étend à la cavité abdominale. Cette observation est relativement singulière étant donné que

le tractus digestif ne constitue pas un site réplcatif. Cependant, des animaux non infectés présentent une activité NF- κ B basale principalement concentrée dans cette zone. Ainsi, l'induction de l'activité NF- κ B au niveau du tissu digestif ne semble pas être une conséquence directe de l'infection mais son amplification est associée à l'action du virus.

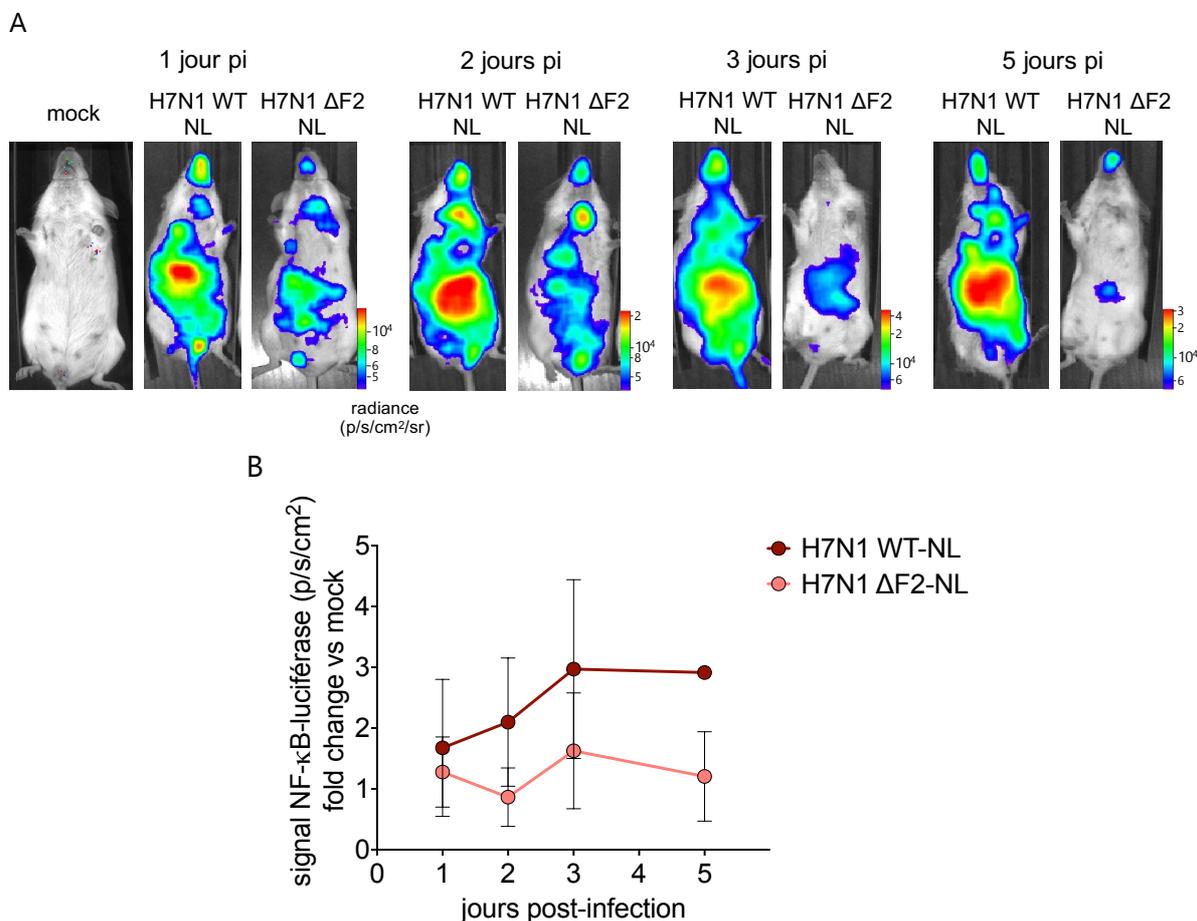


Figure 51 : cinétique de la réponse inflammatoire chez des souris NF- κ B-luc infectées par les virus H7N1 WT-NL ou Δ F2-NL.

Des souris NF- κ B-luc ont été infectées avec les virus H7N1 WT-NL ou Δ F2-NL (10^5 PFU/animal). [A] Le signal bioluminescent généré par l'activité de la luciférase firefly a été mesuré à 1, 2, 3 et 5 jours pi (n=5 ; excepté à 5 jours pi pour le groupe WT où n=1) par injection de D-luciférine par voie intranasale. Les valeurs de luminescence représentent le flux total intégré sur l'animal entier et normalisé par rapport à la surface considérée (photons/seconde/cm²). [B] Les visuels photographiques associés sont présentés pour un animal représentatif du groupe considéré. L'échelle correspond à la radiance moyenne (flux total intégré et normalisé par rapport à la surface considérée et l'angle solide, photons/seconde/cm²/stéradian). Les données représentent la valeur moyenne \pm écart type.

Les poumons des animaux ont été échantillonnés à 5 jours pi et l'ARN total extrait dans le but d'analyser la réponse transcriptomique de l'hôte par PCR quantitative. L'usage des souris transgéniques ayant révélé un impact de PB1-F2 sur l'activité NF- κ B, nous nous sommes intéressés à l'expression des facteurs de transcription de cette famille et notamment RELB. L'infection a eu pour conséquence une augmentation de la transcription de ce gène et la protéine PB1-F2 joue un rôle dans ce phénomène (Figure 52A). Nous retrouvons ainsi à l'échelle transcriptomique les résultats observés précédemment *via* la mesure de l'activité NF- κ B. Bien qu'induite par NF- κ B [581], l'IL6 n'a pas été modulée par PB1-F2 (Figure 52B).

L'inflammasome NLRP3 étant activé par NF- κ B [579] et PB1-F2 [364,508,534], l'expression de la caspase 1 et de l'IL1 β a été évaluée car ces protéines sont des indicateurs du fonctionnement du complexe. En effet, la caspase 1 est directement activée par NLRP3, puis celle-ci permet la production d'IL1 β mature par clivage de son précurseur [348]. La protéine PB1-F2 favorise l'expression de la caspase 1 (Figure 52C) mais ne présente pas d'action sur celle de l'IL1 β (Figure 52D). Cependant, l'analyse réalisée à l'échelle du gène transcrit ne permet pas de projection quant à la quantité de protéine exprimée en aval puisque cette issue est dépendante de nombreux déterminants autres que l'abondance de transcrits. D'autre part, la maturation de l'IL1 β étant essentielle à son fonctionnement, l'activité de cette protéine peut être induite par PB1-F2, éventuellement via la surexpression de la caspase 1, sans que cela ne soit visible d'un point de vue transcriptomique.

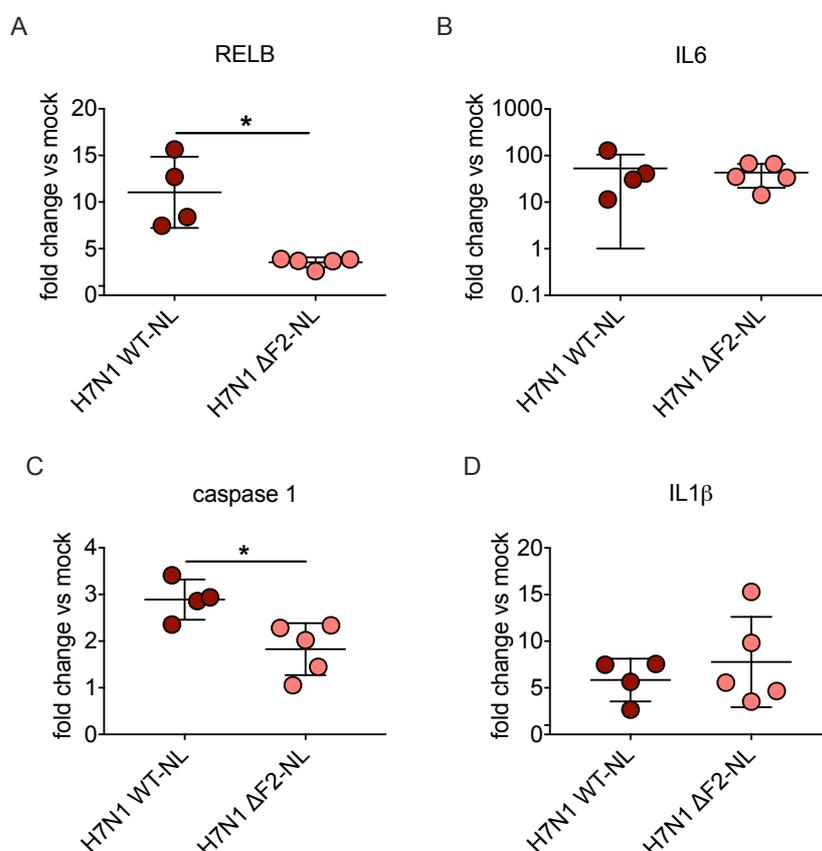


Figure 52 : quantification de cytokines pro-inflammatoires au sein de poumons de souris NF- κ B-luc infectées par les virus H7N1 WT-NL ou Δ F2-NL.

Des souris NF- κ B-luc ont été infectées avec les virus H7N1 WT-NL ou Δ F2-NL (10^5 PFU/animal) et l'ARN total des poumons extrait à 5 jours pi. Les expressions relatives des transcrits codant l'IL6 [A], l'IL1 β [B], RELB [C] et la caspase 1 [D] ont été déterminées par qPCR. Les données représentent la valeur moyenne \pm écart type ; * : p-value < 0,05 (test de Mann-Whitney).

En sus de la réponse inflammatoire, nous avons observé un impact de PB1-F2 sur l'activité antivirale. En effet, le niveau de transcription des gènes codant l'IFN β et Mx1 est plus important dans les poumons des souris infectées avec le virus exprimant PB1-F2 (Figure 53A et Figure 53B). L'effet pro-IFN de PB1-F2 est particulièrement prononcé, nous observons en effet près d'un log₁₀ de différence entre le virus WT et Δ F2. Étant dans un modèle *in vivo*, nous sommes intéressés à l'expression de chimiokines afin d'apporter des éléments de lecture

quant à l'impact de PB1-F2 sur le recrutement de cellules immunitaires. L'expression du transcrit codant la protéine CXL10 est induite par la protéine PB1-F2 (Figure 53C). Cette chimiokine est décrite pour son implication dans le trafic des cellules NK [582] ou reflète la présence de différents types de cellules immunitaires (mastocytes [583], neutrophiles [584]). Enfin, nous avons observé en modèle cellulaire que le virus H7N1 induisait l'expression de l'ARNm codant l'intégrine $\beta 6$ (ITG $\beta 6$) en cellules humaines et ce phénomène était non dépendant de PB1-F2. A l'inverse, en modèle murin, l'expression d'ITG $\beta 6$ est fortement réprimée par l'infection et PB1-F2 y contribue (Figure 53D).

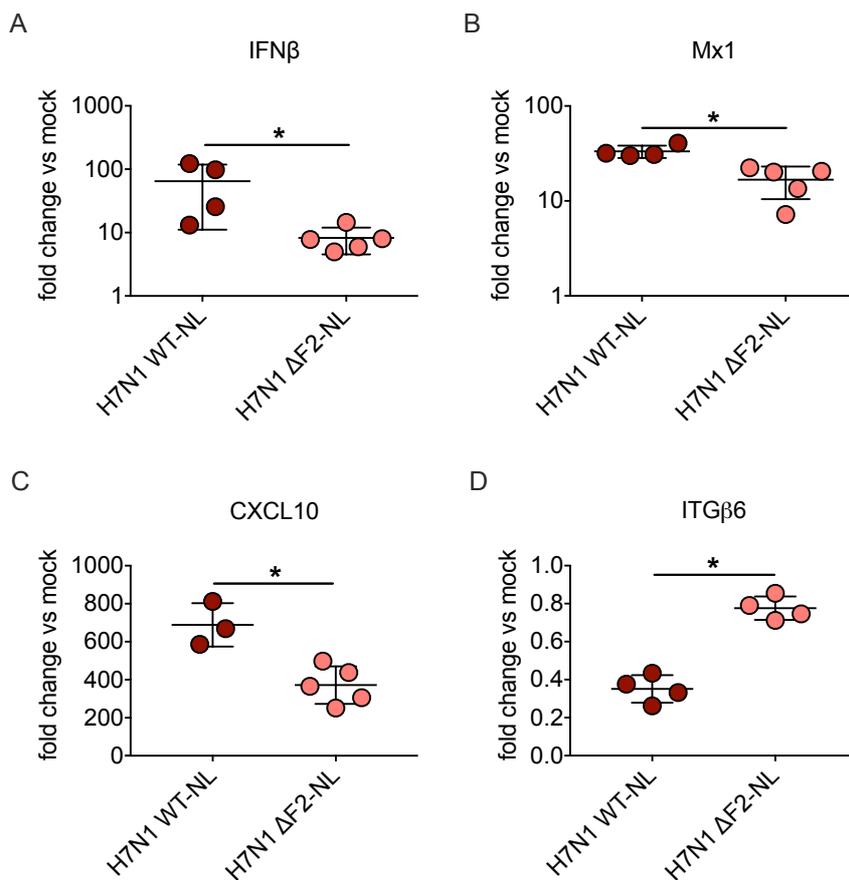


Figure 53 : analyse de la réponse transcriptomique pulmonaire de souris NF- κ B-luc infectées par les virus H7N1 WT-NL ou Δ F2-NL.

Des souris NF- κ B-luc ont été infectées avec les virus H7N1 WT-NL ou Δ F2-NL (10^5 PFU/animal) et l'ARN total des poumons extrait à 5 jours pi. Les expressions relatives des transcrits codant l'IFN β [A], Mx1 [B], CXCL10 [C] et l'ITG $\beta 6$ [D] ont été déterminées par qPCR. Les données représentent la valeur moyenne \pm écart type ; * : p-value < 0,05 (test de Mann-Whitney).

Le génome viral a également été quantifié par qPCR sur la base de l'expression de l'ARNm du gène M1 et révèle un niveau de répllication légèrement inférieur suite à la délétion de PB1-F2 (Figure 54). Cette différence n'a pas été observée par mesure de l'activité nanoluciférase, témoignant de la sensibilité moindre de cette technique par rapport à la qPCR. L'écart observé est néanmoins plutôt modéré (inférieur à un \log_{10}). De plus, les poumons ont été échantillonnés à une phase tardive de l'infection où les animaux présentaient des signes cliniques importants. Dans cette situation d'hyper-inflammation, il est envisageable que la zone d'une dose-réponse linéaire entre la quantité de virus et l'amplitude de l'induction de gènes

de l'immunité innée ait été dépassé. Par exemple, dans un modèle d'infection sévère chez la souris équivalent au notre en termes de pathogénicité, la concentration en IFN β mesurée dans les lavages bronchoalvéolaires est similaire entre deux doses d'infection espacées d'un facteur 10 [385]. Ainsi, ainsi nous supposons que la différence de quantité en ARNm M1 entre les virus WT et Δ F2 ne justifie pas l'entièreté des modulations de la réponse de l'hôte observées. Par ailleurs, la quantité d'ARNm ne reflète pas linéairement le nombre de particule virales produites.

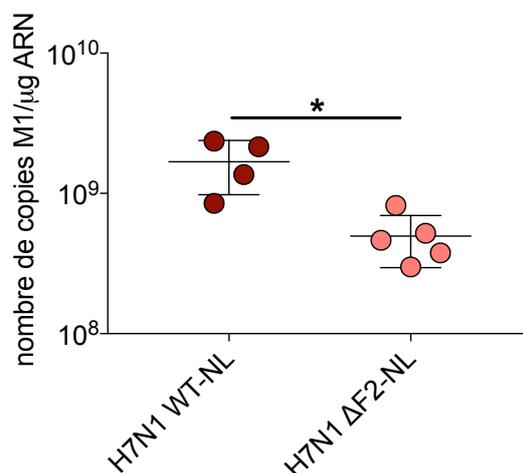


Figure 54 : quantification du génome viral dans les poumons de souris NF- κ B-luc infectées par les virus H7N1 WT-NL ou Δ F2-NL.

Des souris NF- κ B-luc ont été infectées avec les virus H7N1 WT-NL ou Δ F2-NL (10^5 PFU/animal) et l'ARN total des poumons extrait à 5 jours pi. L'ARN total des poumons a été extrait puis une quantification absolue de l'expression du segment d'ARNm M1 a été réalisée par qPCR. Les données représentent la valeur moyenne \pm écart type ; * : p-value < 0,05 (test de Mann-Whitney).

L'infection de souris NF- κ B-luciférase avec des virus H7N1-NL nous a permis dans un premier temps d'observer la susceptibilité des animaux à une souche aviaire sans adaptation préalable. Cela souligne le potentiel zoonotique de la souche utilisée et donc la pertinence de son emploi dans notre étude. La protéine PB1-F2 est impliquée dans la surexpression de gènes liés à la réponse immunitaire innée et contribue à la sévérité des signes cliniques développés. Ces éléments attribuent à PB1-F2 un rôle de facteur de virulence dans un modèle d'infection de souris avec une souche aviaire LPAI. Par ailleurs, ces résultats ne corroborent pas totalement l'analyse réalisée en cellules épithéliales bronchiques humaines. En effet, *in vitro*, le virus H7N1 n'induisait pas une surexpression massive de gènes liés à la réponse inflammatoire et aucune modulation médiée par PB1-F2 n'a été identifiée. Cela souligne l'importance de l'impact de PB1-F2 sur les cellules immunitaires dans la définition des propriétés de la protéine.

4.2.3.3 La protéine PB1-F2 H7N1 perturbe la perméabilité intestinale en modèle murin

La mesure de l'activité NF- κ B a révélé que les sites inflammatoires induits par l'infection ne se limitent pas au tractus respiratoire mais incluent également la cavité abdominale. Nous avons souhaité étudier si cette propriété pouvait avoir un impact physiologique sur l'appareil digestif en s'appuyant sur la mesure de la perméabilité intestinale comme indicateur de l'état de l'organe. Pour cela, des souris BALB/c ont été infectées avec la même dose que

précédemment (10^5 PFU par animal) avec les virus H7N1 WT-NL et H7N1 Δ F2-NL.

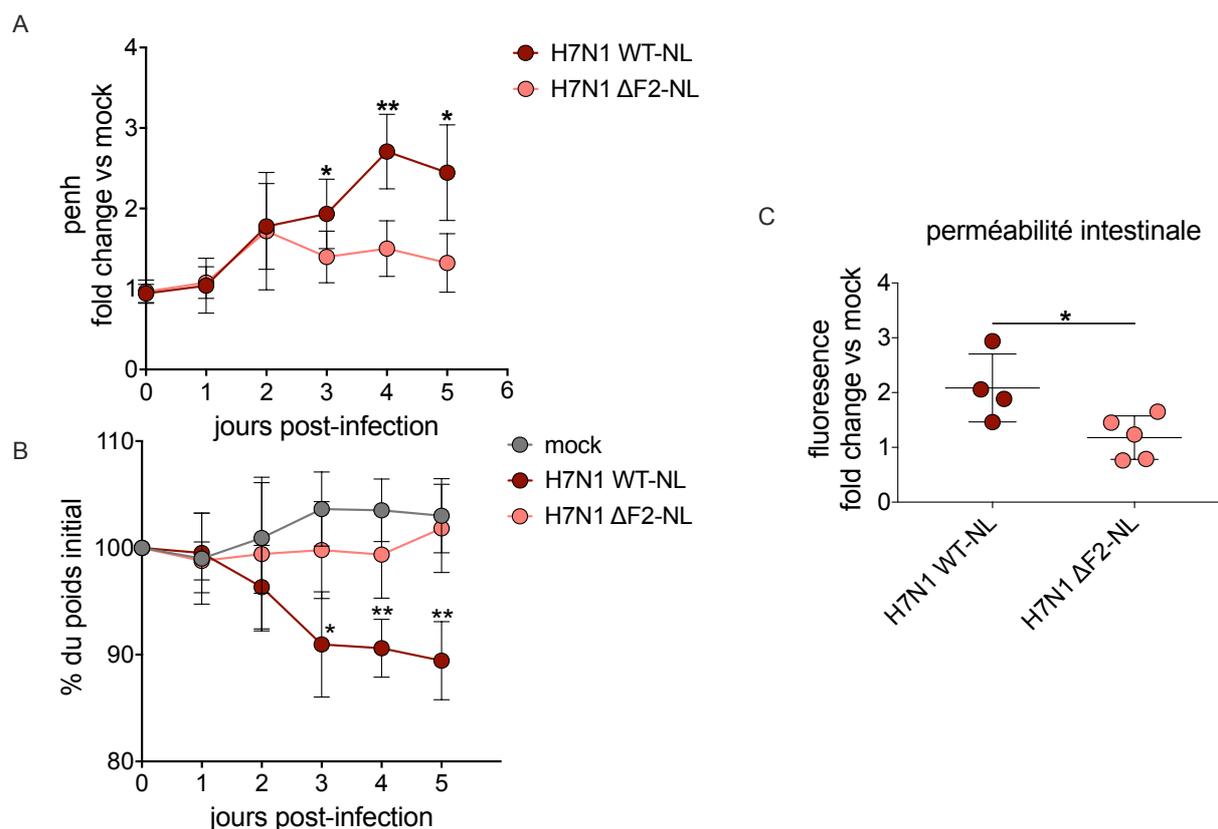


Figure 55 : évaluation de la perméabilité intestinale sur des souris BALB/c infectées par les virus H7N1 WT-NL ou H7N1 Δ F2-NL.

Des souris BALB/c ont été infectées avec les virus H7N1 WT-NL ou Δ F2-NL (10^5 PFU/animal). Le poids (n=10) [A] et le niveau de détresse respiratoire (n=6) [B] des souris ont été relevés quotidiennement. La perméabilité intestinale a été évaluée à 5 jours pi par mesure dans le sérum du signal fluorescent généré par le réactif FITC-dextran administré par gavage [C]. */**: Les données représentent la valeur moyenne \pm écart type ; p-value < 0,05/0,01 (test de Mann-Whitney, H7N1 WT-NL vs Δ F2-NL).

Au cours de cette expérimentation, les souris BALB/c ont développé des signes cliniques bien plus modérés que ceux observés en souris NF- κ B-luciférase, bien que la dose d'infection soit identique. Cet effet peut être potentiellement expliqué par un fond génétique différent des animaux mais surtout par l'absence de mesures répétées de bioluminescence *in vivo* (instillation du substrat par voie intranasale). Cela a permis de confirmer l'impact de PB1-F2 sur la pathogénicité induite puisque les animaux infectés avec le virus Δ F2 n'ont pas perdu de poids (Figure 55A). De plus, le suivi de la pénih a validé significativement l'impact négatif de PB1-F2 sur la capacité respiratoire (Figure 55B). A 5 jours pi, le réactif FITC-dextran a été administré par gavage aux animaux. Il s'agit d'un polymère d'anhydroglucose de faible poids moléculaire (4 kDa) et n'interagissant pas avec les protéines membranaires, caractéristiques lui permettant de franchir les barrières épithéliales et endothéliales. Le signal fluorescent mesuré dans le sérum des animaux est ainsi corrélé positivement au niveau de perméabilité de l'organe considéré. L'infection a provoqué une légère augmentation de la perméabilité intestinale (Figure 55C) ce qui apporte donc une conséquence physiologique à l'inflammation observée précédemment. A l'inverse, les souris infectées avec le virus Δ F2-NL présentent un niveau de

perméabilité intestinale équivalent à celui du groupe contrôle. Ainsi, PB1-F2 contribue à l'augmentation de la perméabilité digestive. Cette différence est ainsi cohérente avec les résultats obtenus par mesure de l'activité NF- κ B.

En résumé, en modèle murin, la protéine PB1-F2 est un facteur de virulence majeur de la souche H7N1 étudiée. PB1-F2 présente une forte activité pro-inflammatoire et altère l'intégrité du tractus digestif. Cela se traduit par une contribution importante de PB1-F2 à la sévérité des signes cliniques développés.

4.2.4 Caractérisation de la modulation de la réponse de l'hôte générée par un virus H3N2 selon l'origine du segment PB1

4.2.4.1 La réponse inflammatoire induite par la souche H3N2 diffère selon l'origine du segment 2

Les résultats précédents nous ont permis de caractériser les fonctions de la protéine PB1-F2 issue d'une souche aviaire LPAI sur la réponse inflammatoire en modèle mammifère. Nous avons poursuivi cette approche en nous intéressant à la souche humaine H3N2 ainsi qu'au virus chimérique C PB1. Dans un premier temps, des souris NF- κ B-luciférase ont été infectées avec les virus H3N2 WT-NL et H3N2 Δ F2-NL à raison de 350 PFU par animal. Cette dose correspond à la dose létale 50 (LD50) du virus H3N2 WT déterminée sur souris BALB/c. En effet, nous souhaitons nous placer dans une configuration où les animaux ne développeraient pas une pathologie trop importante car une infection massive pourrait masquer une modulation subtile induite par PB1-F2. Un test de double mesure d'activités luciférase a été réalisé mais le protocole appliqué a induit des signes cliniques sévères chez les animaux, les points limites fixés comprenant une perte de plus de 75% du poids initial et/ou une température rectale inférieure à 32°C (Figure 56).

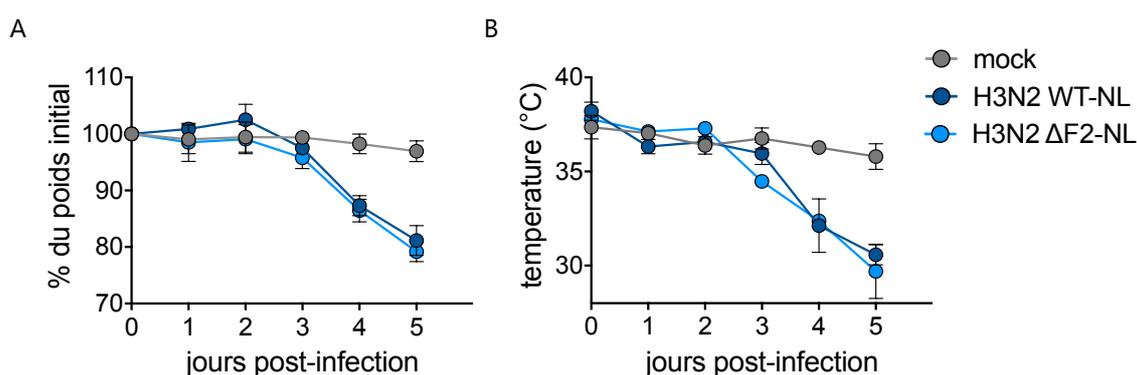


Figure 56 : suivi clinique de souris NF- κ B-luc infectées par les virus H3N2 WT-NL ou H3N2 Δ F2-NL. Des souris NF- κ B-luc ont été infectées avec les virus H3N2 WT-NL et H3N2 Δ F2-NL (350 PFU/animal). Le poids des animaux [A] ainsi que leur température [B] ont été relevés quotidiennement. Les données représentent la valeur moyenne \pm écart type (n=4).

La dégradation trop importante de l'état des animaux nous a conduit à réduire la dose d'infection. En conséquence, des souris NF- κ B-luciférase ont été infectées avec les virus H3N2 WT-NL, H3N2 Δ F2-NL, C PB1-NL et C PB1 Δ F2-NL à raison de 100 PFU par animal. Nous nous

attendions à ce que les souris développent des signes cliniques modérés à partir de 6 jours pi, avec un pic aux environ de 8-9 jours pi suivi d'une rémission. Tout comme avec la dose correspondant à la LD50, les animaux ont rapidement présenté une pathologie sévère et atteint les points limites de l'expérimentation à 6 jours pi (Figure 57A). Nous n'avons pas observé de modulation de la virulence ou de la réponse inflammatoire par PB1-F2 (Figure 57B), que ce soit dans le cas de la souche H3N2 ou en contexte chimérique. Concernant l'activité NF- κ B, une légère tendance de PB1-F2 à activer la réponse inflammatoire est observable à partir de 5 jours pi mais cette tendance est non significative compte tenu de l'importante variabilité intra-groupe. Il est intéressant de noter que si les virus de fond génétique H3N2 WT-NL induisent une pathologie équivalente à celle observée avec le virus H7N1-NL, une inflammation plus importante est observée dans le premier cas (près de 4/5 fois le niveau basal contre 3 avec le virus aviaire). Le nombre d'injections intranasales que les animaux subissent dans cette approche étant conséquent, nous avons supposé que ces événements pussent expliquer la pathogénicité exacerbée.

Nous avons réalisé un second essai en réduisant la dose d'infection (30 PFU) dans le but de conserver l'approche cinétique réalisée avec les virus H7N1-NL. Cet ajustement n'a pas eu d'impact sur la pathologie développée car elle a été tout aussi sévère qu'avec la dose précédente (Figure 57C). Nous n'avons également pas observé de modulation de la virulence ou de la réponse inflammatoire par PB1-F2 (Figure 57D). Suite à ces résultats, le mode opératoire employé a été davantage suspecté. Les deux injections quotidiennes de substrat par voie intranasale de substrat ont probablement créé un terrain inflammatoire qui, en synergie avec l'effet du virus, ont provoqué une pathologie exacerbée peu favorable pour étudier un effet ténu de la protéine PB1-F2. En conséquence, un essai a été réalisé en modifiant la voie d'administration du substrat de la luciférase firefly (intra-péritonéale plutôt qu'intranasale) afin de réduire le nombre d'injections intranasales. Une dose d'infection de 30 PFU a été conservée. Encore une fois, cela n'a pas eu d'impact sur l'importance des signes cliniques (Figure 57E) et l'injection intra-péritonéale du substrat s'est avérée augmenter la variabilité intra-groupe déjà très importante (Figure 57F). Une administration intranasale permet un passage dans le sang du substrat *via* une surface connue et maîtrisée (les poumons). Dans le cas de la voie intra-péritonéale, la diffusion du substrat dans le système vasculaire est probablement plus aléatoire compte tenu qu'elle n'est pas réalisée dans un compartiment défini. En effet, la probabilité de rencontre du substrat avec les vaisseaux situés à proximité du lieu d'injection et l'efficacité de diffusion sont ainsi plus variables. Dans notre modèle, cette voie d'administration ne constitue donc pas un remplacement pertinent à l'injection intranasale.

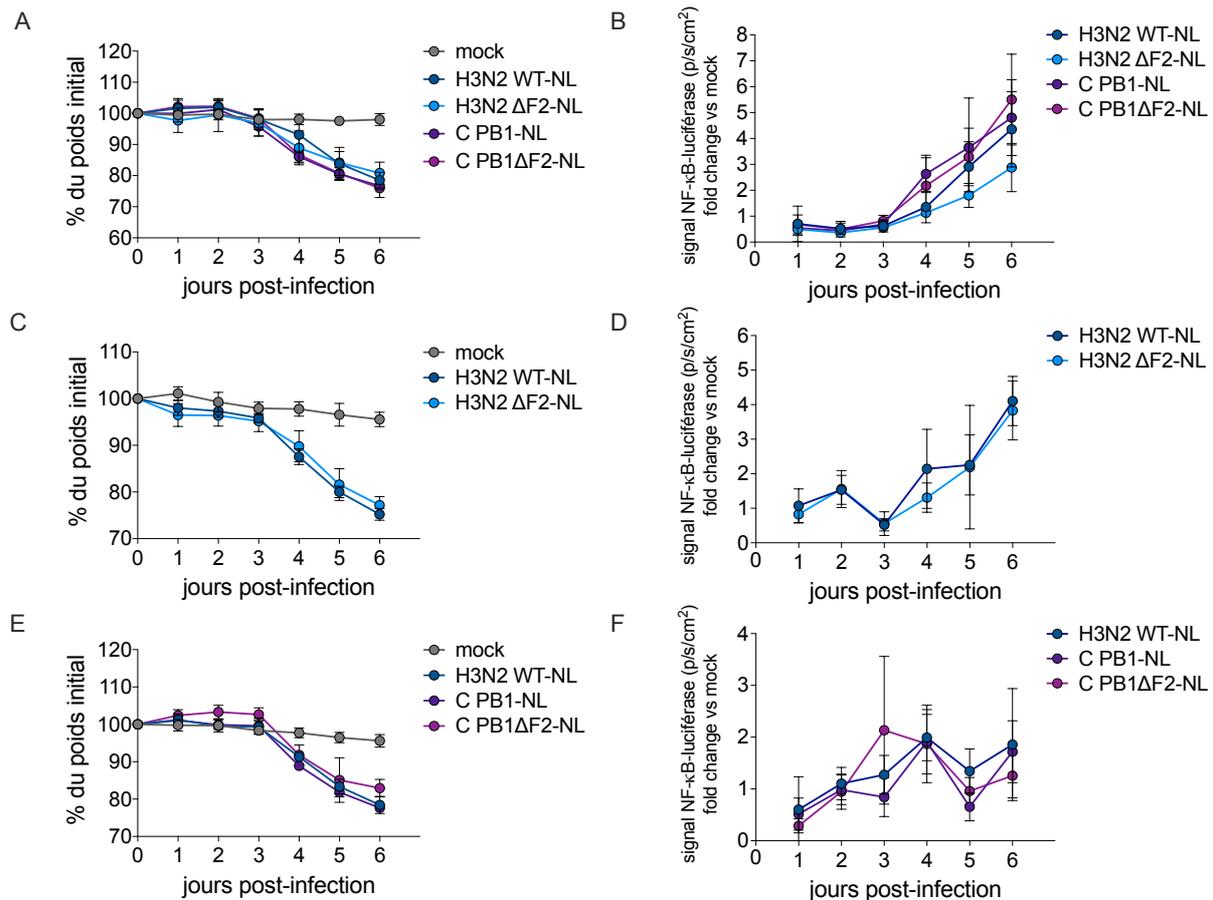


Figure 57 : mise au point d'un protocole de double mesure d'activités luciférase.

Des souris NF- κ B-luc ont été infectées avec les virus H3N2 WT-NL, H3N2 Δ F2-NL, C PB1-NL ou C PB1 Δ F2-NL (100 PFU/animal). Le poids des animaux [A] ainsi que l'activité luciférase firefly [B] mesurée suite à l'injection par voie intranasale de D-luciférine ont été relevés quotidiennement. Des souris NF- κ B-luc ont été infectées avec les virus H3N2 WT-NL ou H3N2 Δ F2-NL (30 PFU/animal). Le poids des animaux [C] ainsi que l'activité luciférase firefly [D] mesurée suite à l'injection par voie intranasale de D-luciférine ont été relevés quotidiennement. Des souris NF- κ B-luc ont été infectées avec les virus H3N2 WT-NL, C PB1-NL ou C PB1 Δ F2-NL (30 PFU/animal). Le poids des animaux [E] ainsi que l'activité luciférase firefly [F] mesurée suite à l'injection par voie intra-péritonéale de D-luciférine ont été relevés quotidiennement. Les valeurs de luminescence représentent le flux total intégré sur la zone du tractus respiratoire et normalisé par rapport à la surface considérée (photons/seconde/cm²). Les données représentent la valeur moyenne \pm écart type (n=5).

Bien que les expérimentations précédentes n'aient pas permis de dégager d'effet de PB1-F2 quant à la virulence ou la réponse inflammatoire, nous nous sommes appuyés sur les résultats issus des deux essais réalisés avec une dose de 30 PFU par animal afin de caractériser les cinétiques de répllication virale basées sur la mesure de l'activité nanoluciférase (Figure 58A et Figure 58C). Avec pour référence le virus H3N2 WT-NL, les 4 virus considérés ont des capacités réplcatives similaires et atteignent leur maximum de répllication à 3 jours pi. Toutefois, à 2 jours pi, le virus C PB1-NL présente un niveau de répllication supérieur à celui du H3N2 WT-NL (Figure 58B). L'écart étant inférieur à un log₁₀ et non conservé aux points ultérieurs de la cinétique, ces résultats rejoignent ce qui avait été observé avec les cinétiques réalisées sur cellules épithéliales, à savoir que l'insertion du segment PB1 aviaire H7N1 au sein d'un fond génétique H3N2 humain et la délétion de PB1-F2 ne modifient pas de façon

significative les capacités répliquatives des virus.

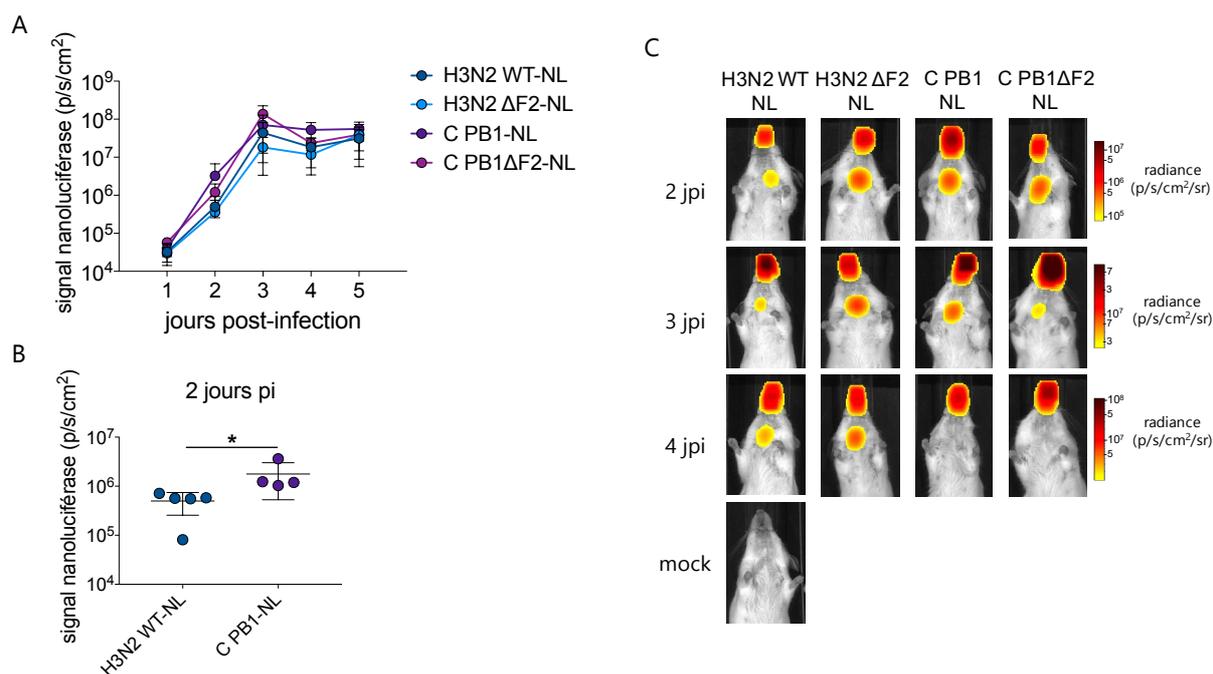


Figure 58 : cinétique de répllication des virus H3N2 WT-NL, H3N2 ΔF2-NL, C PB1-NL et C PB1 ΔF2-NL chez des souris NF-κB-luc.

[A] Des souris NF-κB-luc ont été infectées avec les virus H3N2 WT-NL ou C PB1-NL ainsi que leur homologue ΔF2 (n=5) à raison de 30 PFU/animal. Le signal bioluminescent généré par l'activité nanoluciférase a été mesuré quotidiennement. Les valeurs de luminescence représentent le flux total intégré sur la zone du tractus respiratoire et normalisé par rapport à la surface considérée (photons/seconde/cm²). [B] Comparaison du niveau répliquatif des virus H3N2 WT-nl et C PB1-nl à 2 jours pi. [C] Les visuels photographiques associés sont présentés pour un animal représentatif du groupe considéré. L'échelle correspond à la radiance moyenne (flux total intégré et normalisé par rapport à la surface considérée et l'angle solide, photons/seconde/cm²/stéradian). Les données représentent la valeur moyenne ± écart type ; * : p-value<0,05 (test de Mann-Whitney)

En s'appuyant sur les observations précédentes, nous avons infecté de nouveau des souris NF-κB-luciférase avec les 4 virus (H3N2 WT-NL, H3N2 ΔF2-NL, C PB1-NL et C PB1ΔF2-NL) à raison de 30 PFU par animal. Cependant, seule la mesure du niveau inflammatoire des animaux a été maintenue, le niveau de répllication équivalent des virus ayant été validé par les cinétiques précédentes. De plus, les acquisitions de l'activité NF-κB-luc ont été réduites à deux temps post-infection. Nous avons opté pour 4 jours post-infection en tant que mesure précoce car ce point correspond généralement à la phase d'initiation de la réponse inflammatoire (Figure 57). Puis, le niveau inflammatoire a été mesuré à 8 jours pi, point situé dans la zone de morbidité maximale. Ce mode opératoire a permis d'obtenir la configuration souhaitée car les signes cliniques développés se sont avérés plus modérés étant donné que la pathologie a été décelable à 6 jours pi plutôt que 4 (Figure 59A et Figure 59B). De plus, l'évolution du coefficient directeur des courbes entre 7 et 8 jours pi suggère que le pic des signes cliniques se situe entre 8 et 9 jours pi et ainsi que les animaux n'auraient probablement pas atteint les points limites de l'expérimentation. Toutefois, la pathologie développée a été similaire pour tous les virus inclus dans l'étude, ne révélant pas de modulation particulière de PB1-F2 quel que ce soit le

contexte viral.

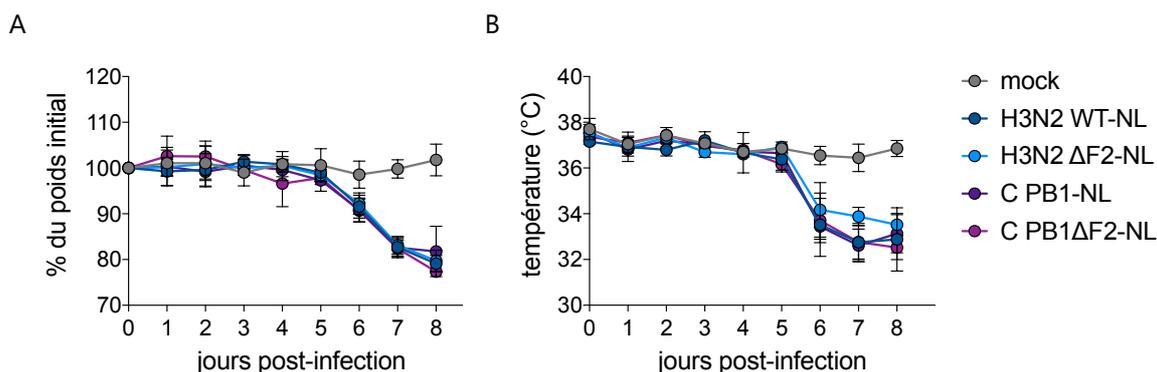


Figure 59 : suivi clinique de souris NF-κB-luc infectées avec les virus H3N2 WT-NL, H3N2 ΔF2-NL, C PB1-NL ou C PB1ΔF2-NL.

Des souris NF-κB-luc ont été infectées avec les virus H3N2 WT-NL (n=4), H3N2 ΔF2-NL (n=4), C PB1-NL (n=7) ou C PB1ΔF2-NL (n=5) à raison de 30 PFU/animal. L'évolution du poids [A] et de la température [B] a été relevée quotidiennement. Les données représentent la valeur moyenne ± écart type.

L'évaluation de la réponse inflammatoire des animaux à 4 jours pi révèle une modulation de l'activation NF-κB par PB1-F2 à la fois pour le virus H3N2 et celui chimérique. Dans le premier cas, les animaux infectés avec le virus H3N2 ΔF2 présentent un état inflammatoire proche de celui du groupe contrôle tandis que le virus H3N2 WT induit une inflammation 2,5 fois plus importante (Figure 60A et Figure 60C). Nous observons ainsi une fonction pro-inflammatoire de PB1-F2 pour la souche H3N2. De façon surprenante, le virus C PB1 exprimant la protéine PB1-F2 H7N1 se comporte comme celui H3N2 ΔF2 et n'active pas la voie NF-κB (Figure 60A et Figure 60C). Au contraire, le virus chimérique incapable d'exprimer PB1-F2 induit une inflammation significative. L'activité NF-κB mesurée est modérée car relativement proche de celle observée dans le groupe contrôle mais ce résultat appuie de nouveau une fonction intrigante de PB1-F2 en contexte chimérique. Nous avons observé précédemment un caractère pro-inflammatoire de la protéine PB1-F2 H7N1 exprimée au sein de son contexte viral natif. Ainsi, un transfert de ses propriétés inflammatoires au sein du virus d'accueil semblait envisageable. Toutefois, cela n'est pas le cas et l'expression d'un segment 2 aviaire par le virus H3N2 se traduit par une perte de sa capacité à induire une réponse inflammatoire.

La mesure de l'activité NF-κB à 8 jours post-infection révèle que tous les virus étudiés induisent une réponse inflammatoire supérieure à celle observée dans le groupe contrôle et celle-ci est d'un niveau équivalent (Figure 60B). Les modulations observées plus tôt ne perdurent ainsi pas dans le temps, associant l'exercice des propriétés de PB1-F2 à des temps précoces de l'infection. Ainsi, l'expression de PB1-F2 par la souche H3N2 se traduit par une accélération du développement de la réponse inflammatoire et inversement en contexte chimérique, la PB1-F2 aviaire retarde ce phénomène.

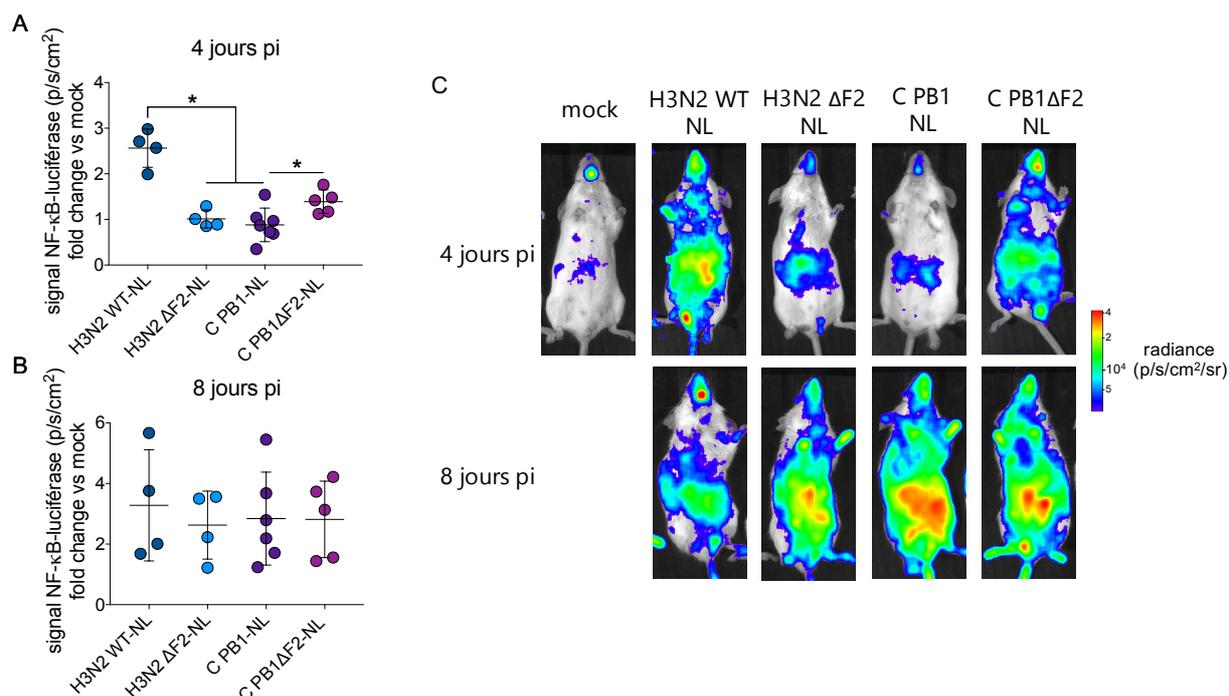


Figure 60 : étude de l'impact de PB1-F2 sur l'activation de la voie NF-κB.

Des souris NF-κB-luc ont été infectées avec les virus H3N2 WT-NL ou C PB1-NL ainsi que leur homologue ΔF2 (30 PFU/animal). Le signal bioluminescent généré par l'activité de la luciférase firefly a été mesuré à 4 [A] et 8 jours pi [B]. Les valeurs de luminescence représentent le flux total intégré sur l'animal entier et normalisé par rapport à la surface considérée (photons/seconde/cm²). [C] Les visuels photographiques associés sont présentés pour un animal représentatif du groupe considéré. L'échelle correspond à la radiance moyenne (flux total intégré et normalisé par rapport à la surface considérée et l'angle solide, photons/seconde/cm²/stéradian). Les données représentent la valeur moyenne ± écart type ; * : p-value < 0,05 (test de Mann-Whitney).

Nous avons ainsi observé un impact différentiel de PB1-F2 sur la réponse inflammatoire selon l'origine du segment PB1 exprimé. La protéine PB1-F2 native du virus H3N2 présente une fonction pro-inflammatoire, ce qui rejoint les résultats obtenus avec la souche H7N1. Les propriétés de la PB1-F2 H7N1 ne sont pas retrouvées lors de son expression au sein du génome H3N2. Au contraire, son action s'inverse car elle contribue à la réduction de la réponse inflammatoire induite par le virus H3N2. Dans les deux cas, ces fonctions sont restreintes à un temps post-infection précoce.

4.2.4.2 Caractérisation de la réponse transcriptomique de l'hôte

Suite aux résultats précédents, nous avons souhaité apporter d'autres éléments de lecture à la caractérisation de l'impact de PB1-F2 sur la réponse de l'hôte en s'appuyant sur l'évaluation de l'expression de certains gènes dans le tissu pulmonaire. Pour cela, des souris BALB/c ont été infectées avec les virus H3N2 WT, H3N2 ΔF2, C PB1 et C PB1ΔF2 afin de quantifier l'expression dans le tissu pulmonaire de certains gènes d'intérêt. Les essais réalisés avec les virus H3N2 WT-NL et C PB1-NL, accompagnés de leur homologue mutant ΔF2, indiquent une fonction plutôt précoce de PB1-F2 et dans un contexte de pathologie modérée. Les animaux ont donc été infectés avec une dose de 350 PFU, correspondant à la LD50 du virus

H3N2 WT sur souris BALB/c sans acquisition de signaux bioluminescents.

Nous avons cherché à évaluer la perméabilité pulmonaire des animaux en utilisant le réactif FITC-dextran précédemment présenté dans le cas de la perméabilité intestinale. Il a été en l'occurrence administré par voie intranasale. La perméabilité pulmonaire reflète la cohérence du tissu ainsi que le niveau inflammatoire. En effet, une augmentation de la perméabilité pulmonaire est associée à un recrutement cellulaire [585]. A 3 jours pi, aucun virus n'a induit de désorganisation de l'épithélium respiratoire conduisant à une augmentation de la perméabilité pulmonaire (Figure 61A). A sept jours pi, tous les virus étudiés ont induit une perméabilité pulmonaire au moins deux fois supérieure à celle relevée dans le groupe contrôle (Figure 61B). De plus, en contexte chimérique, l'expression de la protéine PB1-F2 H7N1 est associée à une réduction de cet indicateur. Ce résultat pourrait suggérer un effet anti-inflammatoire associé à l'expression d'une PB1-F2 aviaire au sein d'un génome viral humain. Ce résultat doit toutefois être considéré avec mesure. En effet, l'analyse histologique n'a pas permis de relever un taux d'infiltration cellulaire dans le tissu pulmonaire plus important en l'absence de PB1-F2 (non montré).

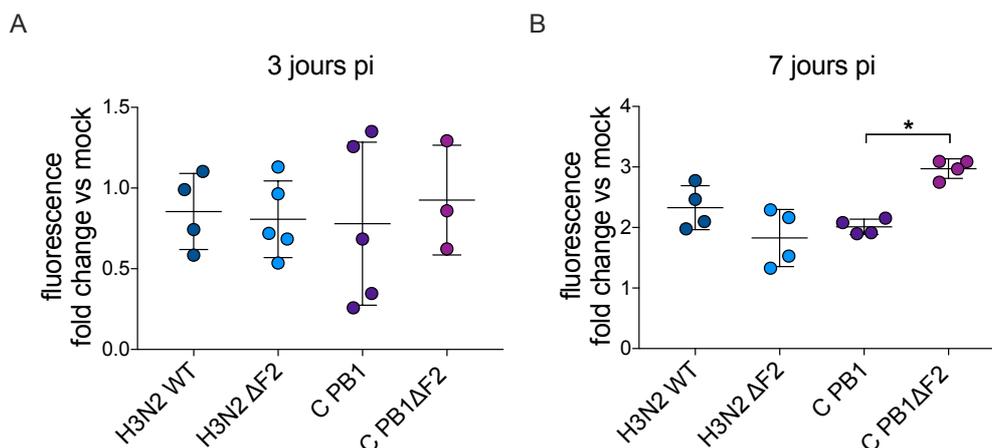


Figure 61 : évaluation de la perméabilité pulmonaire chez des souris BALB/c infectées par les virus H3N2 WT, H3N2 ΔF2, C PB1 ou C PB1 ΔF2.

Des souris BALB/c ont été infectées avec les virus H3N2 WT ou C PB1 ainsi que leur homologue ΔF2 (350 PFU/animal). La perméabilité pulmonaire des animaux a été déterminée à 3 [A] ainsi qu'à 7 jours pi [B] par mesure dans le sérum du signal fluorescent généré par le réactif FITC-dextran administré par voie intranasale. Les données représentent la valeur moyenne \pm écart type ; * : p-value < 0,05 (test de Mann-Whitney).

L'ARN total des tissus pulmonaires a été extrait à 3 et 7 jours pi. Le génome viral a été premièrement quantifié relativement à l'expression de l'ARNm M1 (Figure 62). Nous n'avons pas observé de différence entre les virus étudiés et cela aux deux temps post-infection considérés. Ainsi, tous les virus présentent un niveau de répllication similaire ce qui rejoint les observations faites par mesure de l'activité nanoluciférase.

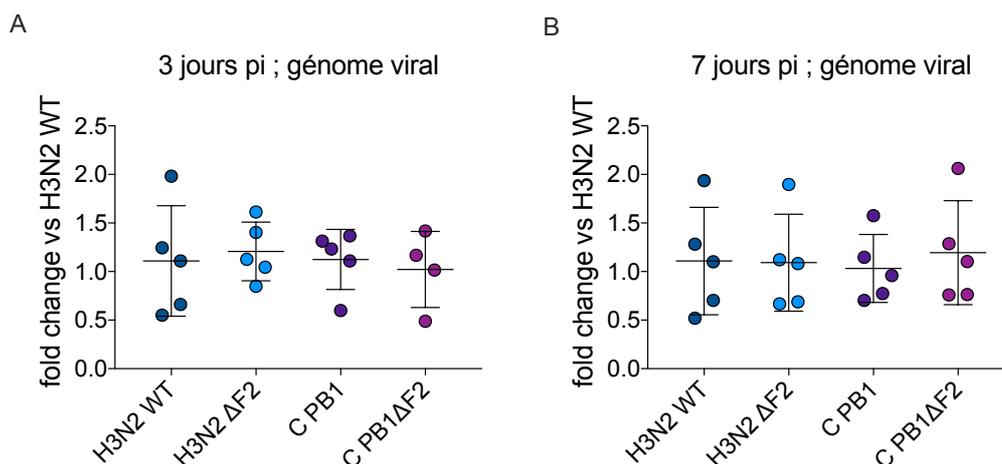


Figure 62 : quantification du génome viral dans les poumons de souris BALB/c infectées par les virus H3N2 WT, H3N2 ΔF2, C PB1 ou C PB1 ΔF2.

Des souris BALB/c ont été infectées avec les virus H3N2 WT ou C PB1 ainsi que leur homologue ΔF2 (350 PFU/animal). L'ARN total des poumons a été extrait et l'expression relative de l'ARNm M1 a été déterminée à 3 et 7 jours pi par qPCR. Les données représentent la valeur moyenne ± écart type.

Compte tenu des résultats obtenus avec le modèle souris NF-κB-luciférase, nous nous sommes intéressés à l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire. En ce sens, les gènes codant l'IL6, l'IL1β et RELB ont été étudiés. A trois jours pi, seule l'expression de l'IL1β présente une modulation (Figure 63A, Figure 63B et Figure 63C). La délétion de PB1-F2 ainsi que l'introduction du segment PB1 aviaire se sont traduites par une inhibition de l'expression de ce gène. Dans le cas du virus chimérique, cet effet du segment PB1 aviaire est indépendant de l'expression de PB1-F2. A 7 jours pi, PB1-F2 H3N2 semble contribuer à la surexpression du gène codant RELB mais cette tendance n'est pas significative (Figure 63E). L'expression de l'IL6 n'est toujours pas modulée (Figure 63D). L'expression de la PB1-F2 aviaire en contexte chimérique est associée à une inhibition de la réponse inflammatoire. Dans le cas du gène RELB, nous retrouvons le même résultat que celui observé précédemment sur souris NF-κB-luciférase : l'introduction du segment PB1 aviaire altère la fonction pro-inflammatoire du virus H3N2 et la protéine PB1-F2 contribue à cet effet puisque sa délétion restaure en partie cette fonction (Figure 63E). Concernant l'IL6, contrairement à RELB, le virus C PB1 induit une surexpression de ce gène équivalente au virus H3N2 WT et la délétion de PB1-F2 amplifie cette induction (Figure 63D). Ainsi, étonnamment, l'expression de la protéine PB1-F2 H7N1 semble inhiber l'expression de l'IL6 mais ce phénomène se conclut finalement par un virus chimérique se comportant comme celui H3N2 WT.

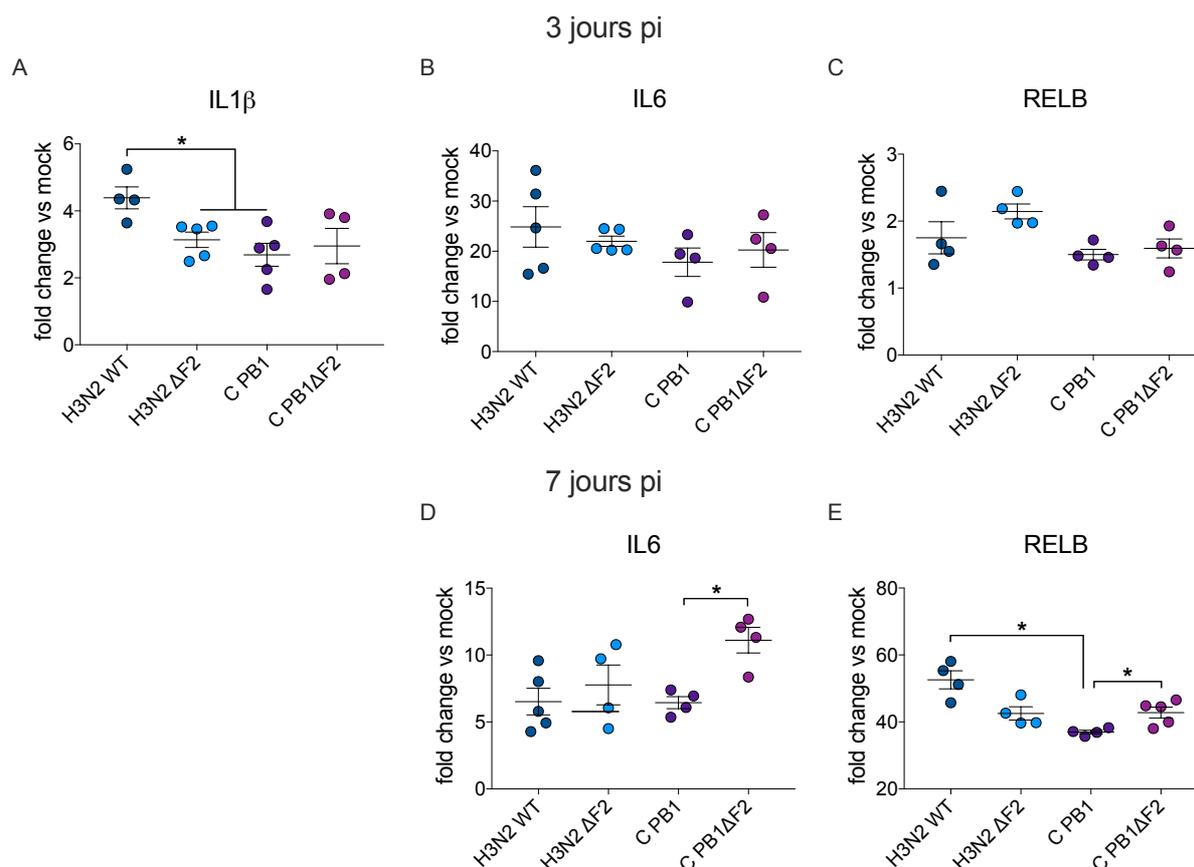


Figure 63 : analyse de la réponse inflammatoire pulmonaire de souris BALB/c infectées par les virus H3N2 WT, H3N2 ΔF2, C PB1 ou C PB1 ΔF2.

Des souris BALB/c ont été infectées avec les virus H3N2 WT ou C PB1 ainsi que leur homologue ΔF2 (350 PFU/animal). L'ARN total des poumons a été extrait à 3 ainsi que 7 jours pi. Les expressions relatives des transcrits codant l'IL1β [A], l'IL6 [B;D] et RELB [C;E] ont été déterminées par qPCR. Les données représentent la valeur moyenne ± écart type ; * : p-value < 0,05 (test de Mann-Whitney).

Les résultats de cette étude conduite sur souris BALB/c indiquent un effet modéré de la protéine PB1-F2 H3N2. D'un point de vue physiologique, son expression n'a pas d'impact sur la perméabilité pulmonaire. L'effet pro-inflammatoire de PB1-F2 H3N2 observé précédemment par mesure de l'activité NF-κB est partiellement retrouvé ici, seule l'expression de l'IL1β a été sujette à une régulation. La protéine PB1-F2 H7N1 exprimée en contexte chimérique semble limiter la désorganisation de l'épithélium pulmonaire. A l'instar de l'approche conduite sur souris NF-κB-luciférase, un effet anti-inflammatoire est également notable selon l'évaluation de l'expression de gènes liés à la réponse inflammatoire. Cependant, les modulations de la réponse de l'hôte associées à PB1-F2 en contexte chimérique ne se manifestent qu'à un temps tardif de l'infection, ce qui ne corrobore pas les résultats obtenus sur souris NF-κB-luciférase. Ainsi, bien que les propriétés soient similaires dans les deux modèles, la cinétique associée diffère.

4.3 Interactomes différentiels des protéines PB1-F2

4.3.1 Identification d'interacteurs par usage d'une biotine ligase

Les activités cellulaires reposent sur des processus moléculaires concrétisés essentiellement par des interactions protéine-protéine. Définir le répertoire des partenaires cellulaires d'une protéine d'intérêt, ou son interactome, est ainsi un moyen d'identifier les voies cellulaires sur lesquelles elle exerce une action. Le regroupement de l'ensemble de ces fonctions offre une lecture globale du rôle de la protéine. Nous avons souhaité identifier le réseau d'interaction de la protéine PB1-F2 afin d'apporter des éléments de compréhension quant aux conséquences de son expression. La littérature existante décrit une dichotomie entre l'action des protéines PB1-F2 exprimées par les virus aviaires et humains chez leur hôte naturel. Le fait que cette variabilité soit la traduction d'interactomes différentiels constitue l'hypothèse de travail. Nous avons donc cherché à comparer l'interactome de la protéine PB1-F2 issue de la souche aviaire H7N1 exprimée en cellules de poulet et celui de la protéine PB1-F2 issue de la souche humaine H3N2 exprimée en cellules humaines. Nous avons également souhaité intégrer l'interactome de la protéine PB1-F2 native de la souche H7N1 en cellules humaines afin d'étudier les fonctions potentielles de PB1-F2 dans le cadre d'une infection d'un hôte humain par un virus aviaire ou d'origine aviaire suite à un réassortiment impliquant le segment PB1. Nous nous sommes appuyés sur une technique récente basée sur l'usage de la biotine ligase BioID2 comme méthode d'identification des interacteurs potentiels (présentée en page 80).

4.3.2 Caractérisation des outils utilisés

4.3.2.1 Expression des constructions

Les séquences codantes des protéines d'intérêt ont été clonées dans un plasmide pcDNA3.1-BioID2-HA afin de fusionner à leur extrémité C-terminale la biotine ligase. L'expression effective des constructions a été vérifiée en cellules humaines (A549) et de poulet (DF1) (Figure 64). En sus des protéines H3N2 et H7N1 PB1-F2-BioID2 nécessaires à l'étude, les deux constructions suivantes ont été incluses : H3N2 NS1-BioID2 et H7N1 X-BioID2. Compte tenu du rôle majeur de NS1 en tant que facteur de virulence, l'interactome de cette protéine a été particulièrement étudié et donc caractérisé. En ce sens, la construction H3N2 NS1-BioID2 a été intégrée à l'étude afin de comparer les interacteurs obtenus par l'approche BioID2 à ceux déjà décrits dans la littérature. Une redondance permettrait de valider l'efficacité de la technique développée et ainsi d'apporter du poids aux interactants des protéines PB1-F2 identifiés. La construction H7N1 X-BioID2 a été réalisée dans le but de caractériser l'interactome d'un autre facteur de virulence, PA-X, cependant cet axe n'a pas été poursuivi ultérieurement. Nonobstant les bandes aspécifiques, l'expression des 4 protéines de fusion a pu être confirmée dans les deux types cellulaires considérés. La différence d'intensité notable

entre ces deux derniers est probablement le reflet de la capacité de transfection moindre des cellules A549.

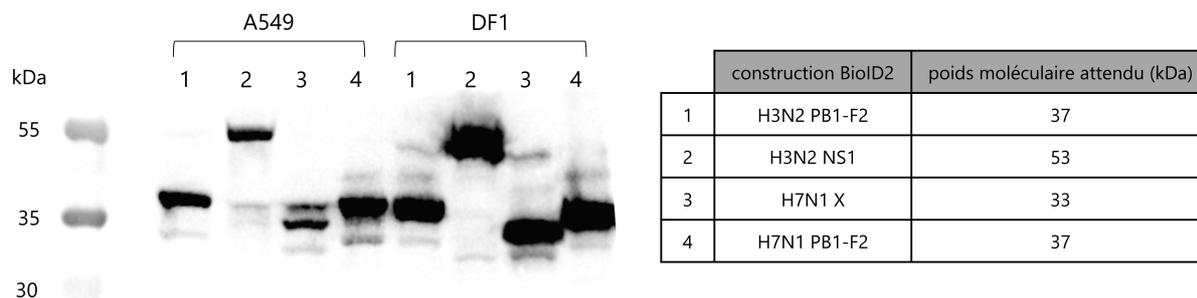


Figure 64 : expression des constructions BioID2.

Les protéines étudiées possèdent une cassette BioID2-HA fusionnée à leur extrémité C-ter. L'expression des constructions a été vérifiée dans deux cellules humaines et de poulet (A549 et DF1) par Western Blot avec un anticorps anti tag HA.

4.3.2.2 Fonctionnalité des constructions

La fonctionnalité des constructions a été évaluée dans une lignée cellulaire facilement transfectable (293T) afin de s'affranchir de la limite fixée par l'efficacité de transfection dans un premier temps. Les constructions H7N1 NS1-BioID2 et WSN PB1-F2-BioID2 ont servi de base afin d'évaluer la capacité de biotinylation de notre modèle par extrapolation. Après transfection et ajout de biotine, les cellules ont été lysées et les protéines biotinylées purifiées à l'aide de billes couplées avec de la streptavidine. Les échantillons proviennent d'un nombre équivalent de cellules 293T.

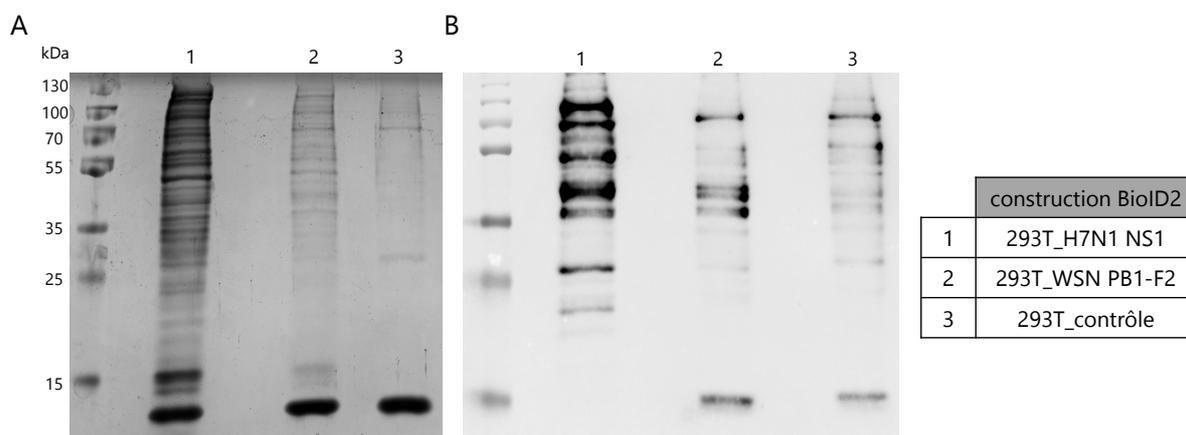


Figure 65 : évaluation de l'efficacité de biotinylation.

Les constructions utilisées possèdent une cassette BioID2-HA fusionnée en leur extrémité C-ter, l'échantillon contrôle correspondant à la cassette seule. Elles ont été exprimées en cellules épithéliales 293T (milieu supplémenté avec 50 µM de D-biotine), puis les protéines biotinylées purifiées grâce à des billes couplées à la streptavidine. Le profil des protéines purifiées a été évalué par SDS-PAGE (marquage au bleu de Coomassie) [A] et le matériel biotinylé spécifiquement marqué avec de la streptavidine-HRP [B] en engageant 10% des éluats.

L'analyse des éluats indique que des protéines de poids moléculaires variés ont pu être précipitées, attestant de l'activité de BioID2 (Figure 65A). Un échantillon contrôle

correspondant à l'expression de la cassette BioID2-HA seule reflète le niveau de biotinylation basal de la biotine ligase. L'environnement intracellulaire étant chargé, des protéines peuvent être marquées par proximité fortuite avec BioID2 sans que cela ne témoigne d'une réelle interaction. La quantité de protéines éluées est très réduite dans la condition contrôle en comparaison avec les deux protéines d'intérêt. Cela supporte le fait que leur fusion à BioID2 modifie le comportement de l'enzyme et augmente la fréquence de la présence de protéines dans la surface biotinylable. Toutefois, il est difficile à ce stade d'identifier des bandes différentielles entre les échantillons qui attesteraient d'une biotinylation spécifique à la protéine d'intérêt considérée. Seule l'activité de biotinylation accrue de BioID2 fusionnée est révélée. Le différentiel quantitatif observé entre les échantillons NS1 et PB1-F2-BioID2 n'est ainsi attribuable pour le moment qu'à une activité de biotinylation non équivalente. Nous ne connaissons pas l'organisation des complexes de ces protéines fusionnées à BioID2, ainsi il est envisageable que la structure PB1-F2-BioID2 soit stériquement peu favorable à la biotinylation des interactants. Le marquage spécifique des protéines biotinylées avec de la streptavidine-HRP (Figure 65B) donne des résultats similaires à ce qui a été décrit en amont. Cependant, le nombre réduit de bandes dans chaque échantillon par rapport à la coloration au bleu de Coomassie suggère la présence de protéines non biotinylées au sein des éluats. Cela est surprenant puisque la forte affinité biotine-streptavidine autorise des rinçages extrêmement stringents. En conséquence, peu de protéines non biotinylées devraient être retrouvées au sein des éluats.

Cette difficulté a été soulevée par une étude réalisée par l'équipe du Dr Cline en 2014 [586]. Elle propose une méthode s'appuyant sur une pré-digestion des protéines avant de purifier les peptides biotinylés sur billes couplées à la streptavidine et a été nommée DiDBiT (« Direct Detection of Biotin-Containing Tags »). Elle se distingue des approches plus classiques qui consistent à digérer les protéines purifiées directement sur les billes ou une fois éluées. Incuber des peptides plutôt que des protéines permettrait de réduire le bruit de fond, point fortement limitant de la spectrométrie de masse. En effet, dans un échantillon complexe, il est difficile de séparer totalement tous les peptides présents lors de leur analyse ce qui peut aboutir à des spectres se chevauchant : seuls les plus abondants seront alors discernables. Un faible ratio protéines d'intérêt/protéines totales est donc peu favorable à une identification efficace. Les travaux conduits par l'équipe du Dr Cline concluent que leur stratégie permet d'augmenter très fortement la capacité de détection de peptides biotinylés (environ 200 fois) par rapport à une digestion des protéines réalisées sur billes. Pour les analyses par spectrométrie de masse, nous avons souhaité tester premièrement l'approche DiDBiT afin de vérifier si elle pouvait être adaptée à notre modèle. Les protéines extraites suite à l'expression en cellules 293T de la construction H7N1 NS1-BioID2 accompagnée du contrôle correspondant à la cassette BioID2 seule ont ainsi été traitées selon cette méthode. Le résultat a été peu encourageant puisque seulement deux protéines biotinylées ont été identifiées dans l'échantillon d'intérêt : BioID2 elle-même et HNRPC, protéine impliquée dans le métabolisme des ARN. Des protéines impliquées dans le process des ARN sont régulièrement identifiées dans des études interatomiques caractérisant NS1 [587,588], ainsi HNRPC semble pertinente

bien que cette interaction ne soit pas décrite actuellement à notre connaissance. Une seule protéine a été identifiée dans le cas de l'échantillon contrôle et il s'agit de BioID2. Le nombre de protéines identifiées par spectrométrie de masse ne concordait pas avec ce qui était observé lors de la migration SDS-PAGE des échantillons (exemple en Figure 65). De plus, le recours à la méthode DiDBiT implique une précipitation des protéines, étape qui s'est révélée apporter des difficultés techniques importantes. Nous avons ainsi abandonné cette approche pour les analyses par spectrométrie de masse et opté pour une digestion des protéines une fois éluées des billes couplées à la streptavidine.

4.3.3 Analyses par spectrométrie de masse

Suite à la phase de pré-test en cellules 293T, nous avons souhaité réaliser les interactomes dans des cellules hôtes des IAV afin de tenter d'apporter davantage de pertinence aux interacteurs identifiés. Les cellules A549 et CLEC213 ont ainsi été utilisées comme modèle d'épithélium pulmonaire respectivement humain et aviaire (poulet).

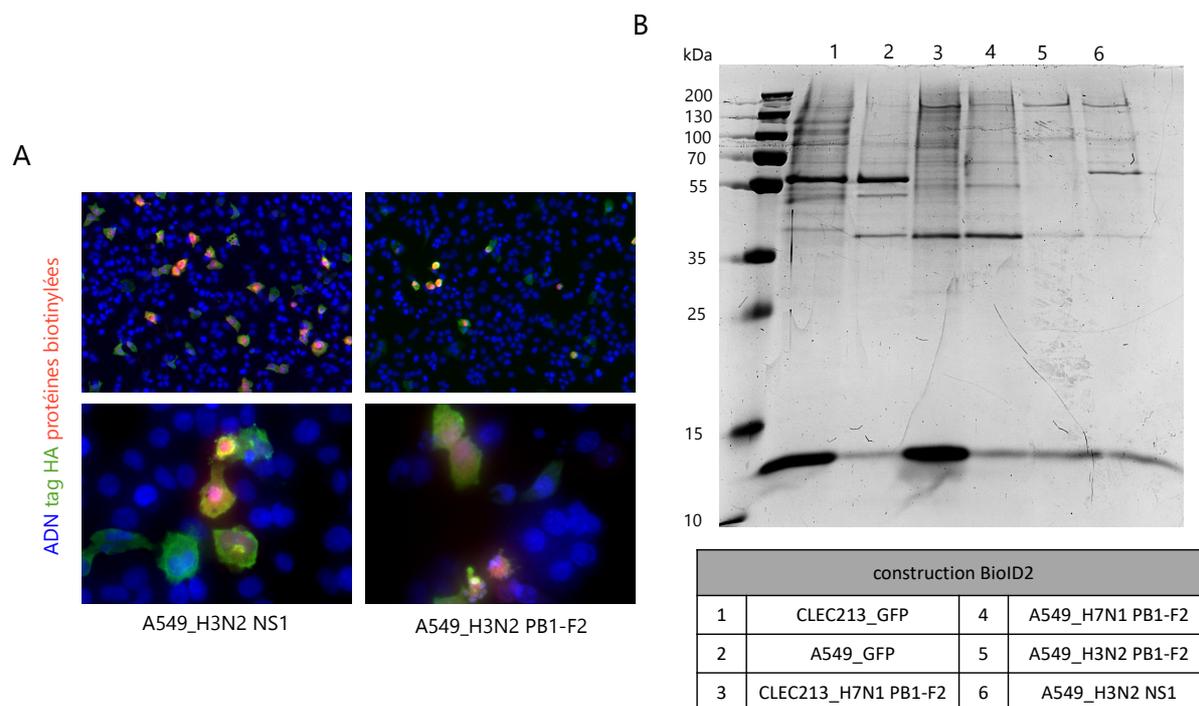


Figure 66 : caractérisation des échantillons BioID2 analysés par spectrométrie de masse.

Les constructions utilisées possèdent une cassette BioID2-HA fusionnée en leur extrémité C-ter. Elles ont été exprimées en cellules épithéliales A549 (milieu supplémenté avec 50 μ M de D-biotine) et les protéines biotinylées (rouge), le tag HA (vert) et le noyau des cellules (bleu) ont été révélés par immunofluorescence [A]. Les protéines biotinylées générées par l'expression des constructions en cellules épithéliales (A549 ou CLEC213, milieux supplémentés avec 50 μ M de D-biotine) ont été purifiées grâce à des billes couplées à la streptavidine. Le profil des protéines éluées a été évalué par SDS-PAGE (marquage au bleu de Coomassie) en engageant 10% des éluats [B].

De façon peu surprenante, l'efficacité de transfection de ces lignées cellulaires a constitué une limite au modèle. Un marquage par immunofluorescence révèle une expression des constructions ainsi qu'une présence de protéines biotinylées en cellules A549 très limitée

(Figure 66A), ce qui est corroboré avec la quantité de protéines biotinylées purifiées (Figure 66B). De plus, la localisation des protéines biotinylées semblent être majoritairement nucléaire. Cette observation est singulière dans le cas de PB1-F2 compte tenu qu'une localisation cytosolique ou mitochondriale lui est plutôt attribuée [487,509,510]. L'ajout de la cassette BioID2-HA pourrait générer un biais en imposant une migration au noyau. L'échantillon servant de référence a évolué par rapport aux tests précédents réalisés sur cellules 293T puisque nous avons opté pour la construction GFP-BioID2-HA plutôt que l'étiquette seule. Nous souhaitons associer une protéine non pertinente dans notre modèle afin de mimer plus fidèlement la biotinylation aléatoire induite par un complexe incluant BioID2. Les échantillons présentés en Figure 66B ont été analysés par spectrométrie de masse en suivant un protocole de digestion des protéines biotinylées après purification. A l'instar de l'approche DiDBiT, peu de protéines biotinylées ont été identifiées : respectivement 4, 17, 3, 8, 2 et 3 pour les échantillons 1 à 6 (en omettant BioID2 elle-même). Cela ne reflète également pas les profils obtenus par électrophorèse SDS-PAGE. Compte tenu du fait qu'il s'agissait de la deuxième observation de ce phénomène et selon deux approches différentes, nous nous sommes interrogés quant à la capacité de détection des peptides biotinylés par spectrométrie de masse. En effet, parmi les études ayant eu recours à la biotinylation de proximité, certaines n'explicitent pas l'identification de peptides biotinylés comme base de l'analyse. Seule la sélection des protéines statistiquement enrichies (dans le cas de la présence de réplicats biologiques ou techniques) ou identifiées uniquement dans l'échantillon d'intérêt par rapport à celui de référence est précisée ([589–592] pour exemple). Cela suggère que la difficulté à discerner des peptides biotinylés dans ce type d'échantillon n'est pas anecdotique. Les rinçages opérés sur les billes utilisées pour la purification des protéines biotinylées sont extrêmement stringents. Ainsi, une protéine identifiée par spectrométrie de masse dans un échantillon donné a été considérée biotinylée, même en l'absence d'un peptide présentant la modification post-traductionnelle.

Nous nous sommes appuyés sur un différentiel entre les échantillons d'intérêt et celui contrôle afin d'identifier les interacteurs potentiels. En outre, les échantillons n'ont pas été réalisés en incluant des réplicats biologiques. Ainsi une quantification des protéines et leur taux d'enrichissement par rapport au contrôle n'est pas accessible. Cela implique que dans le cas de figure où une protéine est identifiée à la fois dans un échantillon d'intérêt et dans celui contrôle, celle-ci est systématiquement exclue des interacteurs potentiels. En effet, une protéine commune mais considérablement plus enrichie dans l'échantillon d'intérêt pourrait être pertinente mais nous ne sommes pas en mesure d'apporter cette lecture. L'analyse factuelle des résultats révèle un faible taux de conversion des peptides identifiés en protéines dans le cas des échantillons produits en cellules CLEC213 (Tableau 13). En effet, en cellules A549, près de la moitié des peptides distingués ont pu servir à l'identification d'une protéine tandis que cette proportion chute à environ $\frac{1}{4}$ en cellules aviaires. Cela témoigne d'une qualité d'annotation moindre du génome de poulet par rapport au génome humain. Ce point est notamment appuyé par le fait que, relativement à d'autres vertébrés, un faible nombre de gènes a été identifié chez le poulet et globalement un seul transcrit est associé à une zone codante [593]. Il s'agit d'un point limitant puisqu'une part importante de l'information est

perdue par défaut d'association. De plus, le bruit de fond de la technique semble plus important en cellules aviaires car 70% des protéines identifiées dans les échantillons d'intérêt sont communes avec celui contrôle, contre environ 40% en cellules humaines. Dans ce même type cellulaire, enfin, nous observons une part importante des protéines identifiées occupée par des isoformes (près de 50%) (Tableau 13). Cependant, l'approche par spectrométrie de masse ne permet pas de les discerner. En effet, compte tenu de la forte homologie de séquence, les peptides ayant permis l'identification d'une protéine sont très probablement retrouvés au sein de la séquence des autres protéines membre de sa famille. Par exemple, trois membres appartenant à la famille des protéines MTA (metastasis-associated protein) ont été identifiés au sein de l'échantillon A549_H7N1 PB1-F2. Nous ne pouvons déterminer, parmi les trois, lesquelles ont réellement été purifiées. Cela peut provoquer deux biais d'analyse. Premièrement, la mise en exergue d'une famille de protéines et donc de leurs fonctions associées parmi les voies cellulaires visées par la protéine d'intérêt sans que cela ne soit justifié. Deuxièmement, cette dernière n'interagit pas nécessairement avec toutes les isoformes reliées à la séquence peptidique identifiée. Dans cette configuration, le résultat est ainsi peu précis. Les protéines isoformes strictement codées par le même gène ont néanmoins été exclues de l'analyse car cela apportait assez peu d'information. Les interacteurs identifiés dans les échantillons relatifs aux protéines PB1-F2 sont listés dans le Tableau 14 et le Tableau 15 situés en fin de chapitre.

	échantillon	nombre de peptides identifiés	nombre total de protéines identifiées (% de peptides associés à une protéine)	nombre de protéines finales identifiées (isoformes retirées)	nombre de protéines spécifiques identifiées (%)
A549	GFP	563	306 (54%)	138	
	H7N1 PB1-F2	623	329 (53%)	154	73 (47%)
	H7N1 NS1	669	371 (55%)	176	107 (61%)
	H3N2 PB1-F2	614	267 (43%)	135	92 (68%)
	H3N2 NS1	725	379 (52%)	186	132 (71%)
CLEC213	GFP	397	78 (20%)	71	
	H7N1 PB1-F2	244	55 (22%)	51	15 (29%)
	H7N1 NS1	149	35 (23%)	32	9 (28%)

Tableau 13 : caractérisation des résultats issus de l'analyse par spectrométrie de masse.

L'appellation « protéines spécifiques » désigne les protéines exclusivement identifiées dans l'échantillon d'intérêt avec pour référence la construction GFP-BioID2.

4.3.3.1 Interactome de PB1-F2 H7N1 en cellules aviaires

Les protéines identifiées dans les échantillons produits en cellules aviaires ont été converties en orthologues humains en amont des analyses. Le réseau d'interactions directes au sein de l'interactome de la protéine PB1-F2 de la souche H7N1 a été visualisé *via* le logiciel IPA (Ingenuity Pathway Analysis) (Figure 67). Quelques interactions ont pu être identifiées ce qui suggère une interconnexion de fonctions relative.

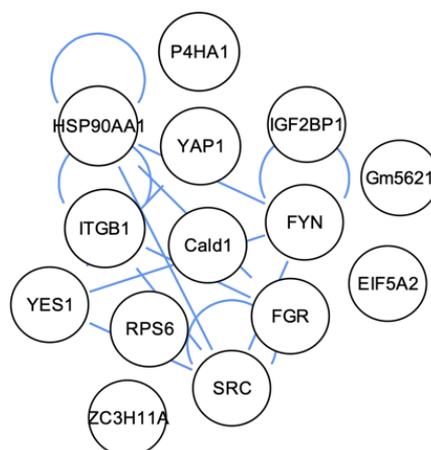


Figure 67 : réseau d'interaction au sein de l'interactome de la protéine PB1-F2 H7N1 en cellules aviaires.

Les lignes bleues indiquent des interactions directes.

Afin d'appréhender l'impact fonctionnel global que les interactions entre PB1-F2 et les protéines identifiées pourraient induire, les voies biologiques définies par les interactants potentiels ont été déterminées. Une voie biologique est considérée surreprésentée si la fréquence d'observation de protéines qui y sont associées est significativement plus importante dans l'échantillon considéré qu'au sein du protéome de référence (bases de données : IPA).

Parmi les interacteurs potentiels, une prépondérance de protéines appartenant à la famille des tyrosine kinases dépourvues de domaine transmembranaire est notable (FGR, FYN, SRC, YAP1, YES1). Elles sont regroupées au sein de la voie des Tec kinases, principale voie enrichie identifiée par le logiciel IPA (Figure 68C). Leur vaste fonction de kinase suggère une implication assez générale dans les phénomènes de transduction. Cela est appuyé par les voies de signalisation considérées comme pertinentes par le logiciel IPA et qui incluent, en outre des Tec kinase, la signalisation liée aux protéines 14-3-3 et ERK/MAPK ainsi que la voie HIPPO. Par une lecture très globale, les régulations associées aux Tec kinases concernent la gestion du cycle et de la différenciation cellulaire [594,595]. De plus, une part importante des protéines identifiées sont associées à une localisation au niveau de la membrane plasmique (Figure 68B). Cela pourrait appuyer une forte dominante liée à l'interface entre la cellule et son environnement. Les phénomènes d'endocytose et d'adhérence cellulaire représentent également une part importante des voies cellulaires enrichies. La protéine ITGβ1, la Tec kinase FYN ainsi que SRC sont les principaux acteurs ayant permis l'identification de telles voies cellulaires.

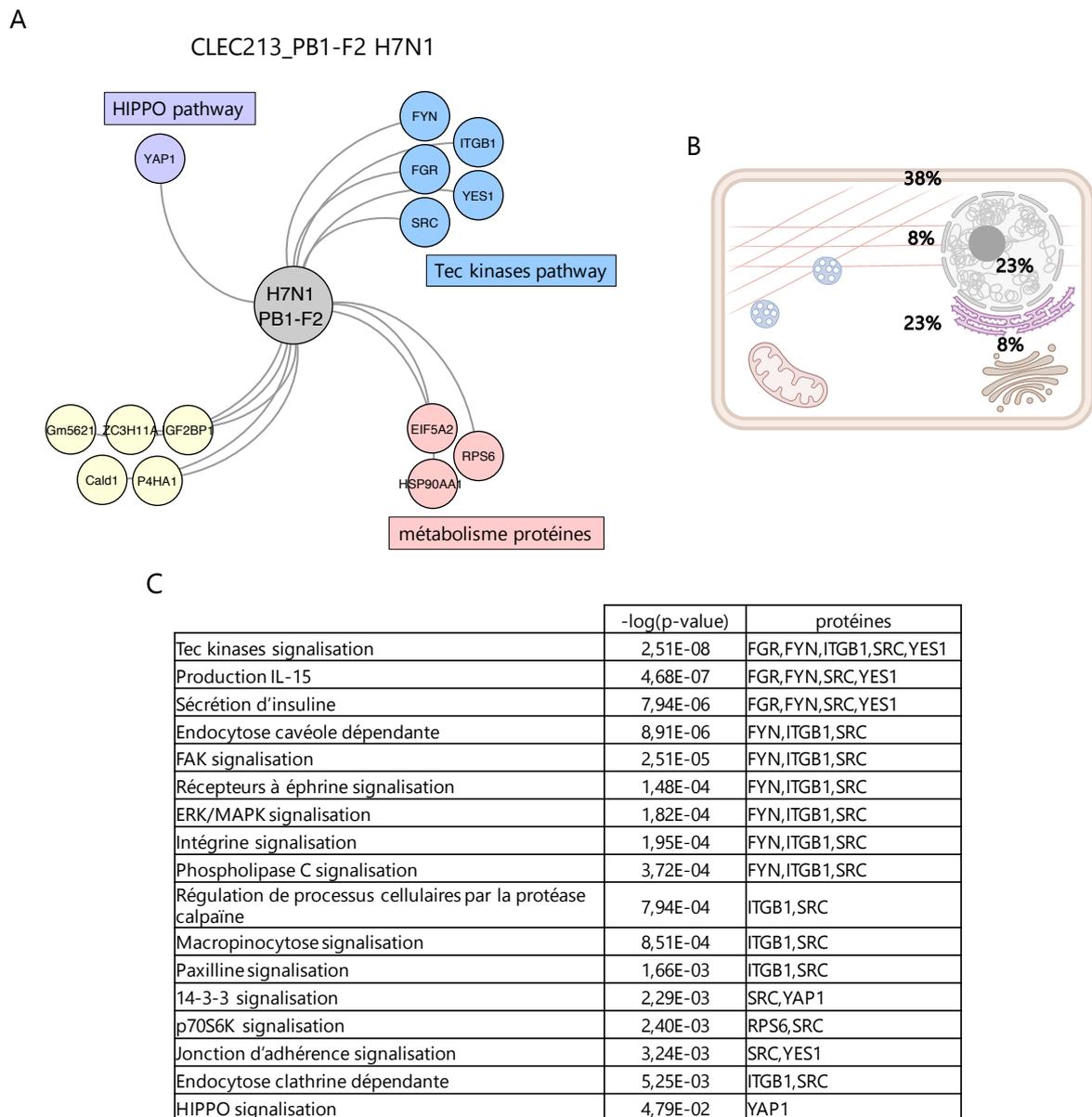


Figure 68 : interactome de la protéine PB1-F2 H7N1 en cellules aviaires.

[A] Les voies cellulaires significativement enrichies associées aux protéines identifiées ont été déterminées à l'aide du logiciel IPA. La fréquence d'observation de protéines appartenant à une voie cellulaire au sein de l'échantillon a été comparée à celle dans le protéome de référence (seuil de significativité fixé à $p\text{-value} < 0,05$). [B] Localisations cellulaires relatives des interactants identifiés déterminées selon l'annotation proposée par Gene Ontology.

En cellules aviaires, les interactants identifiés suggèrent ainsi de façon générale un impact de la protéine PB1-F2 H7N1 dans les phénomènes de transduction et d'organisation membranaire. Ces deux points s'intègrent dans la caractérisation de la relation entre la cellule et son environnement puisqu'ils témoignent d'une réorganisation du rythme et de la morphologie cellulaire en réponse à un contexte donné. Toutefois, les voies cellulaires proposées par le logiciel IPA sont fortement extrapolées et redondantes compte tenu qu'elles reposent presque uniquement sur l'intégrine $\beta 1$ et les tyrosine kinases. De plus, ces dernières peuvent être surreprésentées compte tenu de leur homologie de séquence.

4.3.3.2 Interactomes en cellules humaines

A l'instar de l'étude en cellules aviaires, le réseau d'interactions directes a été visualisé grâce au logiciel IPA (Figure 69). Les interactomes spécifiques aux protéines PB1-F2 H3N2 et H7N1 et celui regroupant les interacteurs communs (donc exclus des groupes précédents) ont été distingués pour l'analyse. Nous observons une interconnexion plus importante au sein de l'interactome PB1-F2 H3N2 que celui H7N1. De plus, les protéines communes présentent également un nombre conséquent d'interactions.

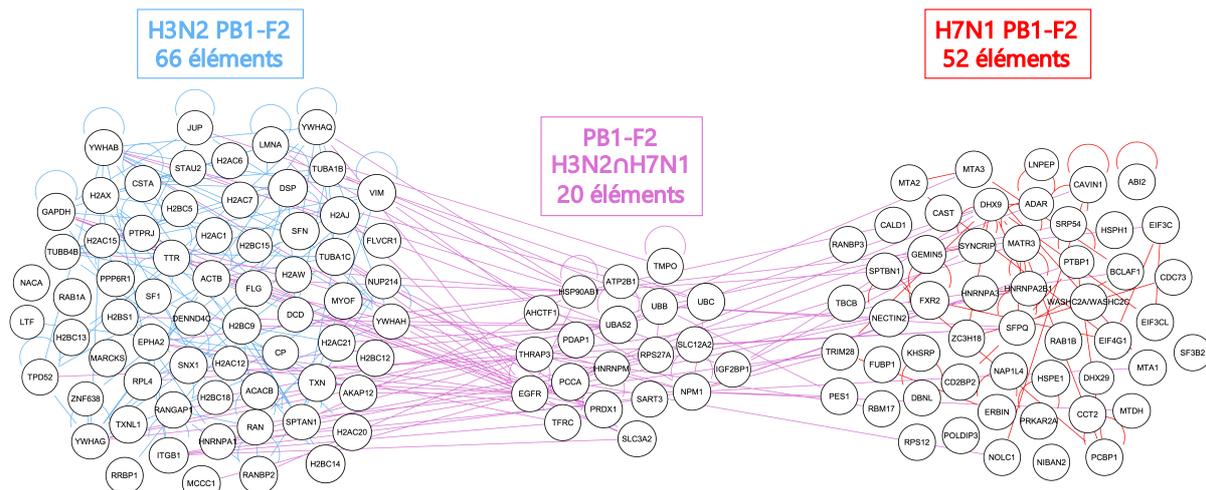


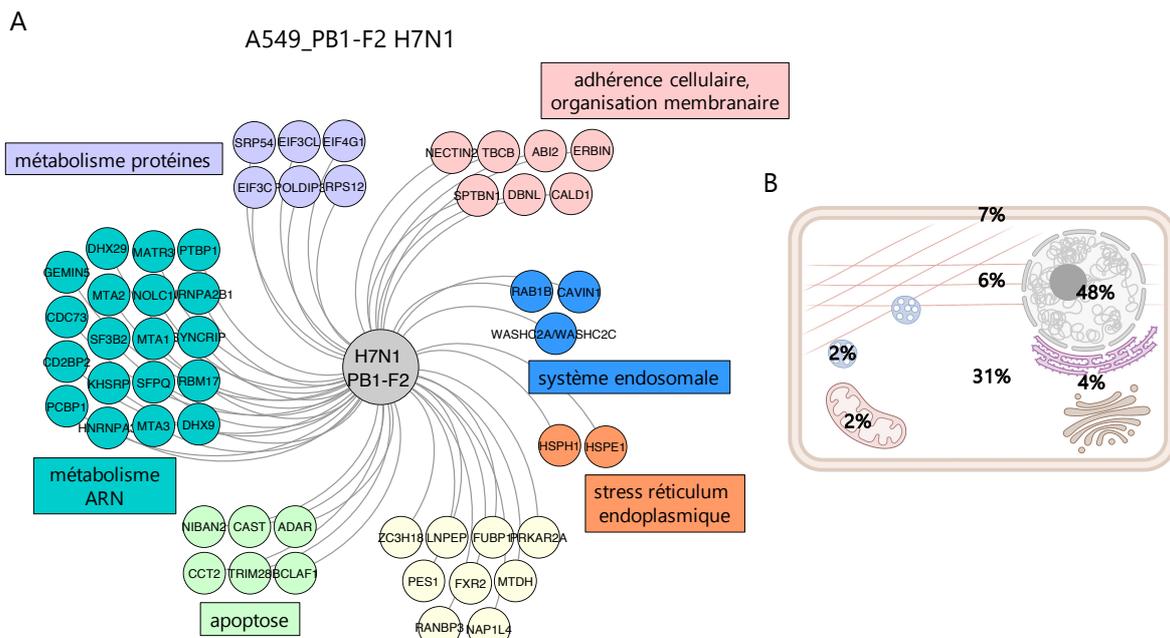
Figure 69 : réseau d'interaction au sein de l'interactome des protéines PB1-F2 H3N2 et H7N1 en cellules humaines.

Les traits bleus, rouges et violet indiquent des interactions directes respectivement spécifiques aux interactants de PB1-F2 H3N2, H7N1 et communs aux deux protéines.

4.3.3.2.a Interactome de PB1-F2 H7N1 en cellules humaines

Les fonctions prédominantes identifiées au sein de l'interactome de la protéine PB1-F2 H7N1 par le logiciel IPA sont liées au métabolisme des ARN (Figure 70C). Parmi les protéines représentant cette fonction, l'identification des DEAD-box hélicases DXH29 et DHX9 peut être soulignée puisque cette famille intègre RIG-I et MDA5. Cela pourrait refléter un impact de PB1-F2 H7N1 sur la réponse immunitaire médiée par MAVS dès l'étape de reconnaissance des ARN viraux.

Précédemment observées en cellules aviaires, les fonctionnalités des protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire, la structuration membranaire et les phénomènes d'endocytose sont retrouvées ici. Toutefois, elles semblent ici plus robustes compte tenu du nombre de protéines associées. Notamment, la composante endosomale semble relativement importante puisque trois éléments pertinents dans la formation des endosomes ont été identifiés : RAB1B, CAVIN1 et une sous unité du complexe WASH.



C

	-log(p-value)	protéines
Epissage ARN	6,50E-12	CD2BP2,DHX9,GEMIN5,HNRNPA2B1,HNRNPA3,KHSRP,PCBP1,PTBP1,RBM17,SF3B2,SFPQ,SYNCRIP
Métabolisme ARNm	1,65E-10	CD2BP2,CDC73,DHX9,GEMIN5,HNRNPA2B1,HNRNPA3,PCBP1,PTBP1,RBM17,SF3B2,SFPQ
Synthèse de protéines	8,27E-07	DHX9,EIF3C,EIF4G1,GEMIN5,NOLC1,PCBP1,POLDIP3,PTBP1,RPS12,SYNCRIP
Expression ARN	4,14E-06	BCLAF1,CAVIN1,CDC73,DHX9,EIF3C,EIF4G1,FUBP1,GEMIN5,HNRNPA2B1,MATR3,MTA1,MTA2,MTA3,MTDH,NIBAN2,NOLC1,SFPQ,SYNCRIP,TRIM28
Production d'acide lactique	1,72E-04	HNRNPA2B1,NIBAN2,PTBP1
Formation granule de stress	1,14E-03	ADAR,MTDH
Infection virale	1,21E-03	ADAR,BCLAF1,CALD1,CCT2,CDC73,DHX9,EIF3C,FUBP1,PES1,RAB1B,RBM17,SF3B2,SFPQ,SPTBN1,SYNCRIP
Réplication virus	2,83E-03	ADAR,CDC73,DHX9,EIF3C,FUBP1,PES1,SFPQ
Organisation membrane plasmique	1,34E-02	NECTIN2,SPTBN1
Formation cavéole	2,98E-02	CAVIN1
Apoptose	3,80E-02	ADAR,BCLAF1,CAST,CCT2,DHX9,EIF4G1,FUBP1,MTA2,MTDH,NIBAN2,SFPQ,SYNCRIP,TRIM28

Figure 70 : interactome de la protéine PB1-F2 H7N1 en cellules humaines.

[A] Les voies cellulaires significativement enrichies associées aux protéines identifiées ont été déterminées à l'aide du logiciel IPA. La fréquence d'observation de protéines appartenant à une voie cellulaire au sein de l'échantillon a été comparée à celle dans le protéome de référence (seuil de significativité fixé à $p\text{-value} < 0,05$). [B] Localisations cellulaires relatives des interactants identifiés déterminées selon l'annotation proposée par Gene Ontology.

De façon intéressante, le processus lié à l'apoptose est ressorti de l'analyse. Un rôle pro-apoptotique de PB1-F2 a été initialement observé en cellules immunitaires [41]. Une étude sur cellules épithéliales 293T et A549 a cependant permis d'observer une interaction de la PB1-F2 de la souche PR8 avec les protéines mitochondriales VDAC1 (« Voltage Dependent Anion Channel 1 ») et ANT3, ce qui induirait une perméabilisation de la membrane mitochondriale et favoriserait le relargage du cytochrome c [514], biomarqueur de l'apoptose. Parmi les protéines décrivant cette voie cellulaire, la présence de BCLAF1 est notable. En effet, cette protéine interagit avec le facteur Bcl2, largement décrit pour sa contribution dans la régulation de

l'apoptose [596]. L'identification de cette voie cellulaire et donc basée sur des acteurs relativement pertinents. Nous pouvons également remarquer la protéine TRIM28 qui appartient à la famille TRIM présentant un fort lien avec la médiation de la réponse antivirale [597].

Par conséquent, en cellules humaines, les interacteurs de PB1-F2 H7N1 identifiés indiquent une modulation de voies cellulaires qui se distinguent de celles identifiées en cellules aviaires. Notamment, nous observons une part importante des protéines de l'interactome impliquées dans le métabolisme des ARN. Ainsi, la protéine PB1-F2 H7N1 exprimée en cellules humaines développerait un rôle lié à la régulation de l'expression des gènes de l'hôte ou viraux. Des points plus précis liés à l'apoptose et à la régulation de la réponse immune ont également pu être définis. La thématique liée aux phénomènes de transduction n'est pas retrouvée en cellules humaines mais la présence de partenaires cellulaires impliqués dans l'organisation de la membrane plasmique constitue une base commune. Compte tenu du tropisme membranaire de PB1-F2, l'identification de telles protéines fait sens. La régulation de la morphologie cellulaire caractériserait ainsi une propriété constante de la protéine PB1-F2 H7N1, quel que soit l'hôte considéré.

4.3.3.2.b Interactome de PB1-F2 H3N2 en cellules humaines

L'interactome de la protéine PB1-F2 H3N2 en cellules A549 a permis d'identifier des voies cellulaires caractérisant très majoritairement des processus liés à la transduction ou à la régulation du cycle cellulaire : famille de protéines 14-3-3, ERK5, HIPPO, IGF-1, PI3K/AKT, PKA, ERK/MAPK (Figure 71C). A l'instar de ce qui a été observé dans l'interactome de la protéine PB1-F2 H7N1 en cellules aviaires, les voies cellulaires associées aux phénomènes de transduction sont très redondantes. Elles sont de plus basées essentiellement sur les protéines de la famille 14-3-3. Ainsi, à l'échelle des voies cellulaires, seule la famille 14-3-3 semble pertinente puisqu'elle constitue une base commune. Ces protéines sont toutefois éventuellement surreprésentées en conséquence de leur homologie de séquence. Sept membres ont été dénombrés chez les mammifères (β , ϵ , η , γ , σ , τ , et ζ) [598] et une forte conservation inter-espèces est observée [599]. De façon générale, ces protéines régulent des mécanismes cellulaires en interagissant avec certains éléments clefs de la voie concernée, ce qui se traduit par un impact sur leur localisation cellulaire ou leur aptitude à exercer leurs fonctions. De façon plus spécifique, la translocation des senseurs cellulaires RIG-I et MDA5 à la membrane mitochondriale est médiée respectivement par les protéines 14-3-3 ϵ et η [339,340]. Celles-ci contribuent ainsi au développement de la réponse antivirale via l'activation de la voie MAVS, soulignant l'intérêt de leur identification.

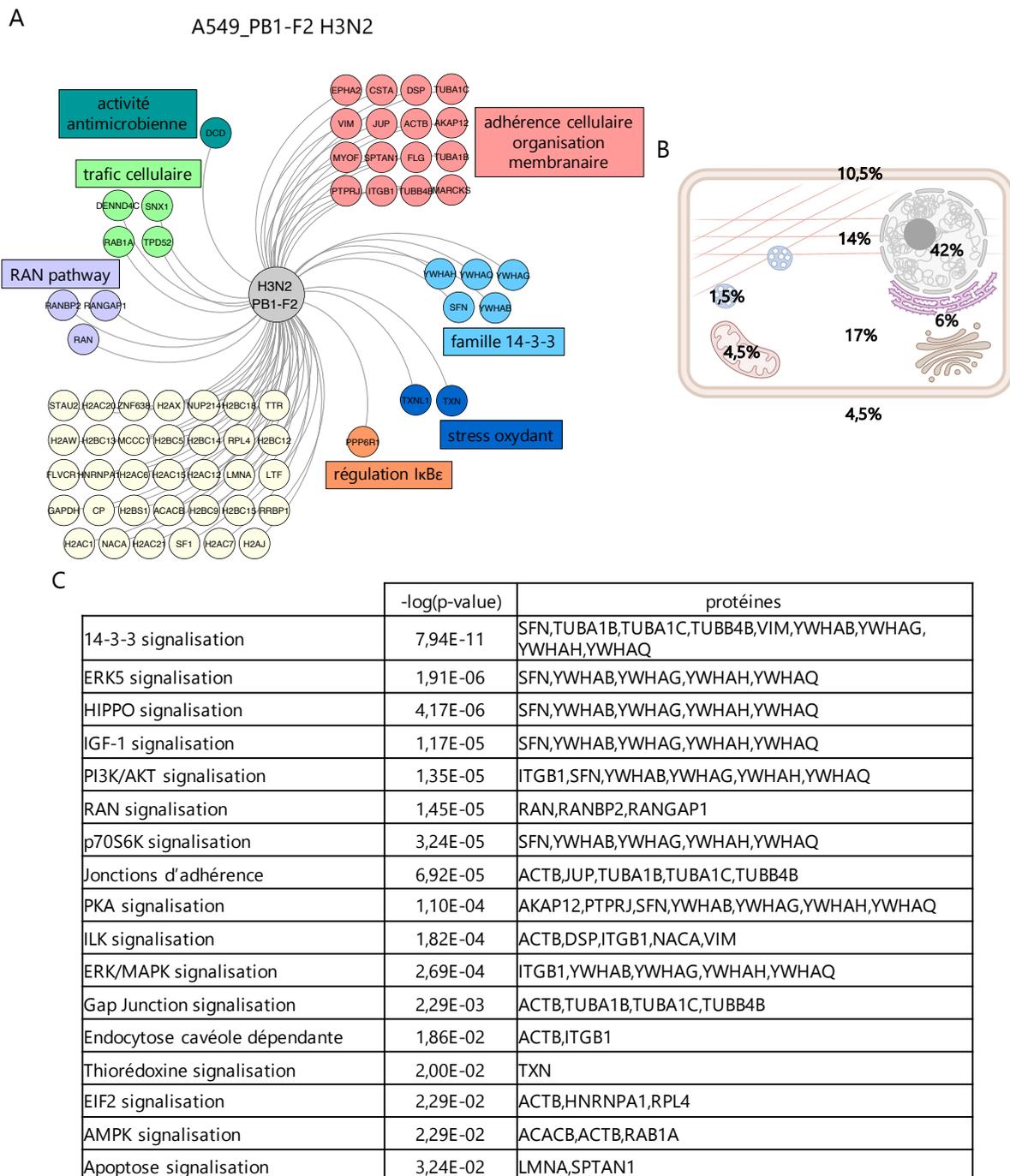


Figure 71 : interactome de la protéine PB1-F2 H3N2 en cellules humaines.

[A] Les voies cellulaires significativement enrichies associées aux protéines identifiées ont été déterminées à l'aide du logiciel IPA. La fréquence d'observation de protéines appartenant à une voie cellulaire au sein de l'échantillon a été comparée à celle dans le protéome de référence (seuil de significativité fixé à $p\text{-value} < 0,05$). [B] Localisations cellulaires relatives des interactants identifiés déterminées selon l'annotation proposée par Gene Ontology.

Une part relativement importante des protéines identifiées est associée au fonctionnement du cytosquelette (14%, Figure 71B). Dans l'interactome de la protéine PB1-F2 H3N2 en cellules humaines, cet ensemble de protéines représentait 6%. Cela est appuyé par les voies cellulaires identifiées par le logiciel IPA liées à l'adhérence et à l'organisation membranaire : « jonctions d'adhérence », « signalisation ILK », « jonctions de communication »,

« endocytose » (Figure 71C). Nous retrouvons ainsi avec la PB1-F2 d'origine humaine une forte dominante liée à la structuration de la morphologie cellulaire et aux phénomènes membranaires. Les protéines définissant ces fonctions diffèrent entre les deux interactomes, ainsi les voies cellulaires associées à ces protéines n'ont pas été entièrement regroupées au sein de l'interactome commun. Par ailleurs, l'implication de protéines dans deux types de transport intracellulaire peut être notée : la circulation entre le noyau et le cytoplasme représentée par la voie de signalisation associée aux protéines RAN et le trafic vésiculaire (DENND4C, SNX1, TPD52, RAB1A). Ce dernier point a également été observé au sein de l'interactome de la protéine PB1-F2 H7N1 en cellules humaines.

Une fonction liée à la réponse inflammatoire est apportée par la protéine PPP6R1 qui constitue une sous-unité régulatrice de la protéine phosphatase 6. Son interaction avec un élément inhibant l'activation des facteurs de transcription de la famille NF κ B, I κ B ϵ , a été décrite [600]. L'interaction permettrait de prévenir de la dégradation d'I κ B ϵ médiée par l'activation de la voie TNF α . Ainsi, cette protéine tendrait à limiter l'ampleur de la réponse inflammatoire cellulaire.

Enfin, l'identification d'un peptide à fonctions antimicrobiennes (DCD) est également remarquable. Plutôt caractérisée dans le cadre d'une sécrétion au niveau de l'épiderme, cette protéine est fonctionnelle sous forme oligomérisée et interagit avec la membrane des bactéries à Gram négatif induisant la formation d'un canal ionique et par conséquent une dépolarisation à l'origine de la mort de la bactérie [601].

Par conséquent, l'analyse de l'interactome de la protéine PB1-F2 H3N2 révèle une forte dominante relative aux phénomènes de transduction. Notamment, les protéines de la famille 14-3-3 semblent d'intérêt compte tenu de leur impact déjà identifié sur la voie apoptotique ainsi que la cascade MAVS. Ces deux voies cellulaires rejoignent des fonctions déjà décrites de PB1-F2. L'interaction potentielle avec la protéine PPP6R1 suggère un impact de PB1-F2 H3N2 sur l'activation de la voie NF- κ B *via* une action sur les éléments imposant sa séquestration cytoplasmique. Ces éléments étayent la contribution de PB1-F2 dans le développement de la réponse inflammatoire et antivirale. Par ailleurs, la protéine DCD pourrait indiquer une implication de PB1-F2 H3N2 dans le développement d'infections bactériennes. Enfin, nous retrouvons également une part importante de protéines impliquées dans la régulation de la morphologie cellulaire ainsi que des phénomènes membranaires. Compte tenu de la redondance de cette thématique au sein des trois interactomes étudiés, elle semble constituer un trait commun au sein de notre étude.

4.3.3.2.c Interactome commun aux PB1-F2 H7N1 et H3N2 en cellules humaines

L'analyse conduite avec le logiciel IPA met en exergue des fonctions liées aux ubiquitines (Figure 72C). En effet, plus de 50% des voies cellulaires identifiées enrichies sont basées sur ces protéines. Compte tenu de cette redondance et de la large gamme de fonctions associées aux ubiquitines, ces voies cellulaires générées par extension paraissent ainsi peu pertinentes (notamment la signalisation TLR). Par ailleurs, nous observons une dominante relative au transport assez forte, notamment du calcium (ATP2B1) et du fer (EGFR, TRFC) qui

constituent des voies cellulaires enrichies au sein de cet interactome. De plus, la protéine SLC12A2 est un cotransporteur Na^+ , K^+ , Cl^- qui, *via* la balance ionique, agit sur la régulation du volume cellulaire [602]. Enfin, la protéine SCL3A2 est impliquée dans le transport d'acides aminés en tant que chaperonnes des transporteurs effectifs [602]. Un quart des protéines identifiées sont associées à une localisation membranaire (Figure 72B), ce qui est relativement plus conséquent que la part relevée dans les interactomes spécifiques aux protéines PB1-F2 H7N1 et H3N2 (respectivement 7 et 10,5%). Cela appuie ainsi également la thématique transport comme base commune.

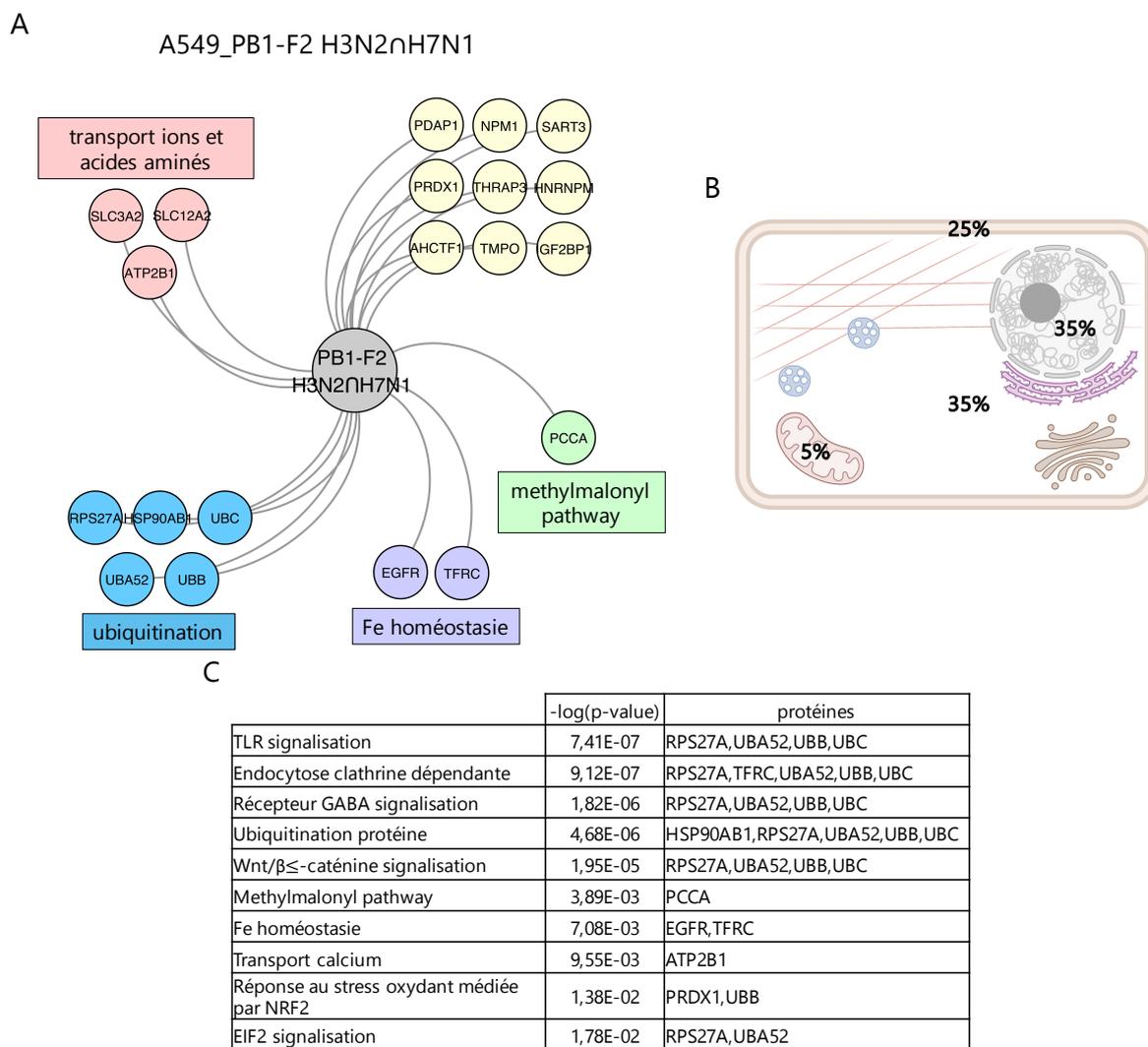


Figure 72 : interactome commun aux protéines PB1-F2 H3N2 et H7N1 en cellules humaines.

[A] Les voies cellulaires significativement enrichies associées aux protéines identifiées ont été déterminées à l'aide du logiciel IPA. La fréquence d'observation de protéines appartenant à une voie cellulaire au sein de l'échantillon a été comparée à celle dans le protéome de référence (seuil de significativité fixé à $p\text{-value} < 0,05$). [B] Localisations cellulaires relatives des interactants identifiés déterminées selon l'annotation proposée par Gene Ontology.

Par conséquent, l'analyse de l'interactome commun aux protéines PB1-F2 étudiées identifie dans un premier temps, en tant que fonction partagée inter-souche, un impact sur l'ubiquitination. Cela peut se traduire par une modification des cibles visées par l'adressage au protéasome ou de la régulation de l'activité de protéines. De plus, la régulation du transport

d'acides aminés ainsi que l'homéostasie ionique et du fer constituent également un socle commun. Les thématiques relatives aux mécanismes impliquant la membrane plasmique et au trafic cellulaire n'apparaissent pas ici compte tenu du fait que les protéines impliquées dans chacun des interactomes respectifs diffèrent. Cet aspect est donc également à prendre en compte.

4.3.4 Caractérisation fonctionnelle de l'interaction entre la protéine PB1-F2 H3N2 et celles de la famille 14-3-3

Compte tenu du rôle des protéines 14-3-3 dans la cascade de signalisation MAVS, l'interaction de PB1-F2 avec ces protéines semble pertinente et s'insère dans les fonctions déjà décrites de PB1-F2. Nous nous sommes donc focalisés sur cette famille. De plus, une telle interaction pourrait être spécifique à la protéine PB1-F2 H3N2, ce qui soulignerait une fonction différentielle de PB1-F2 selon l'espèce d'origine du virus considéré.

Les protéines 14-3-3 interagissent avec leurs partenaires cellulaires sous forme de dimères reconnaissant des motifs incluant des paires sérine/thréonine phosphorylées [603]. Nous nous sommes appuyés sur un outil prédictif afin d'identifier des motifs potentiels d'interaction au sein de séquences protéiques des PB1-F2 étudiées (Figure 73). Cet outil s'appuie sur trois scores issus de méthodes d'apprentissage automatiques supervisées (réseau de neurones artificiels - ANN, machine à vecteurs support - SVM) et d'une matrice de poids de position (PSSM). Deux sites ont pu être déterminés : un premier commun aux deux protéines et un second spécifique à la PB1-F2 H3N2, positionné en région C-terminale. Ce dernier, pouvant appuyer l'interaction différentielle observée avec l'approche BioID2, semble ainsi particulièrement d'intérêt.

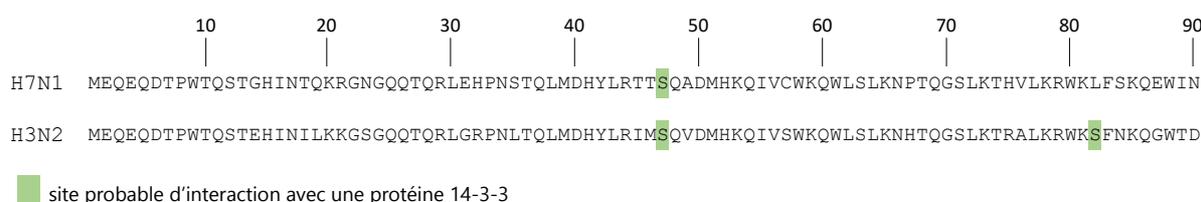


Figure 73 : motifs d'interaction prédictif de PB1-F2 avec les protéines de la famille 14-3-3.

Les sites d'interaction prédictifs ont été déterminés à l'aide de l'outil « 14-3-3 pred » [604]. L'estimation a été réalisée en compilant trois méthodes de prédiction. Seuls les sites présentant un score suffisamment élevé pour les trois approches ont été retenus.

Une expérience de co-immunoprécipitation a été réalisée dans le but de valider l'interaction PB1-F2 H3N2/14-3-3 par une seconde méthode et d'apporter de la précision quant aux protéines de la famille concernées par cette interaction. Nous avons ainsi tenté de co-immunoprécipiter les protéines 14-3-3 β , ϵ , η et σ *via* PB1-F2 H3N2 - et inversement - mais cela n'a pas été concluant. Ce type d'approche pouvant être délicate, nous avons par la suite eu recours à des plasmides rapporteurs afin de tenter de définir la relation PB1-F2/14-3-3 au travers du prisme de l'impact de leur interaction potentielle sur la régulation de voies cellulaires. Un modèle de co-expression de ces protéines afin d'en étudier l'issue sur l'activation de l'IFN β

et NF-κB a ainsi été mis en place. Nous nous sommes focalisés sur les protéines 14-3-3ε et η, les protéines RIG-I et MDA5 constituant les signaux inducteurs, relativement au rôle respectif des 14-3-3 étudiées dans leur translocation à la membrane mitochondriale.

4.3.4.1 Protéine 14-3-3η

Une contribution majeure de RIG-I dans la synthèse d'interférons suite à l'infection avec un IAV a été identifiée et, par extension, RIG-I a été défini comme le principal détecteur du génome des IAV [343]. Cependant, une étude a observé que la capacité d'un virus à contrecarrer MDA5 constituait un avantage réplcatif [344]. En ce sens, MDA5 semble jouer un rôle complémentaire à RIG-I au cours du cycle viral, c'est pourquoi nous nous sommes tout de même intéressés à cette hélicase et à l'action que pouvait avoir le duo 14-3-3η/PB1-F2 sur son activité.

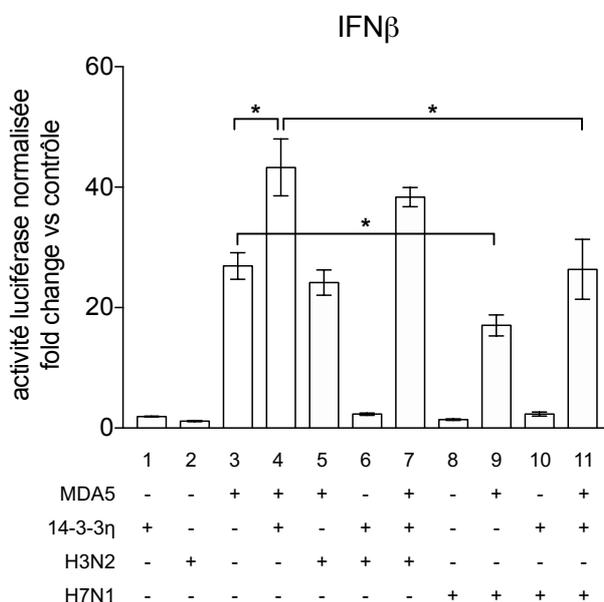


Figure 74 : impact de l'interaction entre PB1-F2 H3N2 et 14-3-3η sur l'activation de la réponse antivirale cellulaire.

Des cellules 293T ont été co-transfectées avec différentes combinaisons de plasmides exprimant les protéines PB1-F2 H3N2 ou H7N1, 14-3-3η, MDA5 en complément du plasmide pIFNβ-luc en tant que rapporteur du niveau d'activation de la réponse immune. Les signaux luminescents ont été normalisés par rapport au taux de transfection des cellules reflété par le signal fluorescent généré par le plasmide pCI GFP intégré. Les données représentent la valeur moyenne de l'activité luciférase normalisée ± écart type (n=4). ; * : p-value <0,05 (test de Mann-Whitney).

L'amplification de l'action pro-IFN de MDA5 par la protéine 14-3-3η déjà observée [339] est retrouvée dans notre modèle (Figure 74). L'expression de la protéine PB1-F2 de la souche H3N2 n'induit pas de modification sur l'induction générée par MDA5, seule ou associée à 14-3-3η. La protéine PB1-F2 d'origine aviaire inhibe la réponse IFN générée par MDA5 à la fois en l'absence et présence de 14-3-3η. Cela pourrait refléter une action de PB1-F2 H7N1 sur les protéines endogènes ou une action sur la voie MDA5 indépendante de la protéine 14-3-3η. Dans la seconde option, cela rejoindrait les résultats obtenus par l'approche BiOLD2 qui ne

relèvent pas de lien entre cette protéine PB1-F2 et la famille 14-3-3.

Ainsi, l'activité de la protéine 14-3-3 η n'est pas régulée par PB1-F2 H3N2, ce qui permet de l'exclure de la liste des interacteurs potentiels identifiés. Dans le cas de la PB1-F2 aviaire, nous ne pouvons conclure quant à la dépendance de l'action de PB1-F2 sur l'induction de la voie IFN β par MDA5 vis-à-vis de 14-3-3 η .

4.3.4.2 Protéine 14-3-3 ϵ

Tout comme la protéine 14-3-3 η , la forme ϵ possède une activité pro IFN-I grâce à son rôle dans la translocation de RIG-I vers la membrane mitochondriale [340]. Nous retrouvons également ce résultat dans notre configuration (Figure 75A). L'expression de la protéine PB1-F2 H3N2 inhibe cette action et la PB1-F2 d'origine aviaire n'induit pas de modulation particulière. De plus, nous observons une inhibition de l'activité NF- κ B par l'action de la protéine 14-3-3 ϵ (Figure 75B), ce qui lui attribue une action opposée sur les deux voies découlant de l'activation de MAVS. Contrairement à la réponse IFN β , l'impact de 14-3-3 ϵ sur la voie NF- κ B n'est pas décrit actuellement, ainsi il est difficile d'évaluer cette information. L'expression de la protéine PB1-F2 H3N2 appuie l'inhibition induite par 14-3-3 ϵ et PB1-F2 H7N1 ne joue également pas de rôle dans ce modèle. Il est notable que l'effet inhibiteur de la voie IFN observé avec une induction par MDA5 n'est pas retrouvé ici. Cela suggère un effet spécifique de PB1-F2 H7N1 sur cette hélicase.

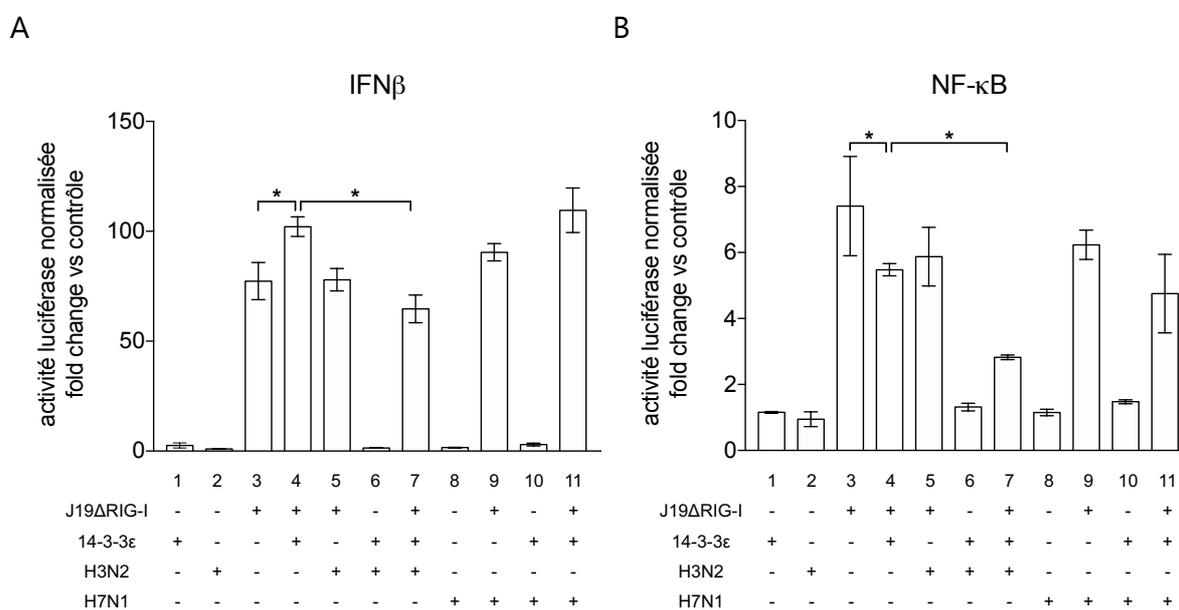


Figure 75 : impact de l'interaction entre PB1-F2 H3N2 et 14-3-3 ϵ sur l'activation de la réponse antivirale et inflammatoire cellulaire.

Des cellules 293T ont été co-transfectées avec différentes combinaisons de plasmides exprimant les protéines PB1-F2 H3N2 ou H7N1, 14-3-3 ϵ , RIG-I constitutivement active (J19 Δ RIG-I) en complément du plasmide pIFN β -luc ou pNF- κ B-luc en tant que rapporteur du niveau d'activation de la réponse immunitaire. Les signaux luminescents ont été normalisés par rapport au taux de transfection des cellules reflété par le signal fluorescent généré par le plasmide pCI GFP intégré. Les données représentent la valeur moyenne de l'activité luciférase normalisée \pm écart type (n=4) ; * : p-value <0,05 (test de Mann-Whitney).

Les observations précédentes apportent des arguments à l'interaction potentielle entre la protéine PB1-F2 H3N2 et 14-3-3 ϵ . En effet, la propension de PB1-F2 H3N2 à inhiber l'activité IFN β et NF- κ B découlant de l'activation de RIG-I est médiée par une régulation des propriétés de 14-3-3 ϵ . Comme relevé précédemment, nous observons ainsi une cohérence entre l'approche par plasmides rapporteurs et celle BiOLD2 : l'interaction avec la famille 14-3-3 semble spécifique à la PB1-F2 d'origine mammifère. De plus, une précision a pu être apportée aux résultats générés par spectrométrie de masse en excluant la protéine 14-3-3 η .

cellules A549						
H3N2 PB1-F2			H7N1 PB1-F2			commun
ACACB	H2BC14	SF1	ABI2	LNPEP	TBCB	AHCTF1
ACTB	H2BC15	SFN	ADAR	MATR3	TRIM28	ATP2B1
AKAP12	H2BC18	SNX1	BCLAF1	MTA1	WASHC2A/WASHC2C	EGFR
CP	H2BC5	SPTAN1	CALD1	MTA2	ZC3H18	HNRNPM
CSTA	H2BC9	STAU2	CAST	MTA3		HSP90AB1
DCD	H2BS1	TPD52	CAVIN1	MTDH		IGF2BP1
DENND4C	HNRNPA1	TTR	CCT2	NAP1L4		NPM1
DSP	ITGB1	TUBA1B	CD2BP2	NECTIN2		PCCA
EPHA2	JUP	TUBA1C	CDC73	NIBAN2		PDAP1
FLG	LMNA	TUBB4B	DBNL	NOLC1		PRDX1
FLVCR1	LTF	TXN	DHX29	PCBP1		RPS27A
GAPDH	MARCKS	TXNL1	DHX9	PES1		SART3
H2AC1	MCCC1	VIM	EIF3C	POLDIP3		SLC12A2
H2AC12	MYOF	YWHAB	EIF3CL	PRKAR2A		SLC3A2
H2AC15	NACA	YWHAG	EIF4G1	PTBP1		TFRC
H2AC20	NUP214	YWHAH	ERBIN	RAB1B		THRAP3
H2AC21	PPP6R1	YWHAQ	FUBP1	RANBP3		TMPO
H2AC6	PTPRJ	ZNF638	FXR2	RBM17		UBA52
H2AC7	RAB1A		GEMIN5	RPS12		UBB
H2AJ	RAN		HNRNPA2B1	SF3B2		UBC
H2AW	RANBP2		HNRNPA3	SFPQ		
H2AX	RANGAP1		HSPE1	SPTBN1		
H2BC12	RPL4		HSPH1	SRP54		
H2BC13	RRBP1		KHSRP	SYNCRIP		

Tableau 14 : liste des interacteurs potentiels identifiés en cellules humaines.

cellules CLEC213		
H7N1 PB1-F2		
NUCL	ITGB1	YAP1
YES1	RPS6	EIF5A2
YRK	ZC3H11A	RPL10
FYN	CALD1	
SRC	HSP90AA1	
IGF2BP1	P4HA1	

Tableau 15 : liste des interacteurs potentiels identifiés en cellules de poulet.

5. Discussion

Les infections humaines avec des virus influenza responsables des épidémies saisonnières sont un risque connu et anticipable. Par opposition, l'émergence de nouvelles souches d'IAV par franchissement de la barrière d'espèce ou réassortiment est une menace difficilement maîtrisable et prédictible. Ces virus émergents ont un potentiel pathogène et pandémique conséquent et peuvent constituer une problématique de santé importante. La protéine non structurale PB1-F2 des IAV est non essentielle à la réplication mais apte à moduler la réponse immunitaire et par extension la pathogénicité. Il existe une importante spécificité à la fois de souche, d'hôte et de type cellulaire. De façon assez générale, PB1-F2 semble présenter une propension à atténuer la pathogénicité chez les espèces aviaires, qu'ils s'agissent de souches LPAI [488] ou HPAI [496]. Au contraire, chez le mammifère, PB1-F2 peut contribuer fortement à la pathogénicité et un effet pro-inflammatoire lui a été attribué [499,502,506,534]. L'émergence d'un virus zoonotique d'origine aviaire ou d'un virus réassorti intégrant un segment PB1 aviaire implique l'expression d'une PB1-F2 aviaire au sein d'un hôte humain. Au vu des variabilités de fonctions de PB1-F2, nous nous sommes interrogés quant aux propriétés d'une PB1-F2 aviaire exprimée au sein d'un hôte humain et à l'issue sur la pathologie développée. La majorité des études caractérisant la protéine PB1-F2 dans un modèle mammifère d'infection par un virus aviaire est basée sur des souches HPAI [486,500,528]. Tout comme ces derniers, certains virus LPAI sont aptes à franchir la barrière d'espèce [242,243,605,606]. Le peu d'éléments de caractérisation des protéines PB1-F2 issues de virus LPAI disponible nous a conduit à sélectionner une souche aviaire LPAI. Nous avons donc entrepris d'étudier l'impact de PB1-F2 sur la réponse de l'hôte en systèmes cellulaires et chez la souris avec pour virus modèles les souches H7N1 LPAI, humaine H3N2 ainsi que la chimère produite par une insertion du segment 2 aviaire au sein du génome viral H3N2. Par ailleurs, les actions d'une protéine étant dictées par ses partenaires cellulaires au sein de l'hôte infecté, nous nous sommes attachés à définir les interactomes différentiels des PB1-F2 étudiées afin de relever les mécanismes communs et spécifiques d'espèce.

5.1 Propriétés de la protéine PB1-F2 H7N1 chez l'hôte aviaire

La protéine PB1-F2 H7N1 n'a pas induit de modulation de la réponse immunitaire innée en cellules épithéliales pulmonaires de poulet. Cela suggère que, selon les indicateurs que nous avons étudiés, la PB1-F2 aviaire ne jouerait pas de rôle clairement identifiable déterminant la pathogénicité du virus. De plus, sur embryons de poule, la délétion de PB1-F2 n'a induit aucun impact sur le niveau ou la dispersion de la réplication du virus. Néanmoins, les résultats sur la mortalité indiquent que la protéine pourrait cependant accélérer le développement de la pathologie. En 2014, Daniel Marc et son équipe (UMR ISP, INRAE Centre Val de Loire - site de Nouzilly), au cours d'une étude conduite sur poulets B13, ont observé des résultats similaires. En effet, relativement au virus WT, les animaux infectés avec le virus H7N1 F2 n'ont présenté aucune différence notable en termes de mortalité, excrétion virale oro-pharyngée ainsi que

d'amplitude de la réponse inflammatoire et antivirale. Ces résultats basés sur un modèle *in vivo* appuient nos conclusions. Toutefois, des études conduites à la fois avec des souches HPAI et LPAI ont noté en modèle aviaire une atténuation de la virulence par PB1-F2 [488,496,510]. En effet, chez le poulet, la délétion de PB1-F2 s'est traduite par une augmentation nette de la mortalité associée à un virus H5N1 HPAI et H9N2 LPAI. De plus, l'analyse de la réponse cellulaire a relevé une surexpression de gènes liés à la réponse antivirale et inflammatoire en absence de PB1-F2. Les résultats générés dans notre étude seraient ainsi propres à la souche H7N1 LPAI utilisée, cela souligne l'importante variabilité de fonctions associées à PB1-F2 et la difficulté liée à la généralisation des observations.

L'interactome de la PB1-F2 H7N1 réalisé en cellules épithéliales pulmonaires de poulet indique une forte composante liée à la transduction du signal, les voies biologiques liées aux Tec kinases et la voie HIPPO ont notamment été identifiées dans ce cadre. Chez les mammifères, les Tec kinases sont principalement exprimées au sein des cellules hématopoïétiques et des hépatocytes [607]. Leurs actions ont particulièrement été identifiées dans le cadre de la régulation de la signalisation des lymphocytes T [608]. Par ailleurs, dans un modèle murin de stimulation au LPS, une modulation par les Tec kinases de la réponse immune pulmonaire *via* leur rôle dans la synthèse de l'IL8 a été identifiée [609]. Cette chimiokine notamment impliquée dans l'infiltration des neutrophiles [610]. Toutefois, la cartographie de l'expression de ces protéines chez le poulet et l'analyse de leurs fonctions dans des cellules épithéliales n'ont pas été réalisées. Ainsi il est délicat d'évaluer la pertinence de leur identification au sein de cellules épithéliales pulmonaires. La voie de signalisation HIPPO, identifiée par la protéine YAP1 qui constitue un de ses effecteurs majeurs, correspond à une cascade de sérine et thréonine kinases régulant des fonctions associées au cycle cellulaire [611]. Une forte activation de cette voie cellulaire a été observée au sein de fibroblastes de poulet infectés avec un virus H7N9 [612]. Cette induction n'a pas été observée en cellules pulmonaires humaines (A549) ce qui suggère qu'elle constituerait une spécificité d'hôte. De plus, un virus inactivé aux UV perd cette aptitude, ainsi celle-ci serait médiée par une protéine exprimée au cours du cycle viral. Cependant, la conséquence fonctionnelle de l'induction - ou absence d'induction - de la voie HIPPO n'a pas été déterminée. Enfin, nous avons observé une légère surexpression d'une intégrine (ITGβ6) suite à l'infection avec le virus H7N1. Cette famille protéique est retrouvée au sein de l'approche interactomique qui a identifié l'ITGβ1 comme interagant potentiel. Cette redondance pourrait témoigner d'un réel impact de PB1-F2 sur les intégrines. Une analyse protéomique conduite sur des tissus pulmonaires embryonnaires de poulet a identifié une surexpression de protéines liées à l'adhérence cellulaire, dont notamment une intégrine (sous-unités non précisées), suite à une infection avec un virus H9N2 [613]. Il est ainsi envisageable que PB1-F2 puisse contribuer à cette régulation ce qui pourrait agir sur la cohérence du tissu épithélial.

5.2 Propriétés de la protéine PB1-F2 H3N2 chez l'hôte mammifère

En modèle cellulaire, une contribution de la protéine PB1-F2 à la réponse inflammatoire et antivirale initiée suite à une infection avec le virus H3N2 a été observée. Ces résultats ont par la suite été en partie appuyés par des expérimentations conduites chez la souris. En effet, une fonction pro-inflammatoire de PB1-F2 assignée à une phase relativement précoce de l'infection (avant l'apparition de signes cliniques) a pu être identifiée par mesure de l'activation de NF- κ B. Ce phénomène a également été observée avec la souche WSN [498,499]. Par ailleurs, au sein de l'interactome, la protéine PPP6R1 (sous-unité de PPP6) a été identifiée. Interagissant avec I κ B ϵ [600], cette protéine tend à préserver cette dernière de la dégradation. Or, I κ B ϵ séquestre NF- κ B au cytoplasme. L'interaction de PB1-F2 avec PPP6R1 priverait I κ B ϵ de sa protection, promouvant ainsi l'activité de NF- κ B. Cela pourrait constituer un mécanisme moléculaire expliquant les propriétés pro-inflammatoires de PB1-F2. L'analyse de l'expression de gènes au sein du tissu pulmonaire a révélé que l'IL1 β a été sujette à une régulation médiée par PB1-F2. Cette cytokine reflète le niveau d'activité de la caspase 1 et ainsi par extension celle de l'inflammasome NLPR3. Une activation de ce dernier par PB1-F2 a déjà été observée [364,508,534]. L'inflammasome agit notamment comme un senseur du stress mitochondrial, une production excessive de ROS [367] ou d'ADN mitochondrial oxydé [365] constituant des signaux d'assemblage du complexe. La propension de PB1-F2 à perturber le potentiel mitochondrial *via* la formation de pores au sein de la membrane constituerait ainsi une voie d'activation [509,512]. Enfin, nous pouvons noter que l'impact de PB1-F2 H3N2 sur la réponse immunitaire semble de moindre ampleur en comparaison avec la protéine PB1-F2 H7N1. En effet, le nombre de gènes liés à la réponse inflammatoire dont l'expression est modulée par PB1-F2 H3N2 et l'issue sur la pathogénicité du virus sont limités. Cela suggère que PB1-F2 jouerait un rôle moins critique au sein de ce virus. Contrairement aux virus H1N1, les sous-types H3N2 encodent très majoritairement une PB1-F2 fonctionnelle (plus de 80%) [495]. Cela pourrait souligner un aspect moins délétère de la protéine et ainsi une pression de sélection relative à sa troncature moins importante. Une étude a observé que les PB1-F2 exprimées par des virus H3N2 saisonniers possèdent un potentiel inflammatoire réduit par rapport à celle exprimée par le virus pandémique H3N2/1968 dont le segment 2 était d'origine aviaire [495]. Cela suggère une atténuation des propriétés de virulence de PB1-F2 au sein des souches H3N2 adaptées à l'Homme.

L'interactome de la PB1-F2 H3N2 a permis l'identification d'un peptide à fonctions antimicrobiennes, la dermicidine (DCD). Ce point est assez intéressant compte tenu de la propension de certaines PB1-F2 à favoriser les surinfections bactériennes. Notamment, la présence des résidus I68, L69, V70 [506] ou L62, R75, R79, L82 [503,614] a été associée à ce phénomène. La souche H3N2 incluse dans l'étude présente le phénotype L62, R75, R79, S82, ce qui suggère qu'elle pourrait avoir un caractère pro-inflammatoire et être propice à faciliter une surinfection bactérienne. Il est à noter que les études précédentes ont été conduites avec uniquement des souches de bactéries à Gram positif. Bien que la dermicidine semble plus performante sur les bactéries à Gram négatif [615], elle est tout de même capable d'agir

également sur les Gram positifs (notamment *S.aureus* [616]). Cependant, la cartographie de l'expression du gène codant DCD n'a pas identifié les poumons comme organe producteur [615]. Ce point serait ainsi à étudier au sein de nos cellules modèles BEAS-2B afin de vérifier si l'identification de ce peptide est due à une contamination de l'échantillon. Par ailleurs, l'ITGβ1, déjà identifiée dans l'interactome de PB1-F2 H7N1 en cellules aviaires, est également retrouvée ici. Dans le cas du virus H3N2, nous n'avons observé aucune modulation de l'expression de l'ITGβ6 qui pourrait appuyer cette thématique. Toutefois, outre l'aspect gestion de la cohérence cellulaire évoqué précédemment avec PB1-F2 H7N1, les protéines impliquées dans l'adhérence cellulaire sont également exploitées par les bactéries comme point de fixation et d'entrée intracellulaire, notamment par la voie des intégrines [617–619]. Une surexpression de diverses intégrines a été observée sous l'action de TGFβ1 [620] et par la suite, une étude conduite en cellules A549 a révélé que la neuraminidase du virus PR8, *via* son activation de TGFβ1, augmentait la susceptibilité de l'épithélium à une colonisation bactérienne [621]. Une interaction de PB1-F2 avec ITGβ1 pourrait constituer une autre voie par laquelle le virus agirait sur la probabilité d'une surinfection bactérienne. Cependant, la conséquence de cette interaction sur la fonctionnalité de l'intégrine et par extension l'impact sur sa capacité à réguler l'entrée d'une bactérie est difficile à prévoir. La modulation de PB1-F2 sur la voie de signalisation ILK liées aux intégrines pourrait ainsi éventuellement constituer un mécanisme favorisant - ou non - ce phénomène. Ces deux interactants potentiels pourraient ainsi définir des mécanismes par lesquels PB1-F2 joue sur le développement d'une surinfection bactérienne.

Les protéines de la famille 14-3-3 sont à la base de la définition de la plupart des voies cellulaires identifiées au sein de l'interactome. Ces protéines sont fonctionnelles sous forme de dimères - principalement hétérodimères - et interagissent avec leurs partenaires cellulaires en reconnaissant des motifs incluant des paires de sérine/thréonine phosphorylées [622]. Chez l'Homme, la régulation de plus de 200 phosphoprotéines par les membres de la famille 14-3-3 a été identifiée [623]. Parmi le large panel de voies cellulaires régulées par ces protéines, des impacts sur des fonctions liées à différentes infections virales ont été identifiés (Tableau 16).

La protéine 14-3-3τ interagit avec le facteur pro-apoptotique Bax ce qui se traduit par sa séquestration cytoplasmique [631]. Or, Bax est un membre de la famille des protéines Bcl-2 qui, suite à un signal apoptotique, migre à la membrane mitochondriale [516,517] puis s'oligomérisent [632], ce qui se traduit par sa perméabilisation et par conséquent un relargage de cytochrome c [633]. La protéine 14-3-3τ présente ainsi un rôle anti-apoptotique. Une perméabilisation de la membrane mitochondriale médiée par la PB1-F2 du virus PR8 *via* les protéines BAX et BAK (membre également de la famille Bcl-2) a été identifiée [507]. Ce phénomène semble toutefois assez spécifique car non retrouvé avec six autres PB1-F2 issues de souches H1N1, H3N2 et H5N1. La protéine 14-3-3τ pourrait ainsi constituer le levier par lequel PB1-F2 agit sur l'activité de BAX et donc le relargage de cytochrome c. Par ailleurs, les protéines 14-3-3η [339] et ε [340] sont impliquées dans la translocation de respectivement MDA5 et RIG-I vers la membrane mitochondriale et donc l'activation de MAVS. Une exploitation de cette voie d'action sur la réponse immune a été identifiée pour la protéine NS3 du virus Zika [624]. En effet, l'interaction de NS3 avec ces deux protéines 14-3-3 abolit leur

action sur les deux hélicases respectives.

14-3-3	génom	virus	protéine virale	issue de l'interaction	réf
ϵ, η	ARNsb(+)	virus Zika	NS3	inhibe la réponse immunitaire médiée par RIG-I et MDA5	[624]
τ	ARNsb(+)	coronavirus	N	translocation du noyau vers le cytoplasme de la protéine N phosphorylée	[625]
τ	ARNsb(+)	HIV-1	Vpr	arrêt du cycle cellulaire (lymphocyte T)	[626]
ϵ	ARNsb(+)	virus de l'hépatite C	Core	activation de l'apoptose <i>via</i> la translocation de Bax à la mitochondrie	[627]
β	ARNsb(-)	virus parainfluenza de type 5	M	inhibition du bourgeonnement des particules virales	[628]
ϵ, γ	ADNsb	virus adéno-associé de type 2	Rep68	inhibition de la réplication virale	[629]

Tableau 16 : recensement des interactions connues protéines virales/14-3-3.

Adapté de [630].

Compte tenu des liens entre PB1-F2 et MAVS, nous avons entrepris une caractérisation de l'impact de l'interaction potentielle de PB1-F2 H3N2 avec ces protéines 14-3-3 sur la réponse de l'hôte. En s'appuyant sur une approche basée sur l'emploi de plasmides rapporteurs, nous avons pu exclure 14-3-3 η de la liste des interactants potentiels. Concernant 14-3-3 ϵ , nous avons observé une inhibition de la voie IFN β et NF- κ B. Dans le premier cas, PB1-F2 H3N2 s'oppose à l'action de 14-3-3 ϵ et dans le second, elle amplifie son action (Figure 76). Tout comme avec la protéine NS3 du virus Zika, l'interaction pourrait limiter le nombre de protéines 14-3-3 ϵ disponibles pour agir sur la translocation de RIG-I ce qui justifierait l'activité IFN β réduite. Concernant NF- κ B, l'impact de 14-3-3 ϵ sur cette voie n'étant pas spécifiquement caractérisé, il est difficile de cibler la ou les protéine(s) sous-jacentes à l'activation de MAVS dont le fonctionnement serait modulé par l'intervention de PB1-F2 H3N2. Ces résultats s'opposent à nos observations réalisées en contexte infectieux puisqu'un rôle pro-inflammatoire et pro-interféron de PB1-F2 H3N2 a été relevé en phase précoce de l'infection. Ces éléments soulignent la diversité des fonctions de PB1-F2 selon le modèle considéré. En outre, cela pourrait suggérer un aspect cinétique lié à l'interaction PB1-F2/14-3-3 ϵ . Initialement non effective, celle-ci prendrait place au cours de l'infection.

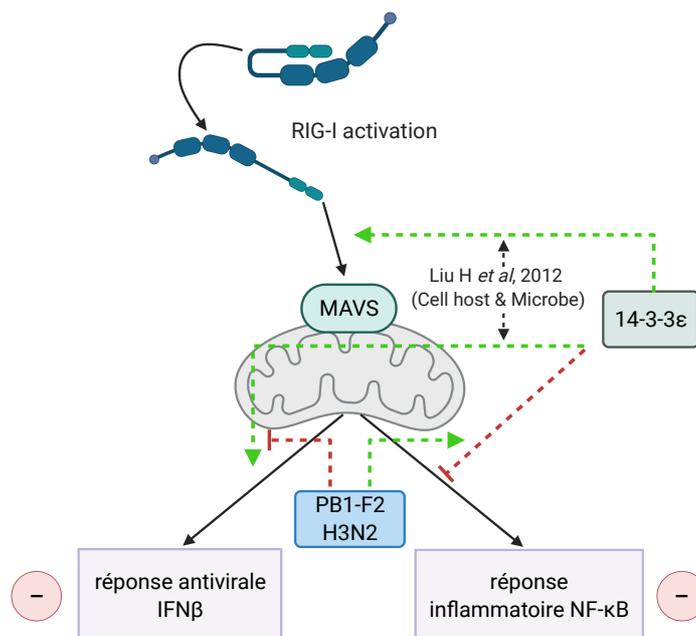


Figure 76 : schéma modélisant la régulation de l'activité de la protéine 14-3-3ε par PB1-F2 H3N2.

Les flèches en pointillés matérialisent les actions de la protéine 14-3-3ε sur la cascade de signalisation RIG-I ainsi que les modulations de ces actions par la protéine PB1-F2 H3N2. Une flèche verte symbolise une activation et flèche rouge une inhibition. Les symboles ⊖ indiquent l'effet global d'inhibition de la protéine PB1-F2 H3N2 sur la réponse IFNβ et NF-κB induite par RIG-I.

5.3 Propriétés de la protéine PB1-F2 H7N1 exprimée chez le mammifère

5.3.1 Modélisation d'un franchissement de la barrière d'espèce

En cellules humaines, PB1-F2 n'a pas été associée à une modulation de la réponse développée suite à l'infection avec le virus H7N1. Ainsi, en modèle *in vitro*, cette protéine ne semble pas impliquée dans la régulation de la virulence, quel que soit l'hôte considéré. Cependant, une nette contribution de PB1-F2 à la réponse inflammatoire, antivirale ainsi qu'à la pathologie a été identifiée en modèle murin. Cela souligne la capacité du virus aviaire à infecter un hôte mammifère sans adaptation préalable. Toutefois, il est délicat d'interpréter ce résultat en modèle murin comme un témoignage du potentiel zoonotique de la souche compte tenu du déséquilibre entre les récepteurs ASα2,3gal et ASα2,6gal observé au sein de l'épithélium respiratoire de la souris qui serait plus favorable aux hémagglutinines aviaires qu'humaines [172]. Le caractère pro-pathogène de PB1-F2 n'est ainsi révélé que dans un modèle complexe, ce qui suggère une forte implication de cellules immunitaires. Ce point est appuyé par la contribution de PB1-F2 dans le développement d'une détresse respiratoire, reflet de l'état inflammatoire des poumons et par extension du taux d'infiltration de cellules immunitaires. Par ailleurs, un recrutement excessif de neutrophiles a été associé aux facteurs contribuant à la pathogénicité de la PB1-F2 issue de la souche WSN [499].

Les propriétés pro-inflammatoires de PB1-F2 H7N1 développées en modèle murin rejoignent les résultats observés avec la souche H3N2 étudiée ici mais également d'autres virus d'origine humaine [498,503,534]. Ainsi, dans un modèle de franchissement de la barrière

d'espèce, la protéine PB1-F2 H7N1 a acquis des fonctions non observées chez un hôte aviaire et qui se rapprochent de celles usuellement associées à des PB1-F2 exprimées par des virus humains.

Peu exprimée en condition basale, une analyse conduite sur des tissus pulmonaires humains a identifié une surexpression d'ITGβ6 au niveau de zones inflammatoires [634]. Cet événement serait peu avantageux pour l'organisme. En effet, en modèle murin, la suppression de l'expression de cette protéine se traduit par une sensibilité moindre des animaux à une infection grippale [635]. Un modèle proposé est une inhibition de la réponse IFN-I médiée par une activation de TGFβ elle-même induite par ITGβ6. Par ailleurs, de façon surprenante, l'expression de cette protéine favoriserait la diffusion virale. En effet, la cartographie des zones infectées au sein du tissu pulmonaire révèle une distribution bien plus restreinte du virus A/California/7/2009 (H1N1pdm) chez des souris ITGβ6 ^{-/-}. En modèle cellulaire, nous avons observé une induction de l'expression d'ITGβ6 par le virus H7N1. Cela aurait ainsi pu constituer un mécanisme contribuant au pouvoir pathogène du virus H7N1 chez la souris. Dans cette configuration et selon les résultats présentés dans l'étude précédemment citée, la conséquence aurait été une diffusion plus large du virus dans les poumons et donc une dégradation de ses fonctions plus importante. Cependant, à l'inverse, nous avons observé une inhibition de son expression en modèle murin, phénomène auquel la protéine PB1-F2 contribue. Cette orientation de la régulation opposée à ce qui est déjà décrit dans la littérature suggère qu'il existe d'autres mécanismes reliés à PB1-F2 associant l'ITGβ6 à la caractérisation de la pathologie pulmonaire.

5.3.2 Modèle de virus réassorti

En modèle cellulaire, l'insertion du segment PB1 H7N1 au sein du virus H3N2 s'est traduite par une potentialisation des effets du virus WT au regard de l'expression de l'IL6 pour la réponse inflammatoire et IFNβ pour celle antivirale. Par ailleurs, l'induction de la réponse immunitaire innée par le virus chimérique est augmentée en l'absence de l'expression de PB1-F2. Dans ce contexte, PB1-F2 H7N1 atténuerait la réponse immune initiée suite à l'infection avec le virus chimérique. Les résultats générés *in vivo* ne corroborent pas tout à fait les observations précédentes. En effet, le virus chimérique ne présente pas une virulence accrue par rapport à celui H3N2 WT. Au contraire, le virus C PB1 induit une inflammation globalement réduite par rapport au virus WT. Il est surprenant que l'insertion du segment 2 aviaire ne se soit pas traduit par le transfert des fortes propriétés de virulence de la PB1-F2 H7N1 observées en modèle murin. De plus, la délétion de la protéine PB1-F2 a également été associée à une amplification de la réponse inflammatoire induite par le virus C PB1. Cela suggère un rôle atténuateur de PB1-F2 en contexte chimérique. Nous n'avons cependant pas observé d'effet des régulations précédemment citées sur la pathologie développée. Ces modulations de la réponse de l'hôte auraient ainsi un impact fonctionnel limité. A notre connaissance, il n'existe pas d'étude similaire ayant caractérisé l'impact de l'insertion d'un segment PB1 aviaire au sein d'un génome viral humain sur la réponse cellulaire induite par le virus. Nous observons que les

propriétés de virulence de la protéine PB1-F2 aviaire ne lui sont pas intrinsèques, au contraire elles dépendent fortement du contexte viral dans lequel celle-ci est exprimée. Une contribution d'autres protéines virales serait ainsi nécessaire à l'exercice de ses fonctions. Un autre élément de lecture serait la propension différentielle de PB1-F2 à fibriller selon le contexte viral. PB1-F2 adopte une structure secondaire composée de feuilletts β dans un environnement membranaire [539,541], pouvant se traduire par la formation d'oligomères solubles [539] et de fibres amyloïdes [542]. Or ces dernières présentent en cellules immunitaires un caractère pro-apoptotique non observé avec des protéines non structurées [540]. Cet état de la protéine contribue ainsi à la définition de son pouvoir de virulence, ainsi il est envisageable que la capacité de la PB1-F2 H7N1 à former des fibres soit inégale lors de son expression au sein des virus H7N1 ou C PB1.

Les principales régulations de la réponse de l'hôte associées à PB1-F2 selon les modèles de souches virales et d'hôtes considérés au cours de cette étude sont exposées en Figure 77.

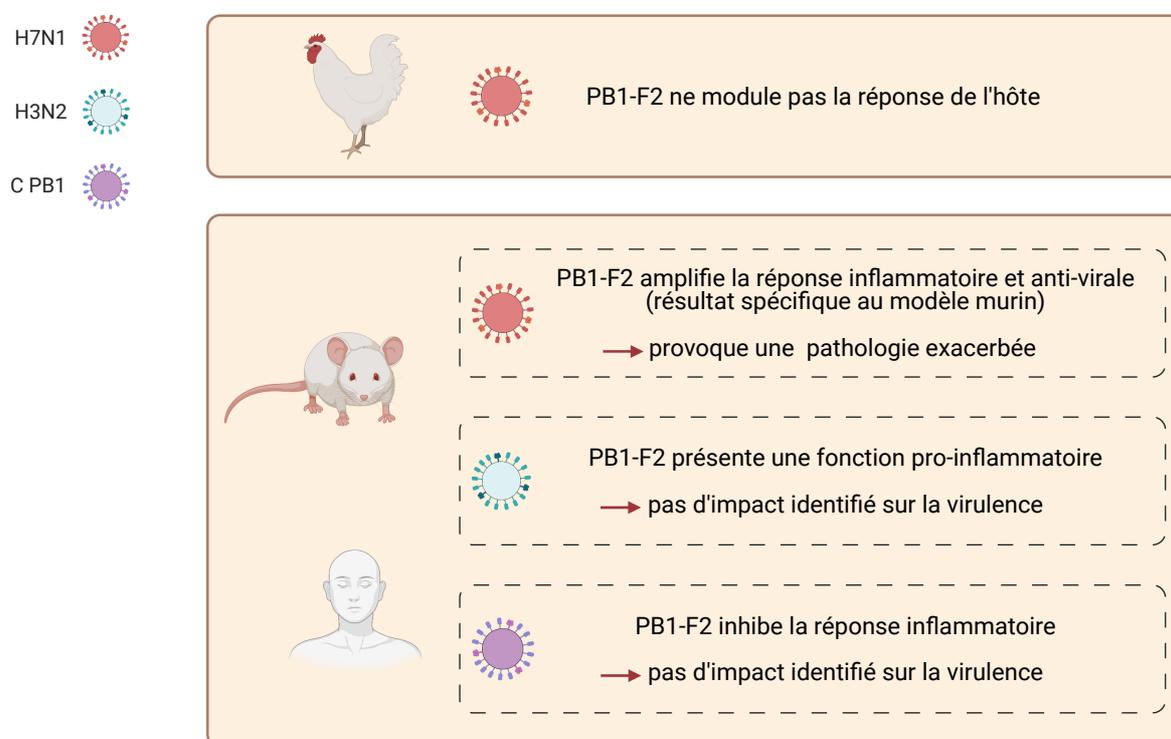


Figure 77 : bilan des modulations de la réponse de l'hôte associées à PB1-F2.

5.3.3 Partenaires cellulaires

L'analyse de l'interactome de la protéine PB1-F2 H7N1 en cellules humaines a révélé une forte composante impliquée dans la régulation des mécanismes liés aux ARN. Notamment, les DEAD-box hélicases DHX9 et DHX29 ont été identifiées. DHX29 contribue à la reconnaissance des ARN viraux en cellules épithéliales pulmonaires et à l'initiation d'une réponse immune *via* son interaction MAVS [636]. Une telle action au niveau d'un senseur du génome viral est généralement associée à la protéine NS1 compte tenu de son inhibition des fonctions de RIG-I [637,638]. Une interaction de la PB1-F2 issue du virus H1N1 à l'origine de la grippe espagnole avec la DEAD-box hélicase DDX3 a toutefois été recensée [522]. L'inhibition

de la voie interféron qui en découle contribuerait à la pathogénicité de la souche. Tout comme avec la PB1-F2 H1N1 1918, la protéine associée au virus H3N2 étudié ici pourrait inhiber l'activation de MAVS en interférant avec la fonction de DHX29. Toutefois, cette lecture ne rejoint pas les résultats relatifs à l'impact sur la réponse de l'hôte. En effet, bien que certaines PB1-F2 soient décrites pour leur effet antagoniste sur la voie IFN [502,519,523] et NF- κ B [525], nous avons observé l'inverse avec le virus H3N2. Ainsi, il est difficile d'appuyer cette potentielle interaction par une conséquence fonctionnelle au cours de l'infection.

Une seconde composante importante au sein de l'interactome est liée à l'apoptose. Usuellement, l'effet pro-apoptotique de PB1-F2 est plutôt observé en cellules immunitaires [41,498,509,533], toutefois certaines études ont recensé une telle action en cellules épithéliales si les cellules sont premièrement soumises à un stress (TNF α par exemple) [514,639]. Le facteur de transcription BCLAF1 identifié au sein de l'interactome favoriserait l'apoptose. Les fonctions de cette protéine sont réprimées suite à sa séquestration au cytoplasme provoquée par son interaction avec le facteur anti-apoptotique Bcl2 [596]. Par mimétisme avec l'action de Bcl2, cela semble suggérer que PB1-F2 H7N1 s'opposerait à l'activation de BCLAF1 en empêchant sa migration au noyau ce qui limiterait l'induction de l'apoptose. Compte tenu de l'opposition de cette hypothèse avec l'état des connaissances sur PB1-F2, l'impact fonctionnel de cette interaction serait à creuser.

Nous avons observé une nette fonction pro-virulente de PB1-F2 H7N1 en modèle murin. Deux protéines identifiées au sein de cet interactome pourraient illustrer des mécanismes d'action à l'origine de cette propriété. La protéine TRIM28, contrairement à la plupart des protéines de la famille TRIM [597,640], est associée à un caractère immunosuppresseur puisqu'elle inhibe notamment l'activité d'IRF7 (Interferon Regulatory Factor 7) [641]. TRIM28 a été identifiée comme un facteur chez l'hôte humain impliqué dans la virulence des virus HPAI [642]. Lors d'une infection par un virus d'origine humaine, TRIM28 est présente sous forme active ce qui limiterait une réponse immunitaire excessive et donc la sévérité des symptômes développés. Dans le cas de virus zoonotiques d'origine aviaire, la reconnaissance du génome viral est en partie médiée par la PKR. Or, l'activation de cette dernière conduit à la phosphorylation de TRIM28 ce qui résulte en sa perte de fonction et donc une réponse immunitaire exacerbée. Il est donc intéressant d'avoir identifié cette protéine au sein de l'interactome de la protéine PB1-F2 d'origine aviaire réalisé en cellules humaines. La deuxième protéine est PCBP1 (poly(rC)-binding protein 1). Par son implication dans la dégradation des protéines MAVS activées [643], celle-ci joue ainsi un rôle important dans l'équilibre de la réponse immune. Une inhibition de son expression a d'ailleurs été observée au sein du protéome de cellules A549 infectées avec un virus H7N9 [644]. L'interactome suggère donc que la protéine PB1-F2 H7N1 pourrait, en privant ces protéines d'exercer leur fonction « d'atténuation » *via* une interaction compétitive, contribuer à une virulence et à une réponse inflammatoire exacerbée. Cela rejoint ainsi les résultats associés à la caractérisation de la réponse de l'hôte réalisées en modèle murin. Par ailleurs, les fonctions opposées de cette PB1-F2 exprimée en contexte chimérique pourrait refléter le fait que ces interactions ne sont pas maintenues au sein d'un génome viral humain.

5.4 Fonctions partagées entre les PB1-F2 étudiées

L'analyse de l'interactome partagé entre les protéines PB1-F2 H7N1 et H3N2 met fortement en exergue les différentes ubiquitines identifiées. Ces dernières n'ont pas été identifiées en tant que modifications post-traductionnelles, mais en tant qu'interactants. Dans le premier cas, cela aurait témoigné d'une orientation de PB1-F2 vers la voie de dégradation liée au protéasome [645], comme cela a déjà été décrit [41,484]. Les ubiquitines sont fonctionnelles lorsqu'elles sont associées sous forme de chaînes par une liaison covalente à une protéine, ainsi il est difficile d'évaluer la pertinence de leur présence sous forme libre. Aucune ubiquitine n'a été identifiée au sein de l'échantillon contrôle (GFP-BioID2), ainsi ces protéines ne correspondraient pas à un bruit de fond généré par la méthode employée. Cela pourrait refléter une augmentation de la concentration en ubiquitine à proximité du complexe PB1-F2-BioID2.

Un impact commun des PB1-F2 étudiées sur la régulation de la concentration ionique semble également se dessiner compte tenu de l'identification de plusieurs transporteurs. Un déséquilibre ionique constitue un signal de danger capable d'initier l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 [358,646,647]. Au regard du niveau d'expression de la caspase 1 et de l'IL1 β , les deux PB1-F2 étudiées ont présenté des signes d'une activation de NLRP3. La perturbation de l'homéostasie ionique pourrait constituer un des mécanismes à l'origine de ce phénomène.

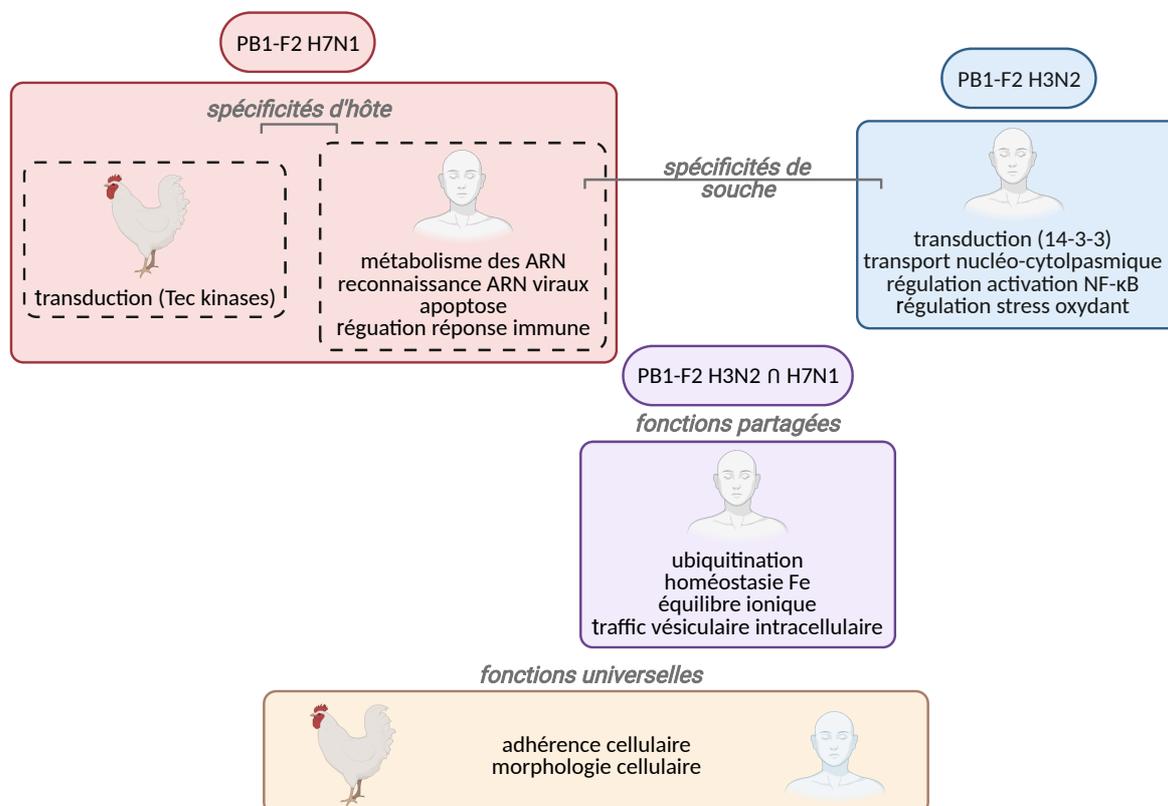


Figure 78 : bilan des principales fonctions biologiques différentielles de PB1-F2 identifiées par BioID2. Les fonctions universelles correspondent aux fonctions communes aux protéines PB1-F2 H7N1 et H3N2 à la fois chez le poulet et l'Homme.

5.5 Considérations techniques et perspectives

5.5.1 Approche BioID2

Au cours du développement de l'approche BioID2, plusieurs éléments ont soulevé des limitations techniques à l'usage de cette approche pour définir l'interactome des protéines PB1-F2. Premièrement, nous avons préféré utiliser des lignées cellulaires correspondant à des cellules naturellement hôtes des IAV plutôt que d'avoir recours à des cellules sélectionnées pour leur capacité de transfection mais moins pertinentes d'un point de vue fonctionnel. Cependant, l'efficacité de transfection des cellules A549 a constitué une difficulté importante. De façon à s'affranchir de cela, des lignées exprimant de façon stable les différentes constructions BioID2 auraient pu constituer une approche plus optimisée. De plus, les auteurs ayant développé la méthode recommandent de ne pas réduire le temps alloué au marquage des interactants à moins de 16 heures (24 à 48 heures étant préférable) [568], cela semble ainsi suggérer que la biotinylation est une réaction peu efficace. Par conséquent, la probabilité d'une biotinylation effective suite à la proximité entre le complexe protéine d'intérêt-BioID2 et un interactant serait très peu élevée. Cela impliquerait la nécessité d'une forte fréquence de rencontres afin de pouvoir obtenir au minimum un exemplaire biotinylé de l'interactant considéré et donc son identification. La problématique de l'organisation structurale du complexe et de l'aptitude de la protéine dont l'interactome est étudié à interagir avec ses interacteurs malgré la fusion d'un tag est récurrente et partagée avec les méthodes d'immunoprécipitation plus classiques. Cependant, BioID2 possède une taille conséquente (~27 kDa), ce qui renforce ce point limitant, particulièrement au regard de celle de PB1-F2 (~10 kDa). Il est envisageable que l'organisation du complexe PB1-F2-BioID2 soit peu favorable à l'accès des interactants de PB1-F2 dans la zone biotinylable. Lors des premières étapes de mise au point de l'approche, nous avons testé l'insertion de BioID en extrémité N-terminale de PB1-F2 mais cela n'a pas amélioré l'efficacité de biotinylation. Compte tenu de la propension de PB1-F2 à s'oligomériser et à s'agréger sous forme de fibres, la fusion de BioID2 pourrait gêner ce processus. Or, il est possible que certains interactants n'interagissent avec PB1-F2 que sous sa forme oligomérisée. Cette réflexion suggère que l'aspect cinétique et transitoire que semblait offrir BioID2 ne serait pas réellement appliqué dans notre modèle puisqu'une part importante de l'information serait perdue en conséquence d'une faible efficacité de biotinylation des candidats éligibles. Ainsi, parmi les atouts de cette technique, seul resterait le fait que la biotinylation permet une purification efficace des interactants grâce à l'affinité avec la streptavidine. La génération suivante des biotines ligases se nomme TurboID et a été présentée en 2018 [648]. L'efficacité de cette enzyme serait bien supérieure à son prédécesseur BioID2 et permettrait un marquage des protéines situées dans la zone biotinylable en une dizaine de minutes. Le recours à cette biotine ligase pourrait ainsi permettre de rendre l'analyse cinétique plus envisageable qu'avec BioID2. De plus, la capacité à identifier des peptides biotinylés par spectrométrie de masse a constitué un point limitant très important, le nombre de peptides arborant cette modification n'était pas cohérent avec l'analyse des échantillons

par SDS-PAGE. Cela nous a conduit à raisonner par un différentiel entre les échantillons d'intérêt et celui contrôle afin de sélectionner les interacteurs potentiels. Après échange avec des experts en spectrométrie de masse, l'idée que les peptides biotinylés soient difficilement retrouvés par cette approche a été suggérée, mais nous n'avons identifié aucune étude démontrant cette supposition. Une autre méthode de purification des protéines biotinylées basée sur un anticorps anti-biotine à la place de l'usage de la streptavidine a été développée. Cette approche permettrait une purification et une identification par spectrométrie de masse plus aisée des protéines biotinylées [649].

Enfin, la confusion apportée par les homologues de séquence entre protéines appartenant à une même famille est à prendre en considération lors de l'analyse des résultats générés par BioID2. Parmi un groupe de protéines identifiées à partir des mêmes peptides, nous ne pouvons affirmer lesquelles étaient réellement présentes. Certaines voies cellulaires peuvent alors paraître extrêmement enrichies au sein d'un échantillon sans que ce ne soit relevant. De plus, cela est problématique lorsque des fonctions très spécifiques sont associées aux membres d'une famille puisque nous ne pouvons pas intégrer avec certitude la régulation de l'ensemble de ces fonctions au sein des propriétés de PB1-F2.

5.5.2 Modèle souris NF- κ B-luciférase

Au cours de ce projet, nous nous sommes beaucoup appuyés sur la lignée de souris transgéniques NF- κ B-luciférase. Nous avons observé une variabilité des signaux bioluminescents intra-groupe très importante et ce malgré les tentatives d'harmoniser au maximum les conditions expérimentales. Cela a été assez problématique, notamment concernant les résultats générés avec les virus H7N1-nl puisque la forte tendance pro-inflammatoire de PB1-F2 observée n'a pas pu être validée statistiquement. Par ailleurs, le taux de variabilité n'était pas constant entre différentes expérimentations, ce qui suggère que son origine réside plutôt dans le génome des animaux et non dans des facteurs extérieurs. Bien que les souris utilisées aient été génotypées afin de s'assurer de la présence de la cassette NF- κ B-luciférase, le nombre d'insertion de celle-ci n'a pas été contrôlé. Il est ainsi vraisemblable que cet indicateur ne soit pas constant et ainsi que la variabilité de réponse observée soit le reflet de la non homogénéité des animaux. Une caractérisation des reproducteurs est en cours afin de réduire cette hétérogénéité en associant uniquement des géniteurs présentant un nombre similaire d'insertions.

5.5.3 Perspectives

Au cours de ce projet nous avons souhaité travailler avec des virus encodant la nanoluciférase de façon à être en mesure de contrôler l'activité de réplication virale mais également d'éventuellement pouvoir acquérir des informations relatives au tropisme des virus. En modèle murin, les tissus supports de la réplication virale du virus H7N1 étaient restreints au tractus respiratoire et nous n'avons pas observé de modification particulière de la dispersion virale

suite à la délétion de PB1-F2. Pour le pendant aviaire de cette approche, nous avons utilisé des œufs de poule embryonnés par facilité d'accès du modèle mais il aurait été intéressant de conduire ce type d'expérimentation en modèle poulet. Par ailleurs, chez le canard, un important tropisme digestif des virus LPAI est observé alors que ceux HPAI, bien que systémiques, seraient principalement excrétés par la voie respiratoire [650,651]. Ainsi, l'usage d'un virus H7N1 LPAI bioluminescent serait particulièrement intéressant afin, dans un premier temps, de quantifier la cinétique de répliation, puis dans un second temps d'étudier l'impact de PB1-F2 sur le tropisme viral, respiratoire comme digestif. Chez le poulet, une prolongation de la durée d'excrétion virale sous l'action de la PB1-F2 d'un virus LPAI a été observée [488]. Il serait ainsi également intéressant d'aborder ce phénomène chez le canard à l'aide d'un suivi par imagerie intravital. Le choix de la nanoluciférase comme molécule traçable s'est appuyé sur sa taille réduite par rapport aux autres luciférases et sa brillance [580]. Cependant, même si le nombre de photons émis est plus important, un problème se pose quant à leur longueur d'onde. En effet, l'absorption réalisée par l'hémoglobine constitue un point limitant à l'imagerie intravital. Compte tenu de sa pigmentation rouge, les photons émis à des longueurs d'onde en dehors de la gamme associée à cette teinte subiront une absorption de leur énergie (Figure 79A). En ce sens, seuls les photons associés à une longueur d'onde supérieure à 600 nm permettent une haute efficacité dans la localisation de la luciférase considérée et sont susceptibles de tracer un signal situé dans un tissu profond. Bien que les longueurs d'ondes maximales d'émission de la nanoluciférase et de la luciférase firefly soient toutes deux situées dans la gamme absorbée par l'hémoglobine, seule la luciférase firefly émet une quantité non négligeable de photon au-delà de 600 nm (Figure 79B).

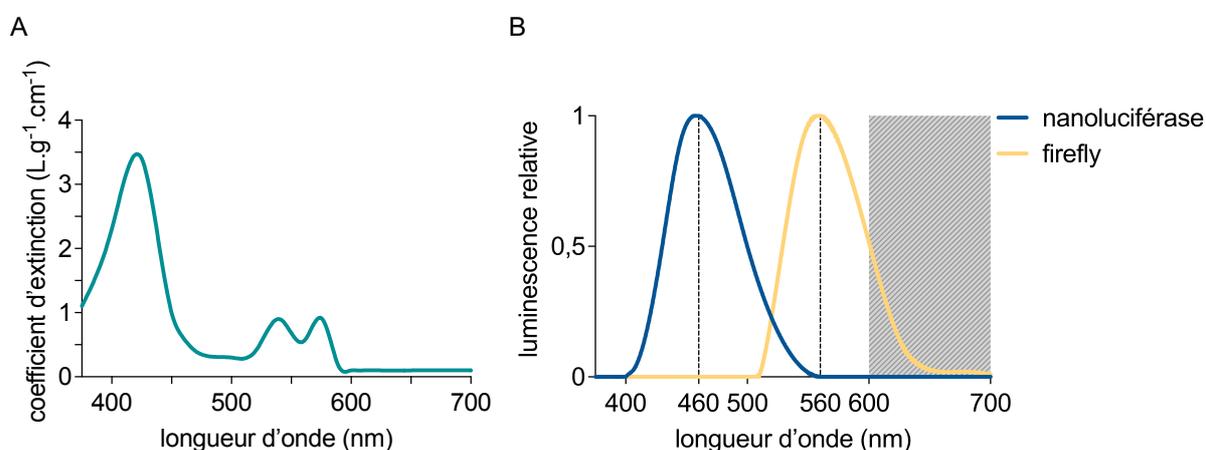


Figure 79 : compatibilité des luciférases pour l'imagerie *in vivo*.

[A] Évolution du coefficient d'extinction de l'hémoglobine en fonction de la longueur d'onde à P(O₂) normale. Adapté de [652]. [B] Spectres d'émission de la nanoluciférase et de la luciférase firefly. Adapté de [653].

Ainsi, la luciférase firefly est plus adaptée pour les acquisitions intravitales, sa taille d'environ 60 kDa est cependant à prendre en considération dans la balance des bénéfices apportés. Pour la nanoluciférase, ces observations expliquent probablement le fait que, lors des cinétiques de répliation des virus nanoluc, nous n'avons pas observé de signal pulmonaire contrairement au nez et à la trachée. Cette perte d'information en modèle murin suggère que

la nanoluciférase serait probablement peu efficace dans le cadre d'expériences conduites sur un organisme plus volumineux tel que le canard. Il serait plus pertinent de s'appuyer sur un virus H7N1 encodant une nanoluciférase red shifted plutôt que la nanoluciférase classique. Présentées en 2017, les nanoluciférases red shifted sont optimisées pour les acquisitions *in vivo* [654]. Des mutations permettant à l'enzyme d'interagir avec d'autres substrats que la furimazine ont été identifiées. Ces nouvelles associations nanoluciférase/ substrat produisent 4 à 13 fois plus de photons de longueur d'onde supérieure à 600 nm que le couple luciférase firefly/D-luciférine.

Au cours de l'étude de la relation entre PB1-F2 H3N2 et 14-3-3 ϵ à l'aide de plasmides rapporteurs, nous avons observé un effet négatif de cette dernière sur la réponse NF- κ B. Tandis que l'effet pro-interféron de 14-3-3 ϵ est déjà décrit dans la littérature [340,624], son action sur la voie NF- κ B n'est pas caractérisée. Il serait intéressant d'apporter des éléments de lecture à cette dualité d'action sur la cascade MAVS. En effet, l'induction de l'activité IFN peut s'interpréter par la contribution déjà caractérisée de 14-3-3 ϵ dans la translocation de RIG-I à la membrane mitochondriale. L'effet opposé sur NF- κ B suggère cependant que 14-3-3 ϵ interviendrait également en aval de l'étape d'activation des senseurs de l'ARN viral. L'action pourrait cibler le complexe IKK séquestrant NF- κ B au cytoplasme [655] ou en amont au niveau des protéines TRAF6 ou TAK1 dont les activités de kinase inactivent le complexe précédent [656] (Figure 16 et Figure 18). Complémenter les expériences de plasmides rapporteurs avec des constructions exprimant TRAF6, TAK1, leur dominant négatif ainsi que la localisation cellulaire par immunofluorescence de NF- κ B permettrait de cibler plus finement l'action de 14-3-3 ϵ . Dans ce modèle, PB1-F2 a présenté une action inhibitrice sur la réponse IFN β et NF- κ B. Cela s'oppose aux résultats générés en contexte infectieux, *in vitro* et *in vivo* pour la réponse inflammatoire. Il serait intéressant, dans un premier temps, d'évaluer le niveau d'expression de la protéine 14-3-3 ϵ suite à une infection avec le virus H3N2 ainsi que la contribution de PB1-F2. Cela validerait l'implication de cette protéine au cours du cycle viral et l'existence d'un lien avec PB1-F2. En cas de validation de cette étape, l'usage d'une lignée cellulaire 14-3-3 ϵ KO constituerait une approche permettant d'appréhender de façon quantitative l'impact de l'interaction sur la réponse de l'hôte. L'étude en modèle murin serait cependant peu envisageable car la protéine 14-3-3 ϵ étant impliquée dans la neurogénèse, une forte mortalité juvénile est par conséquent observée chez les souris 14-3-3 ϵ ^{-/-} [657].

L'usage du modèle de souris NF- κ B-luciférase a permis d'identifier un impact des PB1-F2 étudiées sur l'activité du facteur de transcription. De plus, nous avons observé une inhibition médiée par PB1-F2 de l'expression des gènes codant la caspase 1 et l'IL1 β avec respectivement les virus H7N1 et H3N2. Sachant que NF- κ B constitue un facteur activant l'inflammasome NLRP3 (revu dans [658]), il serait intéressant de différencier les deux voies inflammatoires. Pour cela, l'infection de souris ASC^{-/-} (déficientes vis-à-vis de l'inflammasome) pourrait constituer une approche permettant de caractériser plus précisément les points d'action de PB1-F2 en excluant la voie inflammasome de l'analyse.

5.6 Conclusion

Nos travaux ont permis d'apporter des éléments de caractérisation relatifs à la protéine PB1-F2 des IAV en prenant en compte la spécificité de souche et d'hôte qui lui est associée. Dans notre modèle, la protéine PB1-F2 exprimée par le virus H7N1 LPAI ne contribue pas à la modulation de la réponse immunitaire innée chez le poulet. PB1-F2 H7N1 pourrait toutefois jouer un rôle qui ne se serait pas en lien direct avec le développement de la pathogénicité. Au contraire, dans un modèle murin d'infection zoonotique, cette protéine acquiert un rôle pro-inflammatoire et pro-virulent majeur. La protéine PB1-F2 H3N2 favorise également à la réponse inflammatoire, toutefois l'ampleur de cette régulation et les conséquences sur la pathogénicité semble moins critique. De façon surprenante, la construction d'un virus chimérique intégrant segment PB1 H7N1 dans un génome de base H3N2 ne s'est pas traduit par un transfert des propriétés de virulence de la protéine PB1-F2 aviaire. Ainsi, dans notre étude, le contexte viral conditionne fortement le développement des propriétés de PB1-F2. La définition des interactomes différentiels des deux PB1-F2 a permis d'identifier certains partenaires cellulaires pouvant définir des mécanismes d'action sur la réponse de l'hôte, notamment sur la voie inflammatoire.

6. Bibliographie

1. Littman RJ. The plague of Athens: epidemiology and paleopathology. *Mt Sinai J Med.* 2009;76(5):456-467.
2. Buchholz K. What Share of the World Population Is Already on COVID-19 Lockdown?
3. LePan N. Visualizing the History of Pandemics.
4. Jones KE, Patel NG, Levy MA, et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature.* 2008;451(7181):990-993.
5. Soper GA. The influenza pneumonia pandemic in the American army camps during September and October 1918. *Science.* 1918;48(1245):451-456.
6. Dunn FL. Pandemic influenza in 1957; review of international spread of new Asian strain. *J Am Med Assoc.* 1958;166(10):1140-1148.
7. Chang WK. National influenza experience in Hong Kong, 1968. *Bull World Health Organ.* 1969;41(3):349-351.
8. Morens DM, Fauci AS. Emerging Pandemic Diseases: how we got to COVID-19? *Cell.* 2020;182(5):1077-1092.
9. Smith KF, Goldberg M, Rosenthal S, et al. Global rise in human infectious disease outbreaks. *J R Soc Interface.* 2014;11(101):20140950.
10. ICTV. Virus taxonomy : 2019 release.
11. Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Martina BE, Bestebroer TM, Fouchier RA. Influenza B virus in seals. *Science.* 2000;288(5468):1051-1053.
12. Guo YJ, Jin FG, Wang P, Wang M, Zhu JM. Isolation of influenza C virus from pigs and experimental infection of pigs with influenza C virus. *J Gen Virol.* 1983;64 (Pt 1):177-182.
13. Salez N, Mélade J, Pascalis H, et al. Influenza C virus high seroprevalence rates observed in 3 different population groups. *J Infect.* 2014;69(2):182-189.
14. Salem E, Cook EAJ, Lbacha HA, et al. Serologic Evidence for Influenza C and D Virus among Ruminants and Camelids, Africa, 1991-2015. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(9):1556-1559.
15. Nedland H, Wollman J, Sreenivasan C, et al. Serological evidence for the co-circulation of two lineages of influenza D viruses in equine populations of the Midwest United States. *Zoonoses Public Health.* 2018;65(1):e148-e154.
16. Quast M, Sreenivasan C, Sexton G, et al. Serological evidence for the presence of influenza D virus in small ruminants. *Vet Microbiol.* 2015;180(3-4):281-285.
17. Hause BM, Ducatez M, Collin EA, et al. Isolation of a novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses. *PLoS Pathog.* 2013;9(2):e1003176.
18. WHO. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO Memorandum. *Bull World Health Organ.* 1980;58:585-591.
19. Choppin PW, Murphy JS, Tamm I. Studies of two kinds of virus particles which comprise influenza A2 virus strains. III. Morphological characteristics: independence to morphological and functional traits. *J Exp Med.* 1960;112(5):945-952.
20. Shortridge KF, Zhou NN, Guan Y, et al. Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong. *Virology.* 1998;252(2):331-342.
21. Basu A, Shelke V, Chadha M, et al. Direct imaging of pH1N1 2009 influenza virus replication in alveolar pneumocytes in fatal cases by transmission electron microscopy. *J Electron Microsc (Tokyo).* 2011;60(1):89-93.
22. Calder LJ, Wasilewski S, Berriman JA, Rosenthal PB. Structural organization of a filamentous influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(23):10685-10690.
23. Moulès V, Terrier O, Yver M, et al. Importance of viral genomic composition in modulating

- glycoprotein content on the surface of influenza virus particles. *Virology*. 2011;414(1):51-62.
24. Getie-Kehtie M, Sultana I, Eichelberger M, Alterman M. Label-free mass spectrometry-based quantification of hemagglutinin and neuraminidase in influenza virus preparations and vaccines. *Influenza Other Respi Viruses*. 2013;7(4):521-530.
 25. Elleman CJ, Barclay WS. The M1 matrix protein controls the filamentous phenotype of influenza A virus. *Virology*. 2004;321(1):144-153.
 26. Vijaykrishnan S, Loney C, Jackson D, Suphamungmee W, Rixon FJ, Bhella D. Cryotomography of budding influenza A virus reveals filaments with diverse morphologies that mostly do not bear a genome at their distal end. *PLoS Pathog*. 2013;9(6):e1003413.
 27. Dadonaite B, Vijaykrishnan S, Fodor E, Bhella D, Hutchinson EC. Filamentous influenza viruses. *J Gen Virol*. 2016;97(8):1755-1764.
 28. Taubenberger JK, Kash JC, Morens DM. The 1918 influenza pandemic: 100 years of questions answered and unanswered. *Sci Transl Med*. 2019;11(502).
 29. Lamb RA, Krug R. *Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. Fields Virology, 4th Edition*. Lippincott.; 2001.
 30. Desselberger U, Racaniello VR, Zazra JJ, Palese P. The 3' and 5'-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity. *Gene*. 1980;8(3):315-328.
 31. Baudin F, Bach C, Cusack S, Ruigrok RW. Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *EMBO J*. 1994;13(13):3158-3165.
 32. Cheong HK, Cheong C, Lee YS, Seong BL, Choi BS. Structure of influenza virus panhandle RNA studied by NMR spectroscopy and molecular modeling. *Nucleic Acids Res*. 1999;27(5):1392-1397.
 33. Gerber M, Moulès V, Gavazzi C, Marquet R, Isel C. Empaquetage sélectif du génome des influenza virus A. *Virol (Montrouge, Fr)*. 2014;18(5):278-296.
 34. Arranz R, Coloma R, Chichón FJ, et al. The Structure of Native Influenza Virion Ribonucleoproteins. *Science (80-)*. 2012;338(6114):1634 LP - 1637.
 35. Flick R, Hobom G. Interaction of influenza virus polymerase with viral RNA in the 'corkscrew' conformation. *J Gen Virol*. 1999;80 (Pt 10):2565-2572.
 36. Tomescu AI, Robb NC, Hengrung N, Fodor E, Kapanidis AN. Single-molecule FRET reveals a corkscrew RNA structure for the polymerase-bound influenza virus promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(32):E3335-42.
 37. Te Velthuis AJW, Fodor E. Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(8):479-493.
 38. Vasin A V, Temkina OA, Egorov V V, Klotchenko SA, Plotnikova MA, Kiselev OI. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins. *Virus Res*. 2014;185:53-63.
 39. ViralZone. Orthomyxoviridae.
 40. Yamayoshi S, Watanabe M, Goto H, Kawaoka Y. Identification of a Novel Viral Protein Expressed from the PB2 Segment of Influenza A Virus. *J Virol*. 2016;90(1):444-456.
 41. Chen W, Calvo PA, Malide D, et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med*. 2001;7(12):1306-1312.
 42. Wise HM, Foeglein A, Sun J, et al. A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol*. 2009;83(16):8021-8031.
 43. Jagger BW, Wise HM, Kash JC, et al. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science*. 2012;337(6091):199-204.
 44. Muramoto Y, Noda T, Kawakami E, Akkina R, Kawaoka Y. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. *J Virol*. 2013;87(5):2455-2462.

45. Wise HM, Hutchinson EC, Jagger BW, et al. Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain. *PLoS Pathog.* 2012;8(11):e1002998.
46. Gerber M. Recherche de signaux d'emballage spécifiques du génome des virus influenza A. Published online 2016.
47. Abdoli A, Soleimanjahi H, Tavassoti Kheiri M, Jamali A, Jamaati A. Determining influenza virus shedding at different time points in madin-darby canine kidney cell line. *Cell J.* 2013;15(2):130-135.
48. Emma P, Kamen A. Real-time monitoring of influenza virus production kinetics in HEK293 cell cultures. *Biotechnol Prog.* 2013;29(1):275-284.
49. Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., eds. *Sialic Acids and Other Nonulosonic Acids*. 3ème. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2017.
50. Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature.* 1988;333(6172):426-431.
51. Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:531-569.
52. Wang H, Jiang C. Influenza A virus H5N1 entry into host cells is through clathrin-dependent endocytosis. *Sci China Ser C, Life Sci.* 2009;52(5):464-469.
53. Nunes-Correia I, Eulálio A, Nir S, Pedroso de Lima MC. Caveolae as an additional route for influenza virus endocytosis in MDCK cells. *Cell Mol Biol Lett.* 2004;9(1):47-60.
54. Rossman JS, Leser GP, Lamb RA. Filamentous influenza virus enters cells via macropinocytosis. *J Virol.* 2012;86(20):10950-10960.
55. Fujioka Y, Nishide S, Ose T, et al. A Sialylated Voltage-Dependent Ca(2+) Channel Binds Hemagglutinin and Mediates Influenza A Virus Entry into Mammalian Cells. *Cell Host Microbe.* 2018;23(6):809-818.e5.
56. Eierhoff T, Hrinčius ER, Rescher U, Ludwig S, Ehrhardt C. The epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes uptake of influenza A viruses (IAV) into host cells. *PLoS Pathog.* 2010;6(9):e1001099.
57. Sakai T, Nishimura SI, Naito T, Saito M. Influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase act as novel motile machinery. *Sci Rep.* 2017;7(1):45043.
58. Cady SD, Luo W, Hu F, Hong M. Structure and function of the influenza A M2 proton channel. *Biochemistry.* 2009;48(31):7356-7364.
59. Benton DJ, Gamblin SJ, Rosenthal PB, Skehel JJ. Structural transitions in influenza haemagglutinin at membrane fusion pH. *Nature.* 2020;583(7814):150-153.
60. Martin K, Helenius A. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *J Virol.* 1991;65(1):232-244.
61. Nevalainen M, Nissinen M, Kaakinen M, Metsikkö K. Influenza virus infection in multinucleated skeletal myofibers. *Exp Cell Res.* 2010;316(11):1784-1794.
62. Chou Y, Heaton NS, Gao Q, Palese P, Singer RH, Lionnet T. Colocalization of different influenza viral RNA segments in the cytoplasm before viral budding as shown by single-molecule sensitivity FISH analysis. *PLoS Pathog.* 2013;9(5):e1003358.
63. Neumann G, Castrucci MR, Kawaoka Y. Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. *J Virol.* 1997;71(12):9690-9700.
64. O'Neill RE, Jaskunas R, Blobel G, Palese P, Moroianu J. Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *J Biol Chem.* 1995;270(39):22701-22704.
65. Ozawa M, Fujii K, Muramoto Y, et al. Contributions of two nuclear localization signals of influenza A virus nucleoprotein to viral replication. *J Virol.* 2007;81(1):30-41.
66. Cros JF, García-Sastre A, Palese P. An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. *Traffic.* 2005;6(3):205-213.

67. Te Velthuis AJW, Grimes JM, Fodor E. Structural insights into RNA polymerases of negative-sense RNA viruses. *Nat Rev Microbiol*. Published online January 2021:1-16.
68. Gu W, Gallagher GR, Dai W, et al. Influenza A virus preferentially snatches noncoding RNA caps. *RNA*. 2015;21(12):2067-2075.
69. Engelhardt OG, Smith M, Fodor E. Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *J Virol*. 2005;79(9):5812-5818.
70. Lukarska M, Fournier G, Pflug A, et al. Structural basis of an essential interaction between influenza polymerase and Pol II CTD. *Nature*. 2017;541(7635):117-121.
71. Martínez-Alonso M, Hengrung N, Fodor E. RNA-Free and Ribonucleoprotein-Associated Influenza Virus Polymerases Directly Bind the Serine-5-Phosphorylated Carboxyl-Terminal Domain of Host RNA Polymerase II. *J Virol*. 2016;90(13):6014-6021.
72. Serna Martin I, Hengrung N, Renner M, et al. A Mechanism for the Activation of the Influenza Virus Transcriptase. *Mol Cell*. 2018;70(6):1101-1110.e4.
73. Dias A, Bouvier D, Crépin T, et al. The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature*. 2009;458(7240):914-918.
74. Pflug A, Gaudon S, Resa-Infante P, et al. Capped RNA primer binding to influenza polymerase and implications for the mechanism of cap-binding inhibitors. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(2):956-971.
75. Kouba T, Drncová P, Cusack S. Structural snapshots of actively transcribing influenza polymerase. *Nat Struct Mol Biol*. 2019;26(6):460-470.
76. Te Velthuis AJW, Oymans J. Initiation, Elongation, and Realignment during Influenza Virus mRNA Synthesis. *J Virol*. 2018;92(3).
77. Poon LL, Pritlove DC, Fodor E, Brownlee GG. Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template. *J Virol*. 1999;73(4):3473-3476.
78. Robertson JS, Schubert M, Lazzarini RA. Polyadenylation sites for influenza virus mRNA. *J Virol*. 1981;38(1):157-163.
79. Poon LL, Fodor E, Brownlee GG. Polyuridylated mRNA synthesized by a recombinant influenza virus is defective in nuclear export. *J Virol*. 2000;74(1):418-427.
80. Ho JSY, Angel M, Ma Y, et al. Hybrid gene origination creates human-virus chimeric proteins during infection. *Cell*. 2020;181(7):1502-1517.e23.
81. Fodor E, Te Velthuis AJW. Structure and Function of the Influenza Virus Transcription and Replication Machinery. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2020;10(9).
82. Narayan P, Ayers DF, Rottman FM, Maroney PA, Nilsen TW. Unequal distribution of N6-methyladenosine in influenza virus mRNAs. *Mol Cell Biol*. 1987;7(4):1572-1575.
83. Krug RM, Morgan MA, Shatkin AJ. Influenza viral mRNA contains internal N6-methyladenosine and 5'-terminal 7-methylguanosine in cap structures. *J Virol*. 1976;20(1):45-53.
84. Dubois J, Terrier O, Rosa-Calatrava M. Influenza viruses and mRNA splicing: doing more with less. *MBio*. 2014;5(3):e00070-14.
85. Stutz F, Izaurralde E. The interplay of nuclear mRNP assembly, mRNA surveillance and export. *Trends Cell Biol*. 2003;13(6):319-327.
86. Read EKC, Digard P. Individual influenza A virus mRNAs show differential dependence on cellular NXF1/TAP for their nuclear export. *J Gen Virol*. 2010;91(Pt 5):1290-1301.
87. Diot C, Fournier G, Dos Santos M, et al. Influenza A Virus Polymerase Recruits the RNA Helicase DDX19 to Promote the Nuclear Export of Viral mRNAs. *Sci Rep*. 2016;6:33763.
88. Larsen S, Bui S, Perez V, Mohammad A, Medina-Ramirez H, Newcomb LL. Influenza polymerase encoding mRNAs utilize atypical mRNA nuclear export. *Virology*. 2014;11:154.
89. Swale C, Monod A, Tengo L, et al. Structural characterization of recombinant IAV polymerase reveals a stable complex between viral PA-PB1 heterodimer and host RanBP5. *Sci Rep*.

- 2016;6:24727.
90. Tarendeau F, Boudet J, Guilligay D, et al. Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14(3):229-233.
 91. Panthu B, Terrier O, Carron C, et al. The NS1 protein from influenza virus stimulates translation initiation by enhancing ribosome recruitment to mRNAs. *J Mol Biol.* 2017;429(21):3334-3352.
 92. Zhang K, Xie Y, Muñoz-Moreno R, et al. Structural basis for influenza virus NS1 protein block of mRNA nuclear export. *Nat Microbiol.* 2019;4(10):1671-1679.
 93. Gaucherand L, Porter BK, Levene RE, et al. The influenza A virus endoribonuclease PA-X usurps host mRNA processing machinery to limit host gene expression. *Cell Rep.* 2019;27(3):776-792.e7.
 94. Vreede FT, Jung TE, Brownlee GG. Model suggesting that replication of influenza virus is regulated by stabilization of replicative intermediates. *J Virol.* 2004;78(17):9568-9572.
 95. Barrett T, Wolstenholme AJ, Mahy BW. Transcription and replication of influenza virus RNA. *Virology.* 1979;98(1):211-225.
 96. Olson AC, Rosenblum E, Kuchta RD. Regulation of influenza RNA polymerase activity and the switch between replication and transcription by the concentrations of the vRNA 5' end, the cap source, and the polymerase. *Biochemistry.* 2010;49(47):10208-10215.
 97. Perez JT, Varble A, Sachidanandam R, et al. Influenza A virus-generated small RNAs regulate the switch from transcription to replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(25):11525-11530.
 98. Neumann G, Hughes MT, Kawaoka Y. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *EMBO J.* 2000;19(24):6751-6758.
 99. Akarsu H, Burmeister WP, Petosa C, et al. Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). *EMBO J.* 2003;22(18):4646-4655.
 100. Noton SL, Medcalf E, Fisher D, Mullin AE, Elton D, Digard P. Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions. *J Gen Virol.* 2007;88(Pt 8):2280-2290.
 101. Takizawa N, Watanabe K, Nouno K, Kobayashi N, Nagata K. Association of functional influenza viral proteins and RNAs with nuclear chromatin and sub-chromatin structure. *Microbes Infect.* 2006;8(3):823-833.
 102. Chase GP, Rameix-Welti M-A, Zvirbliene A, et al. Influenza virus ribonucleoprotein complexes gain preferential access to cellular export machinery through chromatin targeting. *PLoS Pathog.* 2011;7(9):e1002187.
 103. Terrier O, Carron C, De Chasse B, et al. Nucleolin interacts with influenza A nucleoprotein and contributes to viral ribonucleoprotein complexes nuclear trafficking and efficient influenza viral replication. *Sci Rep.* 2016;6(1):29006.
 104. Elton D, Simpson-Holley M, Archer K, et al. Interaction of the Influenza Virus Nucleoprotein with the Cellular CRM1-Mediated Nuclear Export Pathway. *J Virol.* 2001;75(1):408 LP - 419.
 105. Momose F, Sekimoto T, Ohkura T, et al. Apical transport of influenza A virus ribonucleoprotein requires Rab11-positive recycling endosome. *PLoS One.* 2011;6(6):e21123.
 106. Avilov S V, Moisy D, Naffakh N, Cusack S. Influenza A virus progeny vRNP trafficking in live infected cells studied with the virus-encoded fluorescently tagged PB2 protein. *Vaccine.* 2012;30(51):7411-7417.
 107. Amorim MJ, Bruce EA, Read EKC, et al. A Rab11- and microtubule-dependent mechanism for cytoplasmic transport of influenza A virus viral RNA. *J Virol.* 2011;85(9):4143-4156.
 108. Sun S, Wang Q, Zhao F, Chen W, Li Z. Glycosylation site alteration in the evolution of influenza A (H1N1) viruses. *PLoS One.* 2011;6(7):e22844.

109. Wang N, Glidden EJ, Murphy SR, Pearse BR, Hebert DN. The cotranslational maturation program for the type II membrane glycoprotein influenza neuraminidase. *J Biol Chem.* 2008;283(49):33826-33837.
110. Marquardt T, Hebert DN, Helenius A. Post-translational folding of influenza hemagglutinin in isolated endoplasmic reticulum-derived microsomes. *J Biol Chem.* 1993;268(26):19618-19625.
111. Zebedee SL, Richardson CD, Lamb RA. Characterization of the influenza virus M2 integral membrane protein and expression at the infected-cell surface from cloned cDNA. *J Virol.* 1985;56(2):502-511.
112. Chen BJ, Leser GP, Morita E, Lamb RA. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles. *J Virol.* 2007;81(13):7111-7123.
113. Takeda M, Leser GP, Russell CJ, Lamb RA. Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient viral fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(25):14610-14617.
114. Rossman JS, Jing X, Leser GP, Lamb RA. Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission. *Cell.* 2010;142(6):902-913.
115. Lai JCC, Chan WWL, Kien F, Nicholls JM, Peiris JSM, Garcia J-M. Formation of virus-like particles from human cell lines exclusively expressing influenza neuraminidase. *J Gen Virol.* 2010;91(Pt 9):2322-2330.
116. Barman S, Adhikary L, Chakrabarti AK, Bernas C, Kawaoka Y, Nayak DP. Role of transmembrane domain and cytoplasmic tail amino acid sequences of influenza A virus neuraminidase in raft association and virus budding. *J Virol.* 2004;78(10):5258-5269.
117. Jin H, Leser GP, Zhang J, Lamb RA. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase cytoplasmic tails control particle shape. *EMBO J.* 1997;16(6):1236-1247.
118. Ali A, Avalos RT, Ponimaskin E, Nayak DP. Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. *J Virol.* 2000;74(18):8709-8719.
119. Ruigrok R, Baudin F, Petit I, Weissenhorn W. Role of influenza virus M1 protein in the viral budding process. *Int Congr Ser.* 2001;1219:397-404.
120. Zhang J, Leser GP, Pekosz A, Lamb RA. The Cytoplasmic Tails of the Influenza Virus Spike Glycoproteins Are Required for Normal Genome Packaging. *Virology.* 2000;269(2):325-334.
121. Marie Gerber, Moulès V, Gavazzi C, Marquet R, Isel C. Empaquetage sélectif du génome des influenza virus A. *Virologie.* 2014;18(5):278-296.
122. Colman PM. Influenza virus neuraminidase: structure, antibodies, and inhibitors. *Protein Sci.* 1994;3(10):1687-1696.
123. Lambré CR, Chauvaux S, Pilatte Y. Fluorometric assay for the measurement of viral neuraminidase in influenza vaccines. *Vaccine.* 1989;7(2):104-105.
124. Le Briand N, Casalegno J-S, Escuret V, et al. La balance HA-NA des virus influenza A(H1N1). *Virologie.* 2016;20(1):47-60.
125. Wagner R, Matrosovich M, Klenk H-D. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev Med Virol.* 2002;12(3):159-166.
126. Böttcher E, Matrosovich T, Beyerle M, Klenk H-D, Garten W, Matrosovich M. Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *J Virol.* 2006;80(19):9896-9898.
127. Tashiro M. The role of cleavage activation of the hemagglutinin by host and bacterial proteases in the induction of the pathogenesis of influenza viruses. *Nihon Rinsho.* 1997;55(10):2633-2639.
128. Bosch FX, Orlich M, Klenk HD, Rott R. The structure of the hemagglutinin, a determinant for the pathogenicity of influenza viruses. *Virology.* 1979;95(1):197-207.
129. Stieneke-Gröber A, Vey M, Angliker H, et al. Influenza virus hemagglutinin with multibasic

- cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J.* 1992;11(7):2407-2414.
130. Andrewes CH, Worthington G. Some new or little-known respiratory viruses. *Bull World Health Organ.* 1959;20(2-3):435-443.
 131. Shope RE. Swine influenza: III. Filtration experiments and etiology. *J Exp Med.* 1931;54(3):373-385.
 132. Tong S, Li Y, Rivaller P, et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(11):4269-4274.
 133. Long JS, Mistry B, Haslam SM, Barclay WS. Host and viral determinants of influenza A virus species specificity. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17(2):67-81.
 134. Klenk HD, Garten W. Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol.* 1994;2(2):39-43.
 135. França MS, Brown JD. Influenza pathobiology and pathogenesis in avian species. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2014;385:221-242.
 136. Brown J, Poulson R, Carter D, et al. Susceptibility of avian species to North American H13 low pathogenic avian influenza viruses. *Avian Dis.* 2012;56(4 Suppl):969-975.
 137. Webster RG, Yakhno M, Hinshaw VS, Bean WJ, Murti KG. Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology.* 1978;84(2):268-278.
 138. Ellis TM, Bousfield RB, Bissett LA, et al. Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002. *Avian Pathol.* 2004;33(5):492-505.
 139. Brown JD, Stallknecht DE, Beck JR, Suarez DL, Swayne DE. Susceptibility of North American ducks and gulls to H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(11):1663-1670.
 140. Tang Y, Wu P, Peng D, et al. Characterization of duck H5N1 influenza viruses with differing pathogenicity in mallard (*Anas platyrhynchos*) ducks. *Avian Pathol.* 2009;38(6):457-467.
 141. Capua I, Marangon S. Control of avian influenza in poultry. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(9):1319-1324.
 142. Burns A, Mensbrugge D van der, Timmer H. Evaluating the Economic Consequences of Avian Influenza. *Glob Dev Financ.* Published online 2006.
 143. Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet (London, England).* 2018;391(10127):1285-1300.
 144. Putri WCWS, Muscatello DJ, Stockwell MS, Newall AT. Economic burden of seasonal influenza in the United States. *Vaccine.* 2018;36(27):3960-3966.
 145. Lowen AC, Mubareka S, Steel J, Palese P. Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. *PLoS Pathog.* 2007;3(10):1470-1476.
 146. Lowen AC, Steel J. Roles of humidity and temperature in shaping influenza seasonality. *J Virol.* 2014;88(14):7692-7695.
 147. Shaman J, Pitzer VE, Viboud C, Grenfell BT, Lipsitch M. Absolute humidity and the seasonal onset of influenza in the continental United States. *PLoS Biol.* 2010;8(2):e1000316.
 148. Shoji M, Katayama K, Sano K. Absolute humidity as a deterministic factor affecting seasonal influenza epidemics in Japan. *Tohoku J Exp Med.* 2011;224(4):251-256.
 149. Lam EKS, Morris DH, Hurt AC, Barr IG, Russell CA. The impact of climate and antigenic evolution on seasonal influenza virus epidemics in Australia. *Nat Commun.* 2020;11(1):2741.
 150. Snyder MH, Stephenson EH, Young H, et al. Infectivity and antigenicity of live avian-human influenza A reassortant virus: comparison of intranasal and aerosol routes in squirrel monkeys. *J Infect Dis.* 1986;154(4):709-711.
 151. Alford RH, Kasel JA, Gerone PJ, Knight V. Human influenza resulting from aerosol inhalation. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med (New York, NY).* 1966;122(3):800-804.

152. Lam P-P, Coleman BL, Green K, et al. Predictors of influenza among older adults in the emergency department. *BMC Infect Dis.* 2016;16(1):615.
153. Monto AS, Gravenstein S, Elliott M, Colopy M, Schweinle J. Clinical signs and symptoms predicting influenza infection. *Arch Intern Med.* 2000;160(21):3243-3247.
154. Ohmit SE, Monto AS. Symptomatic predictors of influenza virus positivity in children during the influenza season. *Clin Infect Dis an Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2006;43(5):564-568.
155. Minodier L, Charrel RN, Ceccaldi P-E, et al. Prevalence of gastrointestinal symptoms in patients with influenza, clinical significance, and pathophysiology of human influenza viruses in faecal samples: what do we know? *Virology.* 2015;12:215.
156. Lessler J, Reich NG, Brookmeyer R, Perl TM, Nelson KE, Cummings DAT. Incubation periods of acute respiratory viral infections: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2009;9(5):291-300.
157. Lau LLH, Cowling BJ, Fang VJ, et al. Viral shedding and clinical illness in naturally acquired influenza virus infections. *J Infect Dis.* 2010;201(10):1509-1516.
158. Killingley B, Greatorex J, Digard P, et al. The environmental deposition of influenza virus from patients infected with influenza A(H1N1)pdm09: Implications for infection prevention and control. *J Infect Public Health.* 2016;9(3):278-288.
159. Dell KM, Schulman SL. Rhabdomyolysis and acute renal failure in a child with influenza A infection. *Pediatr Nephrol.* 1997;11(3):363-365.
160. Mamas MA, Fraser D, Neyses L. Cardiovascular manifestations associated with influenza virus infection. *Int J Cardiol.* 2008;130(3):304-309.
161. Kaji M, Watanabe A, Aizawa H. Differences in clinical features between influenza A H1N1, A H3N2, and B in adult patients. *Respirology.* 2003;8(2):231-233.
162. Carrat F, Tachet A, Rouzioux C, Housset B, Valleron AJ. Evaluation of clinical case definitions of influenza: detailed investigation of patients during the 1995-1996 epidemic in France. *Clin Infect Dis an Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1999;28(2):283-290.
163. Creager HM, Kumar A, Zeng H, Maines TR, Tumpey TM, Belser JA. Infection and Replication of Influenza Virus at the Ocular Surface. Schultz-Cherry S, ed. *J Virol.* 2018;92(7):e02192-17.
164. Hussain M, Galvin HD, Haw TY, Nutsford AN, Husain M. Drug resistance in influenza A virus: the epidemiology and management. *Infect Drug Resist.* 2017;10:121-134.
165. Bright RA, Shay DK, Shu B, Cox NJ, Klimov AI. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *JAMA.* 2006;295(8):891-894.
166. Brown AN, McSharry JJ, Weng Q, et al. In vitro system for modeling influenza A virus resistance under drug pressure. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(8):3442-3450.
167. Hayden FG, Hay AJ. Emergence and transmission of influenza A viruses resistant to amantadine and rimantadine. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1992;176:119-130.
168. Takashita E, Daniels RS, Fujisaki S, et al. Global update on the susceptibilities of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir, 2017-2018. *Antiviral Res.* 2020;175:104718.
169. Jin H, Subbarao K. Live attenuated influenza vaccine. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2015;386:181-204.
170. Belongia EA, Simpson MD, King JP, et al. Variable influenza vaccine effectiveness by subtype: a systematic review and meta-analysis of test-negative design studies. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(8):942-951.
171. Raut S, Hurd J, Blandford G, Heath RB, Cureton RJ. The pathogenesis of infections of the mouse caused by virulent and avirulent variants of an influenza virus. *J Med Microbiol.* 1975;8(1):127-136.
172. Ibricevic A, Pekosz A, Walter MJ, et al. Influenza virus receptor specificity and cell tropism in mouse and human airway epithelial cells. *J Virol.* 2006;80(15):7469-7480.
173. Driskell EA, Jones CA, Stallknecht DE, Howerth EW, Tompkins SM. Avian influenza virus

- isolates from wild birds replicate and cause disease in a mouse model of infection. *Virology*. 2010;399(2):280-289.
174. Yang YT, Evans CA. Hypothermia in mice due to influenza virus infection. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1961;108:776-780.
 175. Jang H, Boltz D, Sturm-Ramirez K, et al. Highly pathogenic H5N1 influenza virus can enter the central nervous system and induce neuroinflammation and neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(33):14063-14068.
 176. Fukushi M, Ito T, Oka T, et al. Serial histopathological examination of the lungs of mice infected with influenza A virus PR8 strain. *PLoS One*. 2011;6(6):e21207.
 177. Schulman JL, Kilbourne ED. Airborne transmission of influenza virus infection in mice. *Nature*. 1962;195:1129-1130.
 178. Lowen AC, Mubareka S, Tumpey TM, García-Sastre A, Palese P. The guinea pig as a transmission model for human influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(26):9988-9992.
 179. Belser JA, Eckert AM, Tumpey TM, Maines TR. Complexities in Ferret Influenza Virus Pathogenesis and Transmission Models. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016;80(3):733-744.
 180. Zitzow LA, Rowe T, Morken T, Shieh W-J, Zaki S, Katz JM. Pathogenesis of avian influenza A (H5N1) viruses in ferrets. *J Virol*. 2002;76(9):4420-4429.
 181. de Graaf M, Fouchier RAM. Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *EMBO J*. 2014;33(8):823-841.
 182. Wasik BR, Barnard KN, Ossiboff RJ, et al. Distribution of O-Acetylated Sialic Acids among Target Host Tissues for Influenza Virus. *mSphere*. 2017;2(5).
 183. Munster VJ, de Wit E, van den Brand JMA, et al. Pathogenesis and transmission of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza virus in ferrets. *Science*. 2009;325(5939):481-483.
 184. Pappas C, Yang H, Carney PJ, et al. Assessment of transmission, pathogenesis and adaptation of H2 subtype influenza viruses in ferrets. *Virology*. 2015;477:61-71.
 185. Tumpey TM, Maines TR, Van Hoeven N, et al. A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission. *Science*. 2007;315(5812):655-659.
 186. Sheng Z-M, Chertow DS, Ambroggio X, et al. Autopsy series of 68 cases dying before and during the 1918 influenza pandemic peak. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(39):16416-16421.
 187. Swann JP. The search for synthetic penicillin during World War II. *Br J Hist Sci*. 1983;16(53 Pt 2):154-190.
 188. Rabadan R, Levine AJ, Robins H. Comparison of avian and human influenza A viruses reveals a mutational bias on the viral genomes. *J Virol*. 2006;80(23):11887-11891.
 189. Shope RE. The incidence of neutralizing antibodies for swine influenza virus in the sera of human being of different ages. *J Exp Med*. 1936;63(5):669-684.
 190. Ito T, Couceiro JN, Kelm S, et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol*. 1998;72(9):7367-7373.
 191. Couceiro JN, Paulson JC, Baum LG. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Res*. 1993;29(2):155-165.
 192. Suzuki Y, Ito T, Suzuki T, et al. Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *J Virol*. 2000;74(24):11825-11831.
 193. Trebbien R, Larsen LE, Viuff BM. Distribution of sialic acid receptors and influenza A virus of avian and swine origin in experimentally infected pigs. *Virol J*. 2011;8:434.
 194. Worobey M, Han G-Z, Rambaut A. Genesis and pathogenesis of the 1918 pandemic H1N1 influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(22):8107-8112.
 195. Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol*. 1989;63(11):4603-4608.

196. Lindstrom SE, Cox NJ, Klimov A. Genetic analysis of human H2N2 and early H3N2 influenza viruses, 1957-1972: evidence for genetic divergence and multiple reassortment events. *Virology*. 2004;328(1):101-119.
197. Schäfer JR, Kawaoka Y, Bean WJ, Süss J, Senne D, Webster RG. Origin of the pandemic 1957 H2 influenza A virus and the persistence of its possible progenitors in the avian reservoir. *Virology*. 1993;194(2):781-788.
198. Viboud C, Simonsen L, Fuentes R, Flores J, Miller MA, Chowell G. Global Mortality Impact of the 1957-1959 Influenza Pandemic. *J Infect Dis*. 2016;213(5):738-745.
199. Nguyen-Van-Tam JS, Hampson AW. The epidemiology and clinical impact of pandemic influenza. *Vaccine*. 2003;21(16):1762-1768.
200. Scholtissek C, von Hoyningen V, Rott R. Genetic relatedness between the new 1977 epidemic strains (H1N1) of influenza and human influenza strains isolated between 1947 and 1957 (H1N1). *Virology*. 1978;89(2):613-617.
201. Nakajima K, Desselberger U, Palese P. Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950. *Nature*. 1978;274(5669):334-339.
202. Smith GJD, Vijaykrishna D, Bahl J, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*. 2009;459(7250):1122-1125.
203. Van Kerkhove MD, Hirve S, Koukounari A, Mounts AW. Estimating age-specific cumulative incidence for the 2009 influenza pandemic: a meta-analysis of A(H1N1)pdm09 serological studies from 19 countries. *Influenza Other Respi Viruses*. 2013;7(5):872-886.
204. Paget J, Spreewenbergh P, Charu V, et al. Global mortality associated with seasonal influenza epidemics: New burden estimates and predictors from the GLaMOR Project. *J Glob Health*. 2019;9(2):20421.
205. Wendel I, Rubbenstroth D, Doedt J, et al. The avian-origin PB1 gene segment facilitated replication and transmissibility of the H3N2/1968 pandemic influenza virus. *J Virol*. 2015;89(8):4170-4179.
206. Wang F, Liu G, Lu Y, Hlasny M, Liu Q, Zhou Y. Acquisition of Avian-Origin PB1 Facilitates Viral RNA Synthesis by the 2009 Pandemic H1N1 Virus Polymerase. *Viruses*. 2020;12(3).
207. Steel J, Lowen AC. Influenza A virus reassortment. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2014;385:377-401.
208. Essere B, Yver M, Gavazzi C, et al. Critical role of segment-specific packaging signals in genetic reassortment of influenza A viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(40):E3840-8.
209. Cobbin JCA, Ong C, Verity E, Gilbertson BP, Rockman SP, Brown LE. Influenza virus PB1 and neuraminidase gene segments can cosegregate during vaccine reassortment driven by interactions in the PB1 coding region. *J Virol*. 2014;88(16):8971-8980.
210. Steinhauer DA, Holland JJ. Rapid evolution of RNA viruses. *Annu Rev Microbiol*. 1987;41:409-433.
211. Hanada K, Suzuki Y, Gojobori T. A large variation in the rates of synonymous substitution for RNA viruses and its relationship to a diversity of viral infection and transmission modes. *Mol Biol Evol*. 2004;21(6):1074-1080.
212. Tewawong N, Prachayangprecha S, Vichiwattana P, et al. Assessing Antigenic Drift of Seasonal Influenza A(H3N2) and A(H1N1)pdm09 Viruses. *PLoS One*. 2015;10(10):e0139958.
213. Hassan MM, Hoque MA, Ujvari B, Klaassen M. Live bird markets in Bangladesh as a potentially important source for Avian Influenza Virus transmission. *Prev Vet Med*. 2018;156:22-27.
214. Guan Y, Smith GJD. The emergence and diversification of panzootic H5N1 influenza viruses. *Virus Res*. 2013;178(1):35-43.
215. Chen H, Smith GJD, Zhang SY, et al. Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature*. 2005;436(7048):191-192.

216. Gall-Reculé G Le, Briand F-X, Schmitz A, Guionie O, Massin P, Jestin V. Double introduction of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus into France in early 2006. *Avian Pathol.* 2008;37(1):15-23.
217. Bragstad K, Jørgensen PH, Handberg K, Hammer AS, Kabell S, Fomsgaard A. First introduction of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses in wild and domestic birds in Denmark, Northern Europe. *Virology.* 2007;4:43.
218. De Benedictis P, Joannis TM, Lombin LH, et al. Field and laboratory findings of the first incursion of the Asian H5N1 highly pathogenic avian influenza virus in Africa. *Avian Pathol.* 2007;36(2):115-117.
219. Roche B, Lebarbenchon C, Gauthier-Clerc M, et al. Water-borne transmission drives avian influenza dynamics in wild birds: the case of the 2005-2006 epidemics in the Camargue area. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* 2009;9(5):800-805.
220. Numberger D, Dreier C, Vullioud C, Gabriel G, Greenwood AD, Grossart H-P. Recovery of influenza A viruses from lake water and sediments by experimental inoculation. *PLoS One.* 2019;14(5):e0216880.
221. Ito T, Okazaki K, Kawaoka Y, Takada A, Webster RG, Kida H. Perpetuation of influenza A viruses in Alaskan waterfowl reservoirs. *Arch Virol.* 1995;140(7):1163-1172.
222. Lebarbenchon C, Yang M, Keeler SP, et al. Viral replication, persistence in water and genetic characterization of two influenza A viruses isolated from surface lake water. *PLoS One.* 2011;6(10):e26566.
223. Gerloff NA, Jones J, Simpson N, et al. A high diversity of Eurasian lineage low pathogenicity avian influenza A viruses circulate among wild birds sampled in Egypt. *PLoS One.* 2013;8(7):e68522.
224. Kayali G, Kandeil A, El-Shesheny R, et al. Avian Influenza A(H5N1) Virus in Egypt. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(3):379-388.
225. Subbarao K, Klimov A, Katz J, et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science.* 1998;279(5349):393-396.
226. Chan PKS. Outbreak of avian influenza A(H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997. *Clin Infect Dis an Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2002;34 Suppl 2:S58-64.
227. Sims LD, Ellis TM, Liu KK, et al. Avian influenza in Hong Kong 1997-2002. *Avian Dis.* 2003;47(3 Suppl):832-838.
228. Xu X, Subbarao, Cox NJ, Guo Y. Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. *Virology.* 1999;261(1):15-19.
229. Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenström J, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Global patterns of influenza a virus in wild birds. *Science.* 2006;312(5772):384-388.
230. Brown JD, Stallknecht DE, Swayne DE. Experimental infection of swans and geese with highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) of Asian lineage. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(1):136-142.
231. Perkins LEL, Swayne DE. Pathogenicity of a Hong Kong-origin H5N1 highly pathogenic avian influenza virus for emus, geese, ducks, and pigeons. *Avian Dis.* 2002;46(1):53-63.
232. Schmolke M, Manicassamy B, Pena L, et al. Differential contribution of PB1-F2 to the virulence of highly pathogenic H5N1 influenza A virus in mammalian and avian species. *PLoS Pathog.* 2011;7(8):e1002186.
233. de Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med.* 2006;12(10):1203-1207.
234. Perrone LA, Plowden JK, García-Sastre A, Katz JM, Tumpey TM. H5N1 and 1918 pandemic influenza virus infection results in early and excessive infiltration of macrophages and neutrophils in the lungs of mice. *PLoS Pathog.* 2008;4(8):e1000115.
235. Szretter KJ, Gangappa S, Lu X, et al. Role of host cytokine responses in the pathogenesis of

- avian H5N1 influenza viruses in mice. *J Virol.* 2007;81(6):2736-2744.
236. Tran TH, Nguyen TL, Nguyen TD, et al. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N Engl J Med.* 2004;350(12):1179-1188.
 237. Ungchusak K, Auewarakul P, Dowell SF, et al. Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). *N Engl J Med.* 2005;352(4):333-340.
 238. Katz JM, Lim W, Bridges CB, et al. Antibody response in individuals infected with avian influenza A (H5N1) viruses and detection of anti-H5 antibody among household and social contacts. *J Infect Dis.* 1999;180(6):1763-1770.
 239. Buxton Bridges C, Katz JM, Seto WH, et al. Risk of influenza A (H5N1) infection among health care workers exposed to patients with influenza A (H5N1), Hong Kong. *J Infect Dis.* 2000;181(1):344-348.
 240. Herfst S, Schrauwen EJA, Linster M, et al. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science.* 2012;336(6088):1534-1541.
 241. Buhnerkempe MG, Gostic K, Park M, Ahsan P, Belser JA, Lloyd-Smith JO. Mapping influenza transmission in the ferret model to transmission in humans. *Elife.* 2015;4.
 242. Gao R, Cao B, Hu Y, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *N Engl J Med.* 2013;368(20):1888-1897.
 243. Lam TT-Y, Wang J, Shen Y, et al. The genesis and source of the H7N9 influenza viruses causing human infections in China. *Nature.* 2013;502(7470):241-244.
 244. Zhang F, Bi Y, Wang J, et al. Human infections with recently-emerging highly pathogenic H7N9 avian influenza virus in China. *J Infect.* 2017;75(1):71-75.
 245. Meliopoulos VA, Karlsson EA, Kercher L, et al. Human H7N9 and H5N1 influenza viruses differ in induction of cytokines and tissue tropism. *J Virol.* 2014;88(22):12982-12991.
 246. Guan Y, Shortridge KF, Krauss S, Webster RG. Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the 'internal' genes of H5N1 viruses in Hong Kong? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(16):9363-9367.
 247. Shen Y-Y, Ke C-W, Li Q, et al. Novel Reassortant Avian Influenza A(H5N6) Viruses in Humans, Guangdong, China, 2015. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(8):1507-1509.
 248. Monne I, Meseko C, Joannis T, et al. Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Virus in Poultry, Nigeria, 2015. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(7):1275-1277.
 249. Xu H, Meng F, Huang D, et al. Genomic and phylogenetic characterization of novel, recombinant H5N2 avian influenza virus strains isolated from vaccinated chickens with clinical symptoms in China. *Viruses.* 2015;7(3):887-898.
 250. Tosh C, Nagarajan S, Kumar M, et al. Multiple introductions of a reassortant H5N1 avian influenza virus of clade 2.3.2.1c with PB2 gene of H9N2 subtype into Indian poultry. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* 2016;43:173-178.
 251. Globig A, Staubach C, Sauter-Louis C, et al. Highly Pathogenic Avian Influenza H5N8 Clade 2.3.4.4b in Germany in 2016/2017. *Front Vet Sci.* 2017;4:240.
 252. Śmietanka K, Świętoń E, Kozak E, et al. Highly Pathogenic Avian Influenza H5N8 in Poland in 2019-2020. *J Vet Res.* 2020;64(4):469-476.
 253. Anis A, AboElkhair M, Ibrahim M. Characterization of highly pathogenic avian influenza H5N8 virus from Egyptian domestic waterfowl in 2017. *Avian Pathol.* 2018;47(4):400-409.
 254. Andronico A, Courcoul A, Bronner A, et al. Highly pathogenic avian influenza H5N8 in south-west France 2016-2017: A modeling study of control strategies. *Epidemics.* 2019;28:100340.
 255. Jiang H, Wu P, Uyeki TM, et al. Preliminary Epidemiologic Assessment of Human Infections With Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N6) Virus, China. *Clin Infect Dis an Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2017;65(3):383-388.
 256. Wei S-H, Yang J-R, Wu H-S, et al. Human infection with avian influenza A H6N1 virus: an epidemiological analysis. *Lancet Respir Med.* 2013;1(10):771-778.
 257. Avian influenza A/(H7N2) outbreak in the United Kingdom. *Eur Commun Dis Bull.*

- 2007;12(5):E070531.2.
258. Update: influenza activity--United States, 2003-04 season. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2004;53(13):284-287.
 259. Tweed SA, Skowronski DM, David ST, et al. Human illness from avian influenza H7N3, British Columbia. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(12):2196-2199.
 260. Hirst M, Astell CR, Griffith M, et al. Novel avian influenza H7N3 strain outbreak, British Columbia. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(12):2192-2195.
 261. Nguyen-Van-Tam JS, Nair P, Acheson P, et al. Outbreak of low pathogenicity H7N3 avian influenza in UK, including associated case of human conjunctivitis. *Eur Commun Dis Bull.* 2006;11(5):E060504.2.
 262. Puzelli S, Di Trani L, Fabiani C, et al. Serological analysis of serum samples from humans exposed to avian H7 influenza viruses in Italy between 1999 and 2003. *J Infect Dis.* 2005;192(8):1318-1322.
 263. Tong X-C, Weng S-S, Xue F, Wu X, Xu T-M, Zhang W-H. First human infection by a novel avian influenza A(H7N4) virus. *J Infect.* 2018;77(3):249-257.
 264. Puzelli S, Rizzo C, Fabiani C, et al. Influenza A(H7N7) Virus among Poultry Workers, Italy, 2013. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(8):1512-1513.
 265. Puzelli S, Rossini G, Facchini M, et al. Human infection with highly pathogenic A(H7N7) avian influenza virus, Italy, 2013. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(10):1745-1749.
 266. Fouchier RAM, Schneeberger PM, Rozendaal FW, et al. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(5):1356-1361.
 267. Zhou L, Tan Y, Kang M, et al. Preliminary Epidemiology of Human Infections with Highly Pathogenic Avian Influenza A(H7N9) Virus, China, 2017. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(8):1355-1359.
 268. Song W, Qin K. Human-infecting influenza A (H9N2) virus: A forgotten potential pandemic strain? *Zoonoses Public Health.* 2020;67(3):203-212.
 269. Arzey GG, Kirkland PD, Arzey KE, et al. Influenza virus A (H10N7) in chickens and poultry abattoir workers, Australia. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(5):814-816.
 270. Chen H, Yuan H, Gao R, et al. Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: a descriptive study. *Lancet (London, England).* 2014;383(9918):714-721.
 271. Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature.* 2006;440(7083):435-436.
 272. Kumlin U, Olofsson S, Dimock K, Arnberg N. Sialic acid tissue distribution and influenza virus tropism. *Influenza Other Respi Viruses.* 2008;2(5):147-154.
 273. Baum LG, Paulson JC. Sialyloligosaccharides of the respiratory epithelium in the selection of human influenza virus receptor specificity. *Acta Histochem Suppl.* 1990;40:35-38.
 274. Zeng H, Goldsmith CS, Kumar A, et al. Tropism and Infectivity of a Seasonal A(H1N1) and a Highly Pathogenic Avian A(H5N1) Influenza Virus in Primary Differentiated Ferret Nasal Epithelial Cell Cultures. *J Virol.* 2019;93(10).
 275. Nicholls JM, Bourne AJ, Chen H, Guan Y, Peiris JSM. Sialic acid receptor detection in the human respiratory tract: evidence for widespread distribution of potential binding sites for human and avian influenza viruses. *Respir Res.* 2007;8(1):73.
 276. Costa T, Chaves AJ, Valle R, et al. Distribution patterns of influenza virus receptors and viral attachment patterns in the respiratory and intestinal tracts of seven avian species. *Vet Res.* 2012;43(1):28.
 277. Yu JE, Yoon H, Lee HJ, et al. Expression patterns of influenza virus receptors in the respiratory tracts of four species of poultry. *J Vet Sci.* 2011;12(1):7-13.
 278. Wan H, Perez DR. Quail carry sialic acid receptors compatible with binding of avian and

- human influenza viruses. *Virology*. 2006;346(2):278-286.
279. Chandrasekaran A, Srinivasan A, Raman R, et al. Glycan topology determines human adaptation of avian H5N1 virus hemagglutinin. *Nat Biotechnol*. 2008;26(1):107-113.
280. Stencel-Baerenwald JE, Reiss K, Reiter DM, Stehle T, Dermody TS. The sweet spot: defining virus-sialic acid interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(11):739-749.
281. Sabesan S, Bock K, Paulson JC. Conformational analysis of sialyloligosaccharides. *Carbohydr Res*. 1991;218:27-54.
282. Xu Y, Peng R, Zhang W, et al. Avian-to-Human Receptor-Binding Adaptation of Avian H7N9 Influenza Virus Hemagglutinin. *Cell Rep*. 2019;29(8):2217-2228.e5.
283. Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG, Paulson JC. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology*. 1994;205(1):17-23.
284. Ha Y, Stevens DJ, Skehel JJ, Wiley DC. X-ray structure of the hemagglutinin of a potential H3 avian progenitor of the 1968 Hong Kong pandemic influenza virus. *Virology*. 2003;309(2):209-218.
285. Prinzing R, Preßmar A, Schleucher E. Body temperature in birds. *Comp Biochem Physiol Part A Physiol*. 1991;99(4):499-506.
286. Aggarwal S, Dewhurst S, Takimoto T, Kim B. Biochemical impact of the host adaptation-associated PB2 E627K mutation on the temperature-dependent RNA synthesis kinetics of influenza A virus polymerase complex. *J Biol Chem*. 2011;286(40):34504-34513.
287. Labadie K, Dos Santos Afonso E, Rameix-Welti M-A, van der Werf S, Naffakh N. Host-range determinants on the PB2 protein of influenza A viruses control the interaction between the viral polymerase and nucleoprotein in human cells. *Virology*. 2007;362(2):271-282.
288. McFadden ERJ, Pichurko BM, Bowman HF, et al. Thermal mapping of the airways in humans. *J Appl Physiol*. 1985;58(2):564-570.
289. Massin P, van der Werf S, Naffakh N. Residue 627 of PB2 is a determinant of cold sensitivity in RNA replication of avian influenza viruses. *J Virol*. 2001;75(11):5398-5404.
290. Russell CJ. Acid-induced membrane fusion by the hemagglutinin protein and its role in influenza virus biology. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2014;385:93-116.
291. Galloway SE, Reed ML, Russell CJ, Steinhauer DA. Influenza HA subtypes demonstrate divergent phenotypes for cleavage activation and pH of fusion: implications for host range and adaptation. *PLoS Pathog*. 2013;9(2):e1003151.
292. Zaraket H, Bridges OA, Russell CJ. The pH of activation of the hemagglutinin protein regulates H5N1 influenza virus replication and pathogenesis in mice. *J Virol*. 2013;87(9):4826-4834.
293. Richard M, Herfst S, van den Brand JMA, et al. Mutations Driving Airborne Transmission of A/H5N1 Virus in Mammals Cause Substantial Attenuation in Chickens only when combined. *Sci Rep*. 2017;7(1):7187.
294. DuBois RM, Zaraket H, Reddivari M, Heath RJ, White SW, Russell CJ. Acid stability of the hemagglutinin protein regulates H5N1 influenza virus pathogenicity. *PLoS Pathog*. 2011;7(12):e1002398.
295. England RJ, Homer JJ, Knight LC, Ell SR. Nasal pH measurement: a reliable and repeatable parameter. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1999;24(1):67-68.
296. Russell CJ, Hu M, Okda FA. Influenza Hemagglutinin Protein Stability, Activation, and Pandemic Risk. *Trends Microbiol*. 2018;26(10):841-853.
297. Richardson PS, Peatfield AC. Protection of the respiratory tract -- mucus production: a review. *J R Soc Med*. 1980;73(2):123-126.
298. Bansil R, Turner BS. The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018;124:3-15.
299. Ehré C. Mucus clearance in the respiratory tract: a new concept? *Med Sci (Paris)*. 2013;29(2):144-146.

300. Jennings R, Premanandan C. Air conduction: larynx, trachea, bronchi and bronchioles. *Veterinary histology*.
301. Clements JA. Surface tension of lung extracts. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1957;95(1):170-172.
302. Crouch E, Hartshorn K, Ofek I. Collectins and pulmonary innate immunity. *Immunol Rev*. 2000;173:52-65.
303. Rodgers BC, Mims CA. Influenza virus replication in human alveolar macrophages. *J Med Virol*. 1982;9(3):177-184.
304. Yu WCL, Chan RWY, Wang J, et al. Viral replication and innate host responses in primary human alveolar epithelial cells and alveolar macrophages infected with influenza H5N1 and H1N1 viruses. *J Virol*. 2011;85(14):6844-6855.
305. Tate MD, Pickett DL, van Rooijen N, Brooks AG, Reading PC. Critical role of airway macrophages in modulating disease severity during influenza virus infection of mice. *J Virol*. 2010;84(15):7569-7580.
306. Hopkins PA, Sriskandan S. Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin Exp Immunol*. 2005;140(3):395-407.
307. Leifer CA, Kennedy MN, Mazzoni A, Lee C, Kruhlak MJ, Segal DM. TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation. *J Immunol*. 2004;173(2):1179-1183.
308. Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, et al. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol*. 2004;5(2):190-198.
309. Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, et al. Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *J Biol Chem*. 2005;280(7):5571-5580.
310. de Marcken M, Dhaliwal K, Danielsen AC, Gautron AS, Dominguez-Villar M. TLR7 and TLR8 activate distinct pathways in monocytes during RNA virus infection. *Sci Signal*. 2019;12(605).
311. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol*. 2002;168(9):4531-4537.
312. Di Domizio J, Blum A, Gallagher-Gambarelli M, Molens J-P, Chaperot L, Plumas J. TLR7 stimulation in human plasmacytoid dendritic cells leads to the induction of early IFN-inducible genes in the absence of type I IFN. *Blood*. 2009;114(9):1794-1802.
313. Sha Q, Truong-Tran AQ, Plitt JR, Beck LA, Schleimer RP. Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;31(3):358-364.
314. Kawagoe T, Sato S, Matsushita K, et al. Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat Immunol*. 2008;9(6):684-691.
315. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(6):a001651.
316. Wang L, Qiao X, Zhang S, et al. Porcine transmissible gastroenteritis virus nonstructural protein 2 contributes to inflammation via NF- κ B activation. *Virulence*. 2018;9(1):1685-1698.
317. DeDiego ML, Nieto-Torres JL, Regla-Nava JA, et al. Inhibition of NF- κ B-mediated inflammation in severe acute respiratory syndrome coronavirus-infected mice increases survival. *J Virol*. 2014;88(2):913-924.
318. Sun S-C, Chang J-H, Jin J. Regulation of nuclear factor- κ B in autoimmunity. *Trends Immunol*. 2013;34(6):282-289.
319. Honda K, Yanai H, Negishi H, et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*. 2005;434(7034):772-777.
320. Hatesuer B, Hoang HTT, Riese P, et al. Deletion of Irf3 and Irf7 Genes in Mice Results in Altered Interferon Pathway Activation and Granulocyte-Dominated Inflammatory Responses to Influenza A Infection. *J Innate Immun*. 2017;9(2):145-161.
321. Stewart CR, Bagnaud-Baule A, Karpala AJ, et al. Toll-like receptor 7 ligands inhibit influenza A infection in chickens. *J Interf cytokine Res Off J Int Soc Interf Cytokine Res*. 2012;32(1):46-

- 51.
322. Hoebe K, Du X, Georgel P, et al. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature*. 2003;424(6950):743-748.
323. Le Goffic R, Pothlichet J, Vitour D, et al. Cutting Edge: Influenza A virus activates TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial cells. *J Immunol*. 2007;178(6):3368-3372.
324. Le Goffic R, Balloy V, Lagranderie M, et al. Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR)3 to influenza A virus-induced acute pneumonia. *PLoS Pathog*. 2006;2(6):e53.
325. Beigel JH, Farrar J, Han AM, et al. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N Engl J Med*. 2005;353(13):1374-1385.
326. Karpala AJ, Lowenthal JW, Bean AG. Activation of the TLR3 pathway regulates IFN β production in chickens. *Dev Comp Immunol*. 2008;32(4):435-444.
327. Ranaware PB, Mishra A, Vijayakumar P, et al. Genome Wide Host Gene Expression Analysis in Chicken Lungs Infected with Avian Influenza Viruses. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153671.
328. Bruns AM, Leser GP, Lamb RA, Horvath CM. The innate immune sensor LGP2 activates antiviral signaling by regulating MDA5-RNA interaction and filament assembly. *Mol Cell*. 2014;55(5):771-781.
329. Saito T, Hirai R, Loo Y-M, et al. Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(2):582-587.
330. Komuro A, Horvath CM. RNA- and virus-independent inhibition of antiviral signaling by RNA helicase LGP2. *J Virol*. 2006;80(24):12332-12342.
331. Goubau D, Deddouche S, Reis e Sousa C. Cytosolic sensing of viruses. *Immunity*. 2013;38(5):855-869.
332. Goubau D, Schlee M, Deddouche S, et al. Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates. *Nature*. 2014;514(7522):372-375.
333. Hornung V, Ellegast J, Kim S, et al. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science*. 2006;314(5801):994-997.
334. Liu G, Park H-S, Pyo H-M, Liu Q, Zhou Y. Influenza A Virus Panhandle Structure Is Directly Involved in RIG-I Activation and Interferon Induction. *J Virol*. 2015;89(11):6067-6079.
335. Schlee M, Roth A, Hornung V, et al. Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity*. 2009;31(1):25-34.
336. Feng Q, Hato S V, Langereis MA, et al. MDA5 detects the double-stranded RNA replicative form in picornavirus-infected cells. *Cell Rep*. 2012;2(5):1187-1196.
337. Peisley A, Jo MH, Lin C, et al. Kinetic mechanism for viral dsRNA length discrimination by MDA5 filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(49):E3340-9.
338. Berke IC, Modis Y. MDA5 cooperatively forms dimers and ATP-sensitive filaments upon binding double-stranded RNA. *EMBO J*. 2012;31(7):1714-1726.
339. Lin J-P, Fan Y-K, Liu HM. The 14-3-3 β chaperone protein promotes antiviral innate immunity via facilitating MDA5 oligomerization and intracellular redistribution. *PLoS Pathog*. 2019;15(2):e1007582.
340. Liu HM, Loo Y-M, Horner SM, Zornetzer GA, Katze MG, Gale MJ. The mitochondrial targeting chaperone 14-3-3 ϵ regulates a RIG-I translocon that mediates membrane association and innate antiviral immunity. *Cell Host Microbe*. 2012;11(5):528-537.
341. Gack MU, Shin YC, Joo C-H, et al. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature*. 2007;446(7138):916-920.
342. Hou F, Sun L, Zheng H, Skaug B, Jiang Q-X, Chen ZJ. MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell*. 2011;146(3):448-461.
343. Kato H, Takeuchi O, Sato S, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the

- recognition of RNA viruses. *Nature*. 2006;441(7089):101-105.
344. Benitez AA, Panis M, Xue J, et al. In Vivo RNAi Screening Identifies MDA5 as a Significant Contributor to the Cellular Defense against Influenza A Virus. *Cell Rep*. 2015;11(11):1714-1726.
 345. Barber MRW, Aldridge JRJ, Fleming-Canepa X, Wang Y-D, Webster RG, Magor KE. Identification of avian RIG-I responsive genes during influenza infection. *Mol Immunol*. 2013;54(1):89-97.
 346. Cheng Y, Huang Q, Ji W, et al. Muscovy duck retinoic acid-induced gene I (MdRIG-I) functions in innate immunity against H9N2 avian influenza viruses (AIV) infections. *Vet Immunol Immunopathol*. 2015;163(3-4):183-193.
 347. Hayashi T, Watanabe C, Suzuki Y, Tanikawa T, Uchida Y, Saito T. Chicken MDA5 senses short double-stranded RNA with implications for antiviral response against avian influenza viruses in chicken. *J Innate Immun*. 2014;6(1):58-71.
 348. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. 2002;10(2):417-426.
 349. Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms. *Cell Discov*. 2020;6(1):36.
 350. Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Nuñez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol*. 2009;10(3):241-247.
 351. Keller M, Rüegg A, Werner S, Beer H-D. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell*. 2008;132(5):818-831.
 352. Shi H, Wang Y, Li X, et al. NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component. *Nat Immunol*. 2016;17(3):250-258.
 353. Pothlichet J, Meunier I, Davis BK, et al. Type I IFN triggers RIG-I/TLR3/NLRP3-dependent inflammasome activation in influenza A virus infected cells. *PLoS Pathog*. 2013;9(4):e1003256.
 354. Huang Y, Hua M, Cui X. Fungal β -Glucan Activates the NLRP3 Inflammasome in Human Bronchial Epithelial Cells Through ROS Production. *Inflammation*. 2018;41(1):164-173.
 355. Chow MT, Duret H, Andrews DM, et al. Type I NKT-cell-mediated TNF- α is a positive regulator of NLRP3 inflammasome priming. *Eur J Immunol*. 2014;44(7):2111-2120.
 356. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol*. 2009;183(2):787-791.
 357. Pétrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ*. 2007;14(9):1583-1589.
 358. Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G, Smith BL, Rajendiran TM, Núñez G. K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity*. 2013;38(6):1142-1153.
 359. He Y, Zeng MY, Yang D, Motro B, Núñez G. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature*. 2016;530(7590):354-357.
 360. Lee G-S, Subramanian N, Kim AI, et al. The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca²⁺ and cAMP. *Nature*. 2012;492(7427):123-127.
 361. Murakami T, Ockinger J, Yu J, et al. Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109(28):11282 LP - 11287.
 362. Tang T, Lang X, Xu C, et al. CLICs-dependent chloride efflux is an essential and proximal upstream event for NLRP3 inflammasome activation. *Nat Commun*. 2017;8(1):202.
 363. Verhoef PA, Kertesz SB, Lundberg K, Kahlenberg JM, Dubyak GR. Inhibitory effects of chloride

- on the activation of caspase-1, IL-1beta secretion, and cytolysis by the P2X7 receptor. *J Immunol.* 2005;175(11):7623-7634.
364. Moriyama M, Nagai M, Maruzuru Y, Koshiha T, Kawaguchi Y, Ichinohe T. Influenza Virus-Induced Oxidized DNA Activates Inflammasomes. *iScience.* 2020;23(7):101270.
365. Shimada K, Crother TR, Karlin J, et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity.* 2012;36(3):401-414.
366. Cruz CM, Rinna A, Forman HJ, Ventura ALM, Persechini PM, Ojcius DM. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem.* 2007;282(5):2871-2879.
367. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature.* 2011;469(7329):221-225.
368. Halle A, Hornung V, Petzold GC, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol.* 2008;9(8):857-865.
369. Ichinohe T, Pang IK, Iwasaki A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nat Immunol.* 2010;11(5):404-410.
370. Ye J, Yu M, Zhang K, et al. Tissue-specific expression pattern and histological distribution of NLRP3 in Chinese yellow chicken. *Vet Res Commun.* 2015;39(3):171-177.
371. Li R, Lin J, Hou X, et al. Characterization and Roles of Cherry Valley Duck NLRP3 in Innate Immunity During Avian Pathogenic Escherichia coli Infection. *Front Immunol.* 2018;9:2300.
372. Hoffmann H-H, Schneider WM, Rice CM. Interferons and viruses: an evolutionary arms race of molecular interactions. *Trends Immunol.* 2015;36(3):124-138.
373. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol.* 2003;4(1):63-68.
374. Kotenko S V, Gallagher G, Baurin V V, et al. IFN-lambda mediates antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol.* 2003;4(1):69-77.
375. Khaitov MR, Laza-Stanca V, Edwards MR, et al. Respiratory virus induction of alpha-, beta- and lambda-interferons in bronchial epithelial cells and peripheral blood mononuclear cells. *Allergy.* 2009;64(3):375-386.
376. Ioannidis I, Ye F, McNally B, Willette M, Flaño E. Toll-like receptor expression and induction of type I and type III interferons in primary airway epithelial cells. *J Virol.* 2013;87(6):3261-3270.
377. Santhakumar D, Rubbenstroth D, Martinez-Sobrido L, Munir M. Avian Interferons and Their Antiviral Effectors. *Front Immunol.* 2017;8:49.
378. Karpala AJ, Morris KR, Broadway MM, et al. Molecular cloning, expression, and characterization of chicken IFN-lambda. *J Interf cytokine Res Off J Int Soc Interf Cytokine Res.* 2008;28(6):341-350.
379. Kaiser P, Poh TY, Rothwell L, et al. A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines. *J Interf cytokine Res Off J Int Soc Interf Cytokine Res.* 2005;25(8):467-484.
380. Arimori Y, Nakamura R, Yamada H, et al. Type I interferon limits influenza virus-induced acute lung injury by regulation of excessive inflammation in mice. *Antiviral Res.* 2013;99(3):230-237.
381. Mäkelä SM, Österlund P, Westenius V, et al. RIG-I Signaling Is Essential for Influenza B Virus-Induced Rapid Interferon Gene Expression. Lyles DS, ed. *J Virol.* 2015;89(23):12014 LP - 12025.
382. Österlund P, Strengell M, Sarin LP, et al. Incoming Influenza A Virus Evades Early Host Recognition, while Influenza B Virus Induces Interferon Expression Directly upon Entry. *J Virol.* 2012;86(20):11183 LP - 11193.
383. Donnelly RP, Kotenko S V. Interferon-lambda: a new addition to an old family. *J Interf cytokine Res Off J Int Soc Interf Cytokine Res.* 2010;30(8):555-564.
384. Masuda Y, Matsuda A, Usui T, Sugai T, Asano A, Yamano Y. Biological effects of chicken type III interferon on expression of interferon-stimulated genes in chickens: comparison with

- type I and type II interferons. *J Vet Med Sci.* 2012;74(11):1381-1386.
385. Galani IE, Triantafyllia V, Eleminiadou E-E, et al. Interferon lambda mediates non-redundant front-line antiviral protection against Influenza virus infection without compromising host fitness. *Immunity.* 2017;46(5):875-890.e6.
386. Sommereyns C, Paul S, Staeheli P, Michiels T. IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. *PLoS Pathog.* 2008;4(3):e1000017.
387. Rusinova I, Forster S, Yu S, et al. Interferome v2.0: an updated database of annotated interferon-regulated genes. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):D1040-6.
388. Shaw AE, Hughes J, Gu Q, et al. Fundamental properties of the mammalian innate immune system revealed by multispecies comparison of type I interferon responses. Malik H, ed. *PLOS Biol.* 2017;15(12):e2004086.
389. Lindenmann J. Inheritance of resistance to influenza virus in mice. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1964;116:506-509.
390. Lindenmann J. Resistance of mice to mouse-adapted influenza A virus. *Virology.* 1962;16:203-204.
391. Dittmann J, Stertz S, Grimm D, et al. Influenza A virus strains differ in sensitivity to the antiviral action of Mx-GTPase. *J Virol.* 2008;82(7):3624-3631.
392. Ko J-H, Jin H-K, Asano A, et al. Polymorphisms and the Differential Antiviral Activity of the Chicken Mx Gene. *Genome Res.* 2002;12(4):595-601.
393. Balkissoon D, Staines K, McCauley J, et al. Low frequency of the Mx allele for viral resistance predates recent intensive selection in domestic chickens. *Immunogenetics.* 2007;59(8):687-691.
394. Benfield CTO, Lyall JW, Kochs G, Tiley LS. Asparagine 631 Variants of the Chicken Mx Protein Do Not Inhibit Influenza Virus Replication in Primary Chicken Embryo Fibroblasts or In Vitro Surrogate Assays. *J Virol.* 2008;82(15):7533 LP - 7539.
395. Schusser B, Reuter A, von der Malsburg A, et al. Mx Is Dispensable for Interferon-Mediated Resistance of Chicken Cells against Influenza A Virus. *J Virol.* 2011;85(16):8307 LP - 8315.
396. Krug RM, Shaw M, Broni B, Shapiro G, Haller O. Inhibition of influenza viral mRNA synthesis in cells expressing the interferon-induced Mx gene product. *J Virol.* 1985;56(1):201-206.
397. Allen EK, Randolph AG, Bhangale T, et al. SNP-mediated disruption of CTCF binding at the IFITM3 promoter is associated with risk of severe influenza in humans. *Nat Med.* 2017;23(8):975-983.
398. Everitt AR, Clare S, Pertel T, et al. IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza. *Nature.* 2012;484(7395):519-523.
399. Zhang Y-H, Zhao Y, Li N, et al. Interferon-induced transmembrane protein-3 genetic variant rs12252-C is associated with severe influenza in Chinese individuals. *Nat Commun.* 2013;4:1418.
400. Desai TM, Marin M, Chin CR, Savidis G, Brass AL, Melikyan GB. IFITM3 restricts influenza A virus entry by blocking the formation of fusion pores following virus-endosome hemifusion. *PLoS Pathog.* 2014;10(4):e1004048.
401. Feeley EM, Sims JS, John SP, et al. IFITM3 inhibits influenza A virus infection by preventing cytosolic entry. *PLoS Pathog.* 2011;7(10):e1002337.
402. Smith J, Smith N, Yu L, et al. A comparative analysis of host responses to avian influenza infection in ducks and chickens highlights a role for the interferon-induced transmembrane proteins in viral resistance. *BMC Genomics.* 2015;16(1):574.
403. Williams BR. PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene.* 1999;18(45):6112-6120.
404. Lu Y, Wambach M, Katze MG, Krug RM. Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. *Virology.* 1995;214(1):222-228.

405. Tan SL, Katze MG. Biochemical and genetic evidence for complex formation between the influenza A virus NS1 protein and the interferon-induced PKR protein kinase. *J Interf cytokine Res Off J Int Soc Interf Cytokine Res.* 1998;18(9):757-766.
406. Zhu J, Ghosh A, Sarkar SN. OASL-a new player in controlling antiviral innate immunity. *Curr Opin Virol.* 2015;12:15-19.
407. Wolf J, Rose-John S, Garbers C. Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine.* 2014;70(1):11-20.
408. Scheller J, Rose-John S. Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Med Microbiol Immunol.* 2006;195(4):173-183.
409. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813(5):878-888.
410. Yang M-L, Wang C-T, Yang S-J, et al. IL-6 ameliorates acute lung injury in influenza virus infection. *Sci Rep.* 2017;7:43829.
411. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity.* 2013;39(6):1003-1018.
412. Dinarello CA. The IL-1 family of cytokines and receptors in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2019;15(10):612-632.
413. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:519-550.
414. Mehta AK, Gracias DT, Croft M. TNF activity and T cells. *Cytokine.* 2018;101:14-18.
415. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel D V. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell.* 1993;74(5):845-853.
416. Wajant H, Scheurich P. TNFR1-induced activation of the classical NF- κ B pathway. *FEBS J.* 2011;278(6):862-876.
417. Valmiki MG, Ramos JW. Death effector domain-containing proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(5):814-830.
418. Negus RP. The chemokines: cytokines that direct leukocyte migration. *J R Soc Med.* 1996;89(6):312-314.
419. Broxmeyer HE. Chemokines in hematopoiesis. *Curr Opin Hematol.* 2008;15(1):49-58.
420. Mehrad B, Keane MP, Strieter RM. Chemokines as mediators of angiogenesis. *Thromb Haemost.* 2007;97(5):755-762.
421. Kremer KN, Peterson KL, Schneider PA, et al. CXCR4 Chemokine Receptor Signaling Induces Apoptosis in Acute Myeloid Leukemia Cells via Regulation of the Bcl-2 Family Members Bcl-X_L, Noxa, and Bak *. *J Biol Chem.* 2013;288(32):22899-22914.
422. Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:659-702.
423. Lepidi H, Zaffran Y, Ansaldi JL, Mege JL, Capo C. Morphological polarization of human polymorphonuclear leucocytes in response to three different chemoattractants: an effector response independent of calcium rise and tyrosine kinases. *J Cell Sci.* 1995;108 (Pt 4):1771-1778.
424. Pribila JT, Shimizu Y. Signal transduction events regulating integrin function and T cell migration: new functions and complexity. *Immunol Res.* 2003;27(1):107-128.
425. Mestas J, Hughes CCW. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J Immunol.* 2004;172(5):2731 LP - 2738.
426. Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol.* 2011;12(11):1035-1044.
427. Borregaard N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity.* 2010;33(5):657-670.
428. Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G, et al. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood.* 1994;84(6):1737-1746.

429. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-1535.
430. Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: development and tissue specialization. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:643-675.
431. Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science*. 1998;282(5388):480-483.
432. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(12):953-964.
433. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:593-623.
434. Muntjewerff EM, Meesters LD, van den Bogaart G. Antigen Cross-Presentation by Macrophages. *Front Immunol*. 2020;11:1276.
435. Wang JP, Bowen GN, Padden C, et al. Toll-like receptor-mediated activation of neutrophils by influenza A virus. *Blood*. 2008;112(5):2028-2034.
436. Tecchio C, Micheletti A, Cassatella MA. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Front Immunol*. 2014;5:508.
437. Pirhonen J, Sareneva T, Kurimoto M, Julkunen I, Matikainen S. Virus infection activates IL-1 beta and IL-18 production in human macrophages by a caspase-1-dependent pathway. *J Immunol*. 1999;162(12):7322-7329.
438. Cheung CY, Poon LLM, Lau AS, et al. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? *Lancet (London, England)*. 2002;360(9348):1831-1837.
439. Fujisawa H. Neutrophils play an essential role in cooperation with antibody in both protection against and recovery from pulmonary infection with influenza virus in mice. *J Virol*. 2008;82(6):2772-2783.
440. Tate MD, Deng Y-M, Jones JE, Anderson GP, Brooks AG, Reading PC. Neutrophils Ameliorate Lung Injury and the Development of Severe Disease during Influenza Infection. *J Immunol*. 2009;183(11):7441 LP - 7450.
441. Smith CA, Tyrell DJ, Kulkarni UA, et al. Macrophage migration inhibitory factor enhances influenza-associated mortality in mice. *JCI insight*. 2019;4(13).
442. Narasaraju T, Yang E, Samy RP, et al. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *Am J Pathol*. 2011;179(1):199-210.
443. Tang BM, Shojaei M, Teoh S, et al. Neutrophils-related host factors associated with severe disease and fatality in patients with influenza infection. *Nat Commun*. 2019;10(1):3422.
444. Short KR, Kroeze EJBV, Fouchier RAM, Kuiken T. Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(1):57-69.
445. Dawson TC, Beck MA, Kuziel WA, Henderson F, Maeda N. Contrasting effects of CCR5 and CCR2 deficiency in the pulmonary inflammatory response to influenza A virus. *Am J Pathol*. 2000;156(6):1951-1959.
446. Bradley LM, Douglass MF, Chatterjee D, Akira S, Baaten BJG. Matrix metalloprotease 9 mediates neutrophil migration into the airways in response to influenza virus-induced toll-like receptor signaling. *PLoS Pathog*. 2012;8(4):e1002641.
447. Kaufmann A, Salentin R, Meyer RG, et al. Defense against influenza A virus infection: essential role of the chemokine system. *Immunobiology*. 2001;204(5):603-613.
448. Lam WY, Yeung ACM, Chu IMT, Chan PKS. Profiles of cytokine and chemokine gene expression in human pulmonary epithelial cells induced by human and avian influenza viruses. *Virology*. 2010;7:344.
449. Cabon L, Martinez-Torres A-C, Susin SA. Programmed cell death comes in many flavors. *Med Sci (Paris)*. 2013;29(12):1117-1124.

450. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.
451. Walczak H, Krammer PH. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res.* 2000;256(1):58-66.
452. Wang S, El-Deiry WS. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene.* 2003;22(53):8628-8633.
453. Yi X, Yin X-M, Dong Z. Inhibition of Bid-induced Apoptosis by Bcl-2. *J Biol Chem.* 2003;278(19):16992-16999.
454. Bock FJ, Tait SWG. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(2):85-100.
455. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet (London, England).* 1967;2(7511):319-323.
456. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 2000;342(18):1334-1349.
457. Bellani G, Laffey JG, Pham T, et al. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *JAMA.* 2016;315(8):788-800.
458. Bautista E, Chotpitayasunondh T, Gao Z, et al. Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection. *N Engl J Med.* 2010;362(18):1708-1719.
459. Kash JC, Tumpey TM, Proll SC, et al. Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918 influenza virus. *Nature.* 2006;443(7111):578-581.
460. Thomas PG, Dash P, Aldridge JRJ, et al. The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1. *Immunity.* 2009;30(4):566-575.
461. Allen IC, Scull MA, Moore CB, et al. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity.* 2009;30(4):556-565.
462. Ichinohe T, Lee HK, Ogura Y, Flavell R, Iwasaki A. Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. *J Exp Med.* 2009;206(1):79-87.
463. Tate MD, Ong JDH, Dowling JK, et al. Reassessing the role of the NLRP3 inflammasome during pathogenic influenza A virus infection via temporal inhibition. *Sci Rep.* 2016;6:27912.
464. Dolinay T, Kim YS, Howrylak J, et al. Inflammasome-regulated cytokines are critical mediators of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(11):1225-1234.
465. Brand JD, Lazrak A, Trombley JE, et al. Influenza-mediated reduction of lung epithelial ion channel activity leads to dysregulated pulmonary fluid homeostasis. *JCI insight.* 2018;3(20).
466. Golebiewski L, Liu H, Javier RT, Rice AP. The avian influenza virus NS1 ESEV PDZ binding motif associates with Dlg1 and Scribble to disrupt cellular tight junctions. *J Virol.* 2011;85(20):10639-10648.
467. Mauad T, Hajjar LA, Callegari GD, et al. Lung pathology in fatal novel human influenza A (H1N1) infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;181(1):72-79.
468. Uiprasertkul M, Kitphati R, Puthavathana P, et al. Apoptosis and pathogenesis of avian influenza A (H5N1) virus in humans. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(5):708-712.
469. Armstrong SM, Wang C, Tigdi J, et al. Influenza Infects Lung Microvascular Endothelium Leading to Microvascular Leak: Role of Apoptosis and Claudin-5. *PLoS One.* 2012;7(10):e47323.
470. Short KR, Veldhuis Kroeze EJB, Reperant LA, Richard M, Kuiken T. Influenza virus and endothelial cells: a species specific relationship. *Front Microbiol.* 2014;5:653.
471. Rivera J, Proia RL, Olivera A. The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(10):753-763.
472. Teijaro JR, Walsh KB, Cahalan S, et al. Endothelial cells are central orchestrators of cytokine amplification during influenza virus infection. *Cell.* 2011;146(6):980-991.

473. Rice TW, Rubinson L, Uyeki TM, et al. Critical illness from 2009 pandemic influenza A virus and bacterial coinfection in the United States. *Crit Care Med*. 2012;40(5):1487-1498.
474. Gill JR, Sheng Z-M, Ely SF, et al. Pulmonary pathologic findings of fatal 2009 pandemic influenza A/H1N1 viral infections. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134(2):235-243.
475. Blyth CC, Webb SAR, Kok J, et al. The impact of bacterial and viral co-infection in severe influenza. *Influenza Other Respi Viruses*. 2013;7(2):168-176.
476. Ong JDH, Mansell A, Tate MD. Hero turned villain: NLRP3 inflammasome-induced inflammation during influenza A virus infection. *J Leukoc Biol*. 2017;101(4):863-874.
477. Orr HA. Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nat Rev Genet*. 2009;10(8):531-539.
478. Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol*. 1997;51:151-178.
479. Stewart AD, Logsdon JM, Kelley SE. An empirical study of the evolution of virulence under both horizontal and vertical transmission. *Evolution*. 2005;59(4):730-739.
480. Wargo AR, Garver KA, Kurath G. Virulence correlates with fitness in vivo for two M group genotypes of Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Virology*. 2010;404(1):51-58.
481. Geoghegan JL, Senior AM, Di Giallonardo F, Holmes EC. Virological factors that increase the transmissibility of emerging human viruses. *Proc Natl Acad Sci*. 2016;113(15):4170 LP - 4175.
482. Anderson RM, May RM. The population dynamics of microparasites and their invertebrate hosts. *Philos Trans R Soc London B, Biol Sci*. 1981;291(1054):451-524.
483. Kozak M. Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res*. 1981;9(20):5233-5252.
484. Košík I, Práznovská M, Košíková M, et al. The ubiquitination of the influenza A virus PB1-F2 protein is crucial for its biological function. *PLoS One*. 2015;10(4):e0118477.
485. Zell R, Krumbholz A, Eitner A, Krieg R, Halbhauer K-J, Wutzler P. Prevalence of PB1-F2 of influenza A viruses. *J Gen Virol*. 2007;88(Pt 2):536-546.
486. Kamal RP, Kumar A, Davis CT, et al. Emergence of Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Virus PB1-F2 Variants and Their Virulence in BALB/c Mice. *J Virol*. 2015;89(11):5835-5846.
487. Yamada H, Chounan R, Higashi Y, Kurihara N, Kido H. Mitochondrial targeting sequence of the influenza A virus PB1-F2 protein and its function in mitochondria. *FEBS Lett*. 2004;578(3):331-336.
488. James J, Howard W, Iqbal M, Nair VK, Barclay WS, Shelton H. Influenza A virus PB1-F2 protein prolongs viral shedding in chickens lengthening the transmission window. *J Gen Virol*. 2016;97(10):2516-2527.
489. Pasricha G, Mishra AC, Chakrabarti AK. Comprehensive global amino acid sequence analysis of PB1F2 protein of influenza A H5N1 viruses and the influenza A virus subtypes responsible for the 20th-century pandemics. *Influenza Other Respi Viruses*. 2013;7(4):497-505.
490. Lee D-H, Bertran K, Kwon J-H, Swayne DE. Evolution, global spread, and pathogenicity of highly pathogenic avian influenza H5Nx clade 2.3.4.4. *J Vet Sci*. 2017;18(S1):269-280.
491. Gaide N, Foret-Lucas C, Figueroa T, et al. Viral tropism and detection of clade 2.3.4.4b H5N8 highly pathogenic avian influenza viruses in feathers of ducks and geese. *Sci Rep*. 2021;11(1):5928.
492. Puranik A, Slomka MJ, Warren CJ, et al. Transmission dynamics between infected waterfowl and terrestrial poultry: Differences between the transmission and tropism of H5N8 highly pathogenic avian influenza virus (clade 2.3.4.4a) among ducks, chickens and turkeys. *Virology*. 2020;541:113-123.
493. Leyson C, Youk S-S, Smith D, et al. Pathogenicity and genomic changes of a 2016 European H5N8 highly pathogenic avian influenza virus (clade 2.3.4.4) in experimentally infected mallards and chickens. *Virology*. 2019;537:172-185.
494. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 2009;325(5937):197-201.

495. McAuley J, Deng Y-M, Gilbertson B, Mackenzie-Kludas C, Barr I, Brown L. Rapid evolution of the PB1-F2 virulence protein expressed by human seasonal H3N2 influenza viruses reduces inflammatory responses to infection. *Virology*. 2017;14(1):162.
496. Leymarie O, Embury-Hyatt C, Chevalier C, et al. PB1-F2 attenuates virulence of highly pathogenic avian H5N1 influenza virus in chickens. *PLoS One*. 2014;9(6):e100679.
497. Marjuki H, Scholtissek C, Franks J, et al. Three amino acid changes in PB1-F2 of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus affect pathogenicity in mallard ducks. *Arch Virol*. 2010;155(6):925-934.
498. Le Goffic R, Leymarie O, Chevalier C, et al. Transcriptomic analysis of host immune and cell death responses associated with the influenza A virus PB1-F2 protein. *PLoS Pathog*. 2011;7(8):e1002202.
499. Vidy A, Maisonnasse P, Da Costa B, Delmas B, Chevalier C, Le Goffic R. The Influenza Virus Protein PB1-F2 Increases Viral Pathogenesis through Neutrophil Recruitment and NK Cells Inhibition. *PLoS One*. 2016;11(10):e0165361.
500. Leymarie O, Jouvion G, Hervé P-L, et al. Kinetic characterization of PB1-F2-mediated immunopathology during highly pathogenic avian H5N1 influenza virus infection. *PLoS One*. 2013;8(3):e57894.
501. Conenello GM, Zamarin D, Perrone LA, Tumpey T, Palese P. A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathog*. 2007;3(10):1414-1421.
502. Conenello GM, Tisoncik JR, Rosenzweig E, Varga ZT, Palese P, Katze MG. A single N66S mutation in the PB1-F2 protein of influenza A virus increases virulence by inhibiting the early interferon response in vivo. *J Virol*. 2011;85(2):652-662.
503. Alymova I V, Green AM, van de Velde N, et al. Immunopathogenic and antibacterial effects of H3N2 influenza A virus PB1-F2 map to amino acid residues 62, 75, 79, and 82. *J Virol*. 2011;85(23):12324-12333.
504. Hai R, Schmolke M, Varga ZT, et al. PB1-F2 expression by the 2009 pandemic H1N1 influenza virus has minimal impact on virulence in animal models. *J Virol*. 2010;84(9):4442-4450.
505. Meunier I, von Messling V. PB1-F2 modulates early host responses but does not affect the pathogenesis of H1N1 seasonal influenza virus. *J Virol*. 2012;86(8):4271-4278.
506. Alymova I V, Samarasinghe A, Vogel P, Green AM, Weinlich R, McCullers JA. A novel cytotoxic sequence contributes to influenza A viral protein PB1-F2 pathogenicity and predisposition to secondary bacterial infection. *J Virol*. 2014;88(1):503-515.
507. McAuley JL, Chipuk JE, Boyd KL, Van De Velde N, Green DR, McCullers JA. PB1-F2 proteins from H5N1 and 20 century pandemic influenza viruses cause immunopathology. *PLoS Pathog*. 2010;6(7):e1001014.
508. Pinar A, Dowling JK, Bitto NJ, et al. PB1-F2 Peptide Derived from Avian Influenza A Virus H7N9 Induces Inflammation via Activation of the NLRP3 Inflammasome. *J Biol Chem*. 2017;292(3):826-836.
509. Gibbs JS, Malide D, Hornung F, Bennink JR, Yewdell JW. The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function. *J Virol*. 2003;77(13):7214-7224.
510. James J, Smith N, Ross C, et al. The cellular localization of avian influenza virus PB1-F2 protein alters the magnitude of IFN2 promoter and NFκB-dependent promoter antagonism in chicken cells. *J Gen Virol*. 2019;100(3):414-430.
511. Yoshizumi T, Ichinohe T, Sasaki O, et al. Influenza A virus protein PB1-F2 translocates into mitochondria via Tom40 channels and impairs innate immunity. *Nat Commun*. 2014;5:4713.
512. Chanturiya AN, Basañez G, Schubert U, Henklein P, Yewdell JW, Zimmerberg J. PB1-F2, an influenza A virus-encoded proapoptotic mitochondrial protein, creates variably sized pores in planar lipid membranes. *J Virol*. 2004;78(12):6304-6312.

513. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997;91(4):479-489.
514. Zamarin D, García-Sastre A, Xiao X, Wang R, Palese P. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog*. 2005;1(1):e4.
515. Maes ME, Grosser JA, Fehrman RL, Schlamp CL, Nickells RW. Completion of BAX recruitment correlates with mitochondrial fission during apoptosis. *Sci Rep*. 2019;9(1):16565.
516. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol*. 1997;139(5):1281-1292.
517. Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(8):3668-3672.
518. Koshiba T, Yasukawa K, Yanagi Y, Kawabata S. Mitochondrial membrane potential is required for MAVS-mediated antiviral signaling. *Sci Signal*. 2011;4(158):ra7.
519. Varga ZT, Grant A, Manicassamy B, Palese P. Influenza virus protein PB1-F2 inhibits the induction of type I interferon by binding to MAVS and decreasing mitochondrial membrane potential. *J Virol*. 2012;86(16):8359-8366.
520. Cheung P-HH, Lee T-WT, Kew C, et al. Virus subtype-specific suppression of MAVS aggregation and activation by PB1-F2 protein of influenza A (H7N9) virus. *PLoS Pathog*. 2020;16(6):e1008611.
521. Leymarie O, Meyer L, Tafforeau L, et al. Influenza virus protein PB1-F2 interacts with CALCOCO2 (NDP52) to modulate innate immune response. *J Gen Virol*. 2017;98(6):1196-1208.
522. Park E-S, Byun YH, Park S, et al. Co-degradation of interferon signaling factor DDX3 by PB1-F2 as a basis for high virulence of 1918 pandemic influenza. *EMBO J*. 2019;38(10).
523. Dudek SE, Wixler L, Nordhoff C, et al. The influenza virus PB1-F2 protein has interferon antagonistic activity. *Biol Chem*. 2011;392(12):1135-1144.
524. Le Goffic R, Bouguyon E, Chevalier C, et al. Influenza A virus protein PB1-F2 exacerbates IFN-beta expression of human respiratory epithelial cells. *J Immunol*. 2010;185(8):4812-4823.
525. Reis AL, McCauley JW. The influenza virus protein PB1-F2 interacts with IKKβ and modulates NF-κB signalling. *PLoS One*. 2013;8(5):e63852.
526. Yap S V, Koontz JM, Kontrogianni-Konstantopoulos A. HAX-1: a family of apoptotic regulators in health and disease. *J Cell Physiol*. 2011;226(11):2752-2761.
527. Hsu W-B, Shih J-L, Shih J-R, et al. Cellular protein HAX1 interacts with the influenza A virus PA polymerase subunit and impedes its nuclear translocation. *J Virol*. 2013;87(1):110-123.
528. Mazel-Sanchez B, Boal-Carvalho I, Silva F, Dijkman R, Schmolke M. H5N1 Influenza A Virus PB1-F2 Relieves HAX-1-Mediated Restriction of Avian Virus Polymerase PA in Human Lung Cells. *J Virol*. 2018;92(11).
529. Li X, Qu B, He G, Cardona CJ, Song Y, Xing Z. Critical Role of HAX-1 in Promoting Avian Influenza Virus Replication in Lung Epithelial Cells. *Mediators Inflamm*. 2018;2018:3586132.
530. Mitzner D, Dudek SE, Studtrucker N, et al. Phosphorylation of the influenza A virus protein PB1-F2 by PKC is crucial for apoptosis promoting functions in monocytes. *Cell Microbiol*. 2009;11(10):1502-1516.
531. Chen C-J, Chen G-W, Wang C-H, Huang C-H, Wang Y-C, Shih S-R. Differential localization and function of PB1-F2 derived from different strains of influenza A virus. *J Virol*. 2010;84(19):10051-10062.
532. Chang P, Kuchipudi S V, Mellits KH, et al. Early apoptosis of porcine alveolar macrophages limits avian influenza virus replication and pro-inflammatory dysregulation. *Sci Rep*. 2015;5:17999.
533. Jaworska J, Coulombe F, Downey J, et al. NLRX1 prevents mitochondrial induced apoptosis and enhances macrophage antiviral immunity by interacting with influenza virus PB1-F2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(20):E2110-9.

534. McAuley JL, Tate MD, MacKenzie-Kludas CJ, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by IAV virulence protein PB1-F2 contributes to severe pathophysiology and disease. *PLoS Pathog.* 2013;9(5):e1003392.
535. Boal-Carvalho I, Mazel-Sanchez B, Silva F, et al. Influenza A viruses limit NLRP3-NEK7-complex formation and pyroptosis in human macrophages. *EMBO Rep.* 2020;21(12):e50421.
536. Cheung P-HH, Ye Z-W, Lee T-WT, Chen H, Chan C-P, Jin D-Y. PB1-F2 protein of highly pathogenic influenza A (H7N9) virus selectively suppresses RNA-induced NLRP3 inflammasome activation through inhibition of MAVS-NLRP3 interaction. *J Leukoc Biol.* 2020;108(5):1655-1663.
537. Zamarin D, Ortigoza MB, Palese P. Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. *J Virol.* 2006;80(16):7976-7983.
538. Bruns K, Studtrucker N, Sharma A, et al. Structural characterization and oligomerization of PB1-F2, a proapoptotic influenza A virus protein. *J Biol Chem.* 2007;282(1):353-363.
539. Chevalier C, Al Bazzal A, Vidic J, et al. PB1-F2 influenza A virus protein adopts a beta-sheet conformation and forms amyloid fibers in membrane environments. *J Biol Chem.* 2010;285(17):13233-13243.
540. Vidic J, Richard C-A, Péchoux C, et al. Amyloid Assemblies of Influenza A Virus PB1-F2 Protein Damage Membrane and Induce Cytotoxicity. *J Biol Chem.* 2016;291(2):739-751.
541. Miodek A, Vidic J, Sauriat-Dorizon H, et al. Electrochemical detection of the oligomerization of PB1-F2 influenza A virus protein in infected cells. *Anal Chem.* 2014;86(18):9098-9105.
542. Chevalier C, Le Goffic R, Jamme F, Leymarie O, Réfrégiers M, Delmas B. Synchrotron Infrared and Deep UV Fluorescent Microspectroscopy Study of PB1-F2 β -Aggregated Structures in Influenza A Virus-infected Cells. *J Biol Chem.* 2016;291(17):9060-9072.
543. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J Infect Dis.* 2008;198(7):962-970.
544. McAuley JL, Hornung F, Boyd KL, et al. Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell Host Microbe.* 2007;2(4):240-249.
545. Esnault E, Bonsergent C, Larcher T, et al. A novel chicken lung epithelial cell line: characterization and response to low pathogenicity avian influenza virus. *Virus Res.* 2011;159(1):32-42.
546. Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;97(11):6108 LP - 6113.
547. Tran V, Moser LA, Poole DS, Mehle A. Highly sensitive real-time in vivo imaging of an influenza reporter virus reveals dynamics of replication and spread. *J Virol.* 2013;87(24):13321-13329.
548. Donnelly MLL, Hughes LE, Luke G, et al. The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences. *J Gen Virol.* 2001;82(Pt 5):1027-1041.
549. Muramoto Y, Takada A, Fujii K, et al. Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *J Virol.* 2006;80(5):2318-2325.
550. Liang Y, Huang T, Ly H, Parslow TG, Liang Y. Mutational analyses of packaging signals in influenza virus PA, PB1, and PB2 genomic RNA segments. *J Virol.* 2008;82(1):229-236.
551. Liang Y, Hong Y, Parslow TG. cis-Acting packaging signals in the influenza virus PB1, PB2, and PA genomic RNA segments. *J Virol.* 2005;79(16):10348-10355.
552. Roux KJ, Kim DI, Raida M, Burke B. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol.* 2012;196(6):801-810.
553. Samols D, Thornton CG, Murtif VL, Kumar GK, Haase FC, Wood HG. Evolutionary conservation

- among biotin enzymes. *J Biol Chem*. 1988;263(14):6461-6464.
554. Chapman-Smith A, Cronan JEJ. Molecular biology of biotin attachment to proteins. *J Nutr*. 1999;129(2S Suppl):477S-484S.
555. Green NM. Avidin. 1. The use of (14-C)biotin for kinetic studies and for assay. *Biochem J*. 1963;89(3):585-591.
556. Fall RR. Analysis of microbial biotin proteins. *Methods Enzymol*. 1979;62:390-398.
557. Chandler CS, Ballard FJ. Regulation of the breakdown rates of biotin-containing proteins in Swiss 3T3-L1 cells. *Biochem J*. 1988;251(3):749-755.
558. Wilson KP, Shewchuk LM, Brennan RG, Otsuka AJ, Matthews BW. Escherichia coli biotin holoenzyme synthetase/bio repressor crystal structure delineates the biotin- and DNA-binding domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(19):9257-9261.
559. Eisenberg MA, Prakash O, Hsiung SC. Purification and properties of the biotin repressor. A bifunctional protein. *J Biol Chem*. 1982;257(24):15167-15173.
560. Choi-Rhee E, Schulman H, Cronan JE. Promiscuous protein biotinylation by Escherichia coli biotin protein ligase. *Protein Sci*. 2004;13(11):3043-3050.
561. Kim DI, Birendra KC, Zhu W, Motamedchaboki K, Doye V, Roux KJ. Probing nuclear pore complex architecture with proximity-dependent biotinylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(24):E2453-61.
562. Kwon K, Streaker ED, Ruparelia S, Beckett D. Multiple disordered loops function in corepressor-induced dimerization of the biotin repressor. *J Mol Biol*. 2000;304(5):821-833.
563. Roux KJ, Kim DI, Burke B, May DG. BioID: A Screen for Protein-Protein Interactions. *Curr Protoc protein Sci*. 2018;91:19.23.1-19.23.15.
564. Bhushan J, Radke JB, Perng Y-C, et al. ISG15 Connects Autophagy and IFN- γ -Dependent Control of Toxoplasma gondii Infection in Human Cells. *MBio*. 2020;11(5).
565. Te Molder L, Hoekman L, Kreft M, Bleijerveld O, Sonnenberg A. Comparative interactomics analysis reveals potential regulators of $\alpha 6\beta 4$ distribution in keratinocytes. *Biol Open*. 2020;9(8).
566. Sanderson MR, Badior KE, Fahlman RP, Wevrick R. The necdin interactome: evaluating the effects of amino acid substitutions and cell stress using proximity-dependent biotinylation (BioID) and mass spectrometry. *Hum Genet*. 2020;139(12):1513-1529.
567. Koshiha T, Kosako H. Mass spectrometry-based methods for analysing the mitochondrial interactome in mammalian cells. *J Biochem*. 2020;167(3):225-231.
568. Kim DI, Jensen SC, Noble KA, et al. An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling. *Mol Biol Cell*. 2016;27(8):1188-1196.
569. Wise HM, Barbezange C, Jagger BW, et al. Overlapping signals for translational regulation and packaging of influenza A virus segment 2. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(17):7775-7790.
570. Meyer L, Leymarie O, Chevalier C, et al. Transcriptomic profiling of a chicken lung epithelial cell line (CLEC213) reveals a mitochondrial respiratory chain activity boost during influenza virus infection. *PLoS One*. 2017;12(4):e0176355.
571. Tannous BA, Kim D-E, Fernandez JL, Weissleder R, Breakefield XO. Codon-optimized Gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo. *Mol Ther*. 2005;11(3):435-443.
572. Fodor E, Smith M. The PA subunit is required for efficient nuclear accumulation of the PB1 subunit of the influenza A virus RNA polymerase complex. *J Virol*. 2004;78(17):9144-9153.
573. Martínez-Sobrido L, Cadagan R, Steel J, et al. Hemagglutinin-Pseudotyped Green Fluorescent Protein-Expressing Influenza Viruses for the Detection of Influenza Virus Neutralizing Antibodies. *J Virol*. 2010;84(4):2157 LP - 2163.
574. Zhao S, Wang L, Zhang C, et al. Inhibitor of growth 3 induces cell death by regulating cell proliferation, apoptosis and cell cycle arrest by blocking the PI3K/AKT pathway. *Cancer Gene Ther*. 2018;25(9-10):240-247.

575. DenBoer LM, Hardy-Smith PW, Hogan MR, Cockram GP, Audas TE, Lu R. Luman is capable of binding and activating transcription from the unfolded protein response element. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;331(1):113-119.
576. Ren L, Zhang W, Han P, et al. Influenza A virus (H1N1) triggers a hypoxic response by stabilizing hypoxia-inducible factor-1 α via inhibition of proteasome. *Virology.* 2019;530:51-58.
577. Wu X, Huang W, Luo G, Alain LA. Hypoxia induces connexin 43 dysregulation by modulating matrix metalloproteinases via MAPK signaling. *Mol Cell Biochem.* 2013;384(1-2):155-162.
578. Naiki H, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal Biochem.* 1989;177(2):244-249.
579. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2(1):17023.
580. Hall MP, Unch J, Binkowski BF, et al. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chem Biol.* 2012;7(11):1848-1857.
581. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(10):a016295.
582. Taub DD, Sayers TJ, Carter CR, Ortaldo JR. Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity. *J Immunol.* 1995;155(8):3877 LP - 3888.
583. Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(10):787-799.
584. Bennouna S, Bliss SK, Curiel TJ, Denkers EY. Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J Immunol.* 2003;171(11):6052-6058.
585. Chen H, Wu S, Lu R, Zhang Y, Zheng Y, Sun J. Pulmonary Permeability Assessed by Fluorescent-Labeled Dextran Instilled Intranasally into Mice with LPS-Induced Acute Lung Injury. *PLoS One.* 2014;9(7):e101925.
586. Schiapparelli LM, McClatchy DB, Liu H-H, Sharma P, Yates JR 3rd, Cline HT. Direct detection of biotinylated proteins by mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2014;13(9):3966-3978.
587. Dubois J, Traversier A, Julien T, et al. The Nonstructural NS1 Protein of Influenza Viruses Modulates TP53 Splicing through Host Factor CPSF4. *J Virol.* 2019;93(7).
588. de Chasse B, Aublin-Gex A, Ruggieri A, et al. The interactomes of influenza virus NS1 and NS2 proteins identify new host factors and provide insights for ADAR1 playing a supportive role in virus replication. *PLoS Pathog.* 2013;9(7):e1003440.
589. Pyrih J, Rašková V, Škodová-Sveráková I, Pánek T, Lukeš J. ZapE/Afg1 interacts with Oxa1 and its depletion causes a multifaceted phenotype. *PLoS One.* 2020;15(6):e0234918.
590. Redwine WB, DeSantis ME, Hollyer I, et al. The human cytoplasmic dynein interactome reveals novel activators of motility. *Elife.* 2017;6.
591. Dendoncker K, Timmermans S, Vandewalle J, et al. TNF- α inhibits glucocorticoid receptor-induced gene expression by reshaping the GR nuclear cofactor profile. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(26):12942-12951.
592. Rider MA, Cheerathodi MR, Hurwitz SN, et al. The interactome of EBV LMP1 evaluated by proximity-based BioID approach. *Virology.* 2018;516:55-70.
593. Kuo RI, Tseng E, Eory L, Paton IR, Archibald AL, Burt DW. Normalized long read RNA sequencing in chicken reveals transcriptome complexity similar to human. *BMC Genomics.* 2017;18(1):323.
594. Whelan JT, Hollis SE, Cha DS, Asch AS, Lee M-H. Post-transcriptional regulation of the Ras-ERK/MAPK signaling pathway. *J Cell Physiol.* 2012;227(3):1235-1241.
595. Meng Z, Moroishi T, Guan K-L. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev.* 2016;30(1):1-17.
596. Kasof GM, Goyal L, White E. Btf, a novel death-promoting transcriptional repressor that interacts with Bcl-2-related proteins. *Mol Cell Biol.* 1999;19(6):4390-4404.

597. van Gent M, Sparrer KMJ, Gack MU. TRIM Proteins and Their Roles in Antiviral Host Defenses. *Annu Rev Virol.* 2018;5(1):385-405.
598. Aitken A. 14-3-3 proteins: a historic overview. *Semin Cancer Biol.* 2006;16(3):162-172.
599. Wang W, Shakes DC. Molecular evolution of the 14-3-3 protein family. *J Mol Evol.* 1996;43(4):384-398.
600. Stefansson B, Brautigan DL. Protein phosphatase 6 subunit with conserved Sit4-associated protein domain targets IkappaBepsilon. *J Biol Chem.* 2006;281(32):22624-22634.
601. Burian M, Schitteck B. The secrets of dermcidin action. *Int J Med Microbiol.* 2015;305(2):283-286.
602. Markadieu N, Delpire E. Physiology and pathophysiology of SLC12A1/2 transporters. *Pflugers Arch.* 2014;466(1):91-105.
603. Obsil T, Obsilova V. Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Semin Cell Dev Biol.* 2011;22(7):663-672.
604. Madeira F, Tinti M, Murugesan G, et al. 14-3-3-Pred: improved methods to predict 14-3-3-binding phosphopeptides. *Bioinformatics.* 2015;31(14):2276-2283.
605. Yuan R, Liang L, Wu J, et al. Human infection with an avian influenza A/H9N2 virus in Guangdong in 2016. *J Infect.* 2017;74(4):422-425.
606. He J, Wu Q, Yu J-L, et al. Sporadic occurrence of H9N2 avian influenza infections in human in Anhui province, eastern China: A notable problem. *Microb Pathog.* 2020;140:103940.
607. Felices M, Falk M, Kosaka Y, Berg LJ. Tec kinases in T cell and mast cell signaling. *Adv Immunol.* 2007;93:145-184.
608. Andreotti AH, Schwartzberg PL, Joseph RE, Berg LJ. T-cell signaling regulated by the Tec family kinase, Itk. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(7):a002287.
609. Wang Y, Hu Y, Wang F, Liu S, Wang YJ, Chen XL. Role and mechanism of nonreceptor tyrosine kinase Tec in endotoxin/lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production in human alveolar epithelial cells A549. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* 2019;35(8):580-586.
610. Gschwandtner M, Strutzmann E, Teixeira MM, et al. Glycosaminoglycans are important mediators of neutrophilic inflammation in vivo. *Cytokine.* 2017;91:65-73.
611. Misra JR, Irvine KD. The Hippo Signaling Network and Its Biological Functions. *Annu Rev Genet.* 2018;52:65-87.
612. Taye B, Chen H, Yeo DS-Y, et al. A System Based-Approach to Examine Host Response during Infection with Influenza A Virus Subtype H7N9 in Human and Avian Cells. *Cells.* 2020;9(2).
613. Ma L-L, Sun Z-H, Xu Y-L, et al. Screening host proteins required for bacterial adherence after H9N2 virus infection. *Vet Microbiol.* 2018;213:5-14.
614. Weeks-Gorospe JN, Hurtig HR, Iverson AR, et al. Naturally occurring swine influenza A virus PB1-F2 phenotypes that contribute to superinfection with Gram-positive respiratory pathogens. *J Virol.* 2012;86(17):9035-9043.
615. Schitteck B, Hipfel R, Sauer B, et al. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat Immunol.* 2001;2(12):1133-1137.
616. Senyürek I, Paulmann M, Sinnberg T, et al. Dermcidin-derived peptides show a different mode of action than the cathelicidin LL-37 against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(6):2499 LP - 2509.
617. Wang B, Yurecko RS, Dedhar S, Cleary PP. Integrin-linked kinase is an essential link between integrins and uptake of bacterial pathogens by epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2006;8(2):257-266.
618. Auriemma C, Viscardi M, Tafuri S, et al. Integrin receptors play a role in the internalin B-dependent entry of *Listeria monocytogenes* into host cells. *Cell Mol Biol Lett.* 2010;15(3):496-506.
619. Borisova M, Shi Y, Buntru A, Wörner S, Ziegler WH, Hauck CR. Integrin-mediated internalization of *Staphylococcus aureus* does not require vinculin. *BMC Cell Biol.* 2013;14:2.

620. Cai T, Lei QY, Wang LY, Zha XL. TGF-beta 1 modulated the expression of alpha 5 beta 1 integrin and integrin-mediated signaling in human hepatocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;274(2):519-525.
621. Li N, Ren A, Wang X, et al. Influenza viral neuraminidase primes bacterial coinfection through TGF- β -mediated expression of host cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(1):238-243.
622. Ballone A, Centorrino F, Ottmann C. 14-3-3: A Case Study in PPI Modulation. *Molecules.* 2018;23(6).
623. Rubio MP, Geraghty KM, Wong BHC, et al. 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking. *Biochem J.* 2004;379(2):395-408.
624. Riedl W, Acharya D, Lee J-H, et al. Zika Virus NS3 Mimics a Cellular 14-3-3-Binding Motif to Antagonize RIG-I- and MDA5-Mediated Innate Immunity. *Cell Host Microbe.* 2019;26(4):493-503.e6.
625. Surjit M, Kumar R, Mishra RN, Reddy MK, Chow VTK, Lal SK. The severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein is phosphorylated and localizes in the cytoplasm by 14-3-3-mediated translocation. *J Virol.* 2005;79(17):11476-11486.
626. Bolton DL, Barnitz RA, Sakai K, Lenardo MJ. 14-3-3 theta binding to cell cycle regulatory factors is enhanced by HIV-1 Vpr. *Biol Direct.* 2008;3:17.
627. Lee SK, Park SO, Joe CO, Kim YS. Interaction of HCV core protein with 14-3-3epsilon protein releases Bax to activate apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;352(3):756-762.
628. Pei Z, Harrison MS, Schmitt AP. Parainfluenza virus 5 m protein interaction with host protein 14-3-3 negatively affects virus particle formation. *J Virol.* 2011;85(5):2050-2059.
629. Han S-I, Kawano M-A, Ishizu K-I, et al. Rep68 protein of adeno-associated virus type 2 interacts with 14-3-3 proteins depending on phosphorylation at serine 535. *Virology.* 2004;320(1):144-155.
630. Nathan KG, Lal SK. The Multifarious Role of 14-3-3 Family of Proteins in Viral Replication. *Viruses.* 2020;12(4).
631. Nomura M, Shimizu S, Sugiyama T, et al. 14-3-3 Interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax. *J Biol Chem.* 2003;278(3):2058-2065.
632. Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem.* 2001;276(15):11615-11623.
633. Saito M, Korsmeyer SJ, Schlesinger PH. BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat Cell Biol.* 2000;2(8):553-555.
634. Breuss JM, Gallo J, DeLisser HM, et al. Expression of the beta 6 integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling. *J Cell Sci.* 1995;108 (Pt 6):2241-2251.
635. Meliopoulos VA, Van de Velde L-A, Van de Velde NC, et al. An Epithelial Integrin Regulates the Amplitude of Protective Lung Interferon Responses against Multiple Respiratory Pathogens. *PLoS Pathog.* 2016;12(8):e1005804.
636. Sugimoto N, Mitoma H, Kim T, Hanabuchi S, Liu Y-J. Helicase proteins DHX29 and RIG-I cosense cytosolic nucleic acids in the human airway system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(21):7747-7752.
637. Guo Z, Chen L, Zeng H, et al. NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007;36(3):263-269.
638. Gack MU, Albrecht RA, Urano T, et al. Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I. *Cell Host Microbe.* 2009;5(5):439-449.
639. Shin N, Pyo C-W, Jung K II, Choi S-Y. Influenza A virus PB1-F2 is involved in regulation of

- cellular redox state in alveolar epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;459(4):699-705.
640. Versteeg GA, Rajsbaum R, Sánchez-Aparicio MT, et al. The E3-ligase TRIM family of proteins regulates signaling pathways triggered by innate immune pattern-recognition receptors. *Immunity*. 2013;38(2):384-398.
641. Liang Q, Deng H, Li X, et al. Tripartite motif-containing protein 28 is a small ubiquitin-related modifier E3 ligase and negative regulator of IFN regulatory factor 7. *J Immunol*. 2011;187(9):4754-4763.
642. Krischuns T, Günl F, Henschel L, et al. Phosphorylation of TRIM28 Enhances the Expression of IFN- β and Proinflammatory Cytokines During HPAIV Infection of Human Lung Epithelial Cells. *Front Immunol*. 2018;9:2229.
643. Zhou X, You F, Chen H, Jiang Z. Poly(C)-binding protein 1 (PCBP1) mediates housekeeping degradation of mitochondrial antiviral signaling (MAVS). *Cell Res*. 2012;22(4):717-727.
644. Ding X, Lu J, Yu R, et al. Preliminary Proteomic Analysis of A549 Cells Infected with Avian Influenza Virus H7N9 and Influenza A Virus H1N1. *PLoS One*. 2016;11(5):e0156017.
645. Varshavsky A. The early history of the ubiquitin field. *Protein Sci*. 2006;15(3):647-654.
646. Gong T, Yang Y, Jin T, Jiang W, Zhou R. Orchestration of NLRP3 Inflammasome Activation by Ion Fluxes. *Trends Immunol*. 2018;39(5):393-406.
647. Rühl S, Broz P. Caspase-11 activates a canonical NLRP3 inflammasome by promoting K(+) efflux. *Eur J Immunol*. 2015;45(10):2927-2936.
648. Branon TC, Bosch JA, Sanchez AD, et al. Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nat Biotechnol*. 2018;36(9):880-887.
649. Kim DI, Cutler JA, Na CH, et al. BioSITE: A Method for Direct Detection and Quantitation of Site-Specific Biotinylation. *J Proteome Res*. 2018;17(2):759-769.
650. Evseev D, Magor KE. Innate Immune Responses to Avian Influenza Viruses in Ducks and Chickens. *Vet Sci*. 2019;6(1).
651. Caliendo V, Leijten L, Begeman L, et al. Enterotropism of highly pathogenic avian influenza virus H5N8 from the 2016/2017 epidemic in some wild bird species. *Vet Res*. 2020;51(1):117.
652. Liu P, Zhu Z, Zeng C, Nie G. Specific absorption spectra of hemoglobin at different PO₂ levels: potential noninvasive method to detect PO₂ in tissues. *J Biomed Opt*. 2012;17(12):125002.
653. England CG, Ehlerding EB, Cai W. NanoLuc: A Small Luciferase Is Brightening Up the Field of Bioluminescence. *Bioconjug Chem*. 2016;27(5):1175-1187.
654. Yeh H-W, Karmach O, Ji A, Carter D, Martins-Green MM, Ai H-W. Red-shifted luciferase-luciferin pairs for enhanced bioluminescence imaging. *Nat Methods*. 2017;14(10):971-974.
655. Qian Y, Commane M, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Li X. IRAK-mediated translocation of TRAF6 and TAB2 in the interleukin-1-induced activation of NF κ B. *J Biol Chem*. 2001;276(45):41661-41667.
656. Landström M. The TAK1-TRAF6 signalling pathway. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(5):585-589.
657. Toyooka K, Shionoya A, Gambello MJ, et al. 14-3-3epsilon is important for neuronal migration by binding to NUDEL: a molecular explanation for Miller-Dieker syndrome. *Nat Genet*. 2003;34(3):274-285.
658. Srinivasula SM, Poyet J-L, Razmara M, Datta P, Zhang Z, Alnemri ES. The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. *J Biol Chem*. 2002;277(24):21119-21122.

Annexes

1 - Cartes plasmidiques (page 196)

2 - Participation à l'article : Oliva J, Mettier J, Sedano L, et al. Murine Model for the Study of Influenza D Virus. *J Virol.* 2020;94(4). doi:10.1128/JVI.01662-19 (page 202)

Tout comme les IAV, les IDV comptent un nombre important d'hôtes réceptifs. L'objectif de cet article a été de développer un modèle murin d'infection afin de faciliter l'étude de la pathogénicité des IDV. Ma contribution aux travaux a porté sur l'étude cinétique de la réponse inflammatoire induite par un IDV en modèle murin (Figure 6).

3 - Participation à l'article : Galloux M, Gsponer N, Gaillard V, et al. Targeting the Respiratory Syncytial Virus N(0)-P Complex with Constrained α -Helical Peptides in Cells and Mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;64(10). doi:10.1128/AAC.00717-20 (page 219)

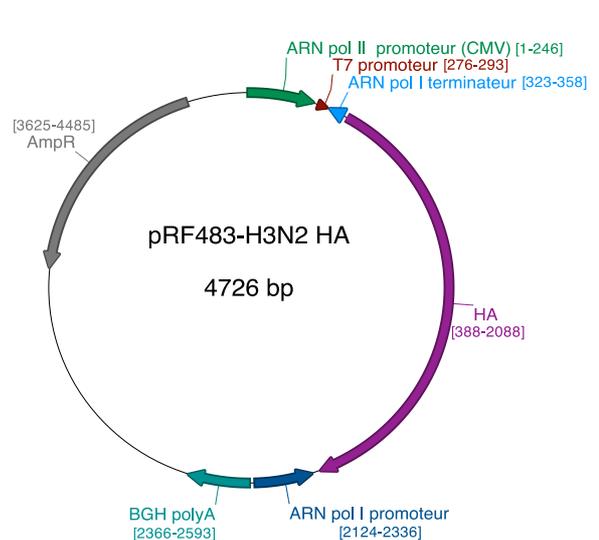
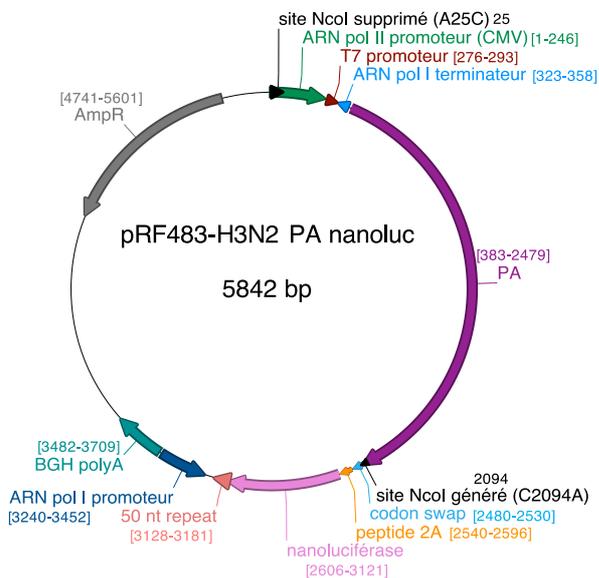
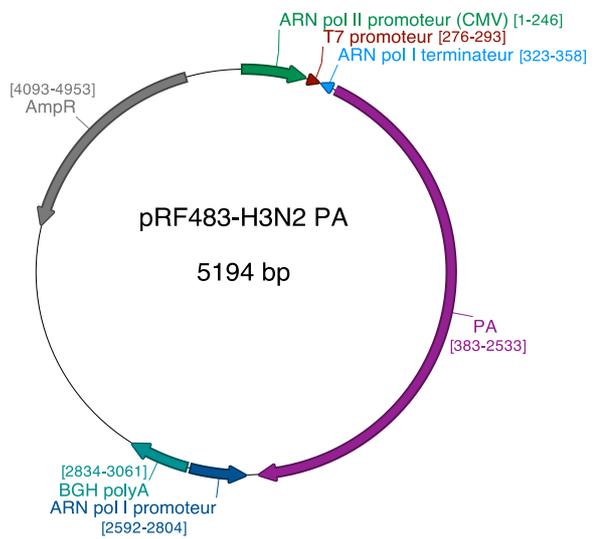
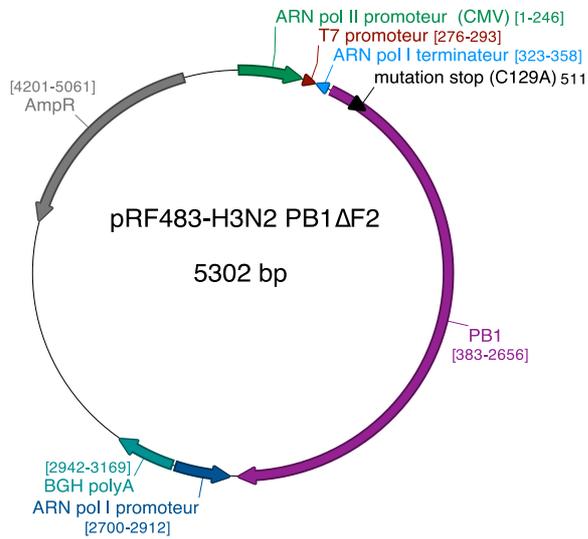
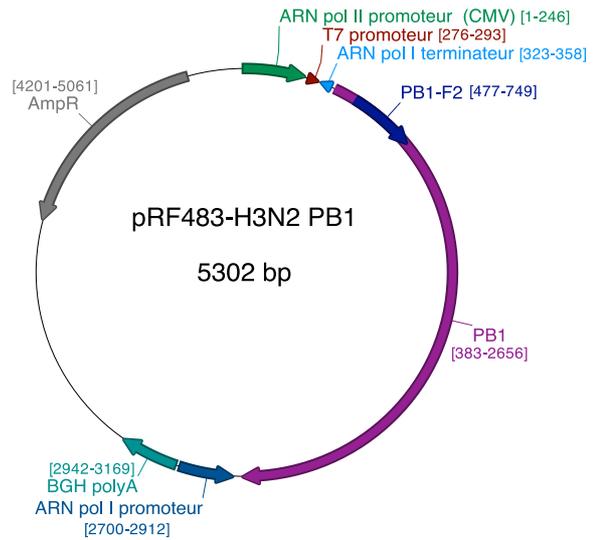
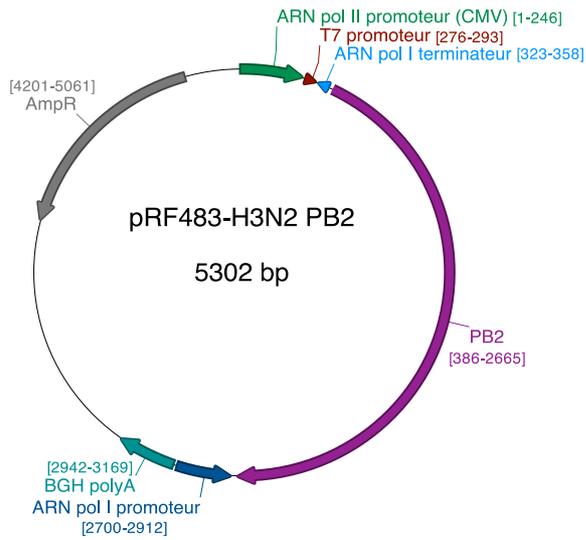
Le virus respiratoire syncytial (RSV) est le principal agent responsable des pathologies respiratoires chez les enfants en bas-âge dans le monde. Actuellement, il n'existe pas de traitement disponible. Comme pour les IAV, le génome viral du RSV est encapsidé par une nucléoprotéine (NP). Avant l'encapsidation des brins d'ARN synthétisés au cours du cycle viral, NP interagit avec la phosphoprotéine P. Cette interaction maintient NP sous forme monomérique et non associée à de l'ARN. Le but de cet article a été de tester le potentiel inhibiteur de la réplication virale de peptides dérivés de la protéine P. En interagissant avec la protéine NP, ces peptides pourraient limiter l'encapsidation du génome. Ma contribution à ces travaux a porté sur les expériences conduites en modèle murin (étude de la toxicité du peptide et test d'inhibition de la réplication virale, Figures 7 et 8).

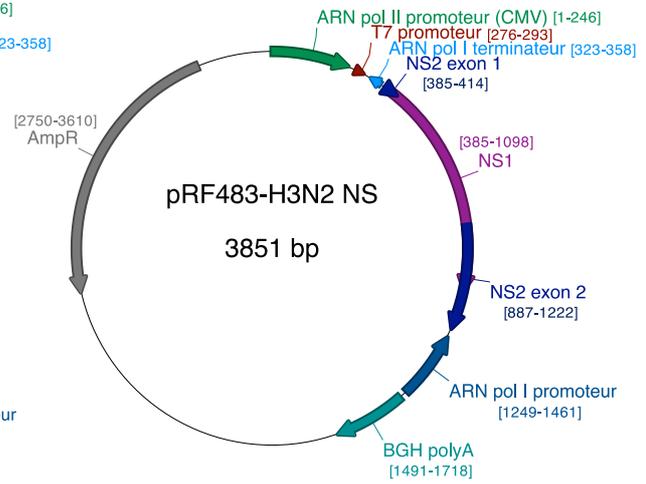
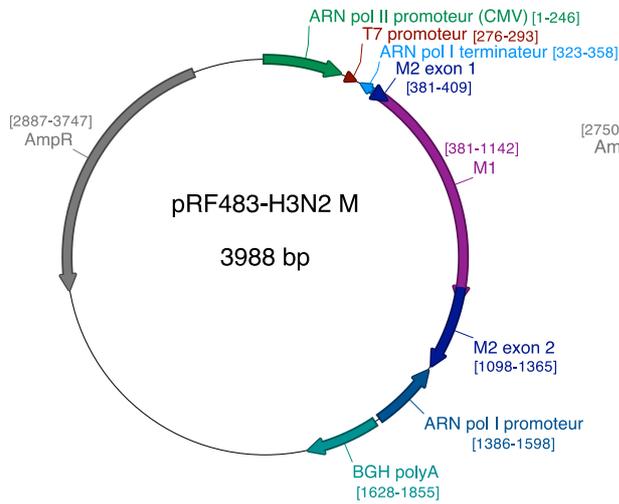
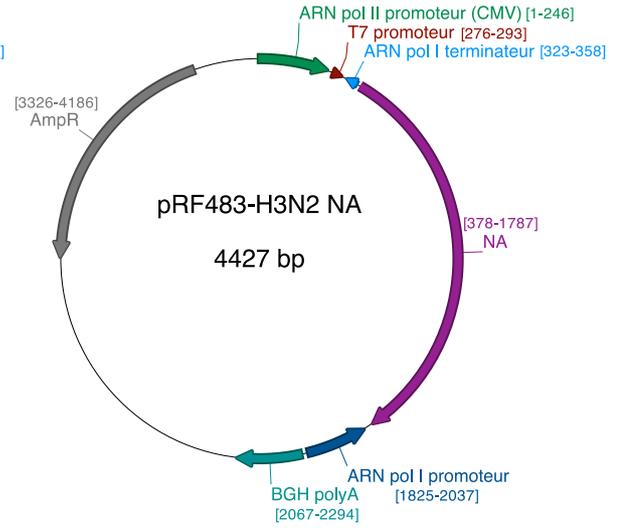
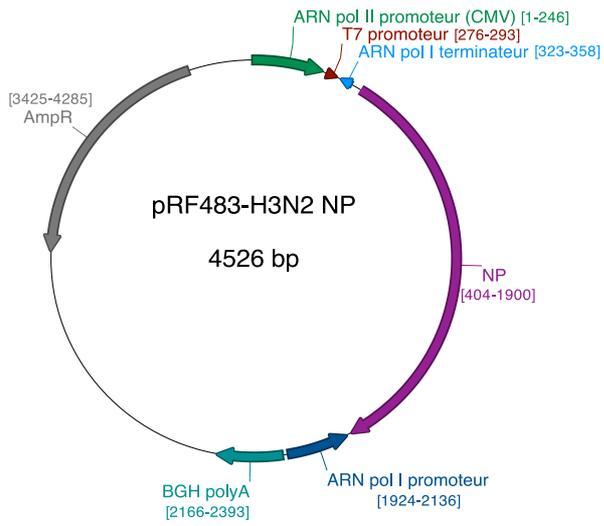
4 - Participation à l'article : Kocabiyik O, Cagno V, Silva PJ, et al. Non-Toxic Virucidal Macromolecules Show High Efficacy Against Influenza Virus Ex Vivo and In Vivo. *Adv Sci Weinheim, Baden-Wurtemberg, Ger.* 2021;8(3):2001012. doi:10.1002/advs.202001012 (page 238)

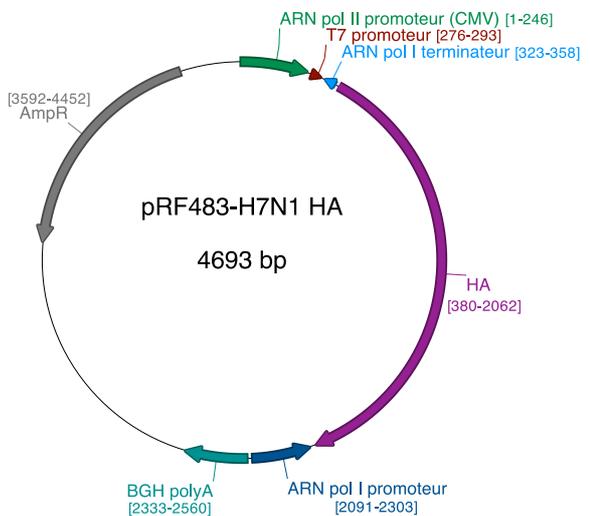
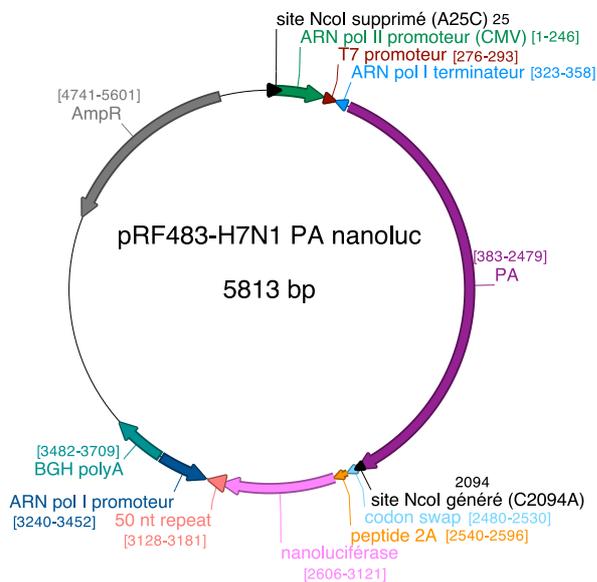
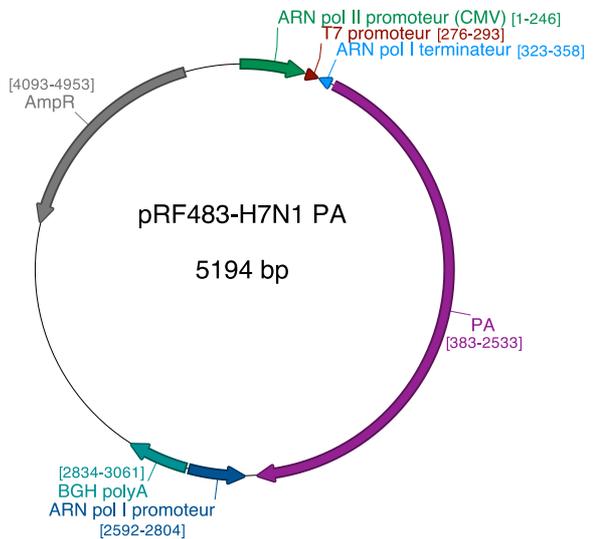
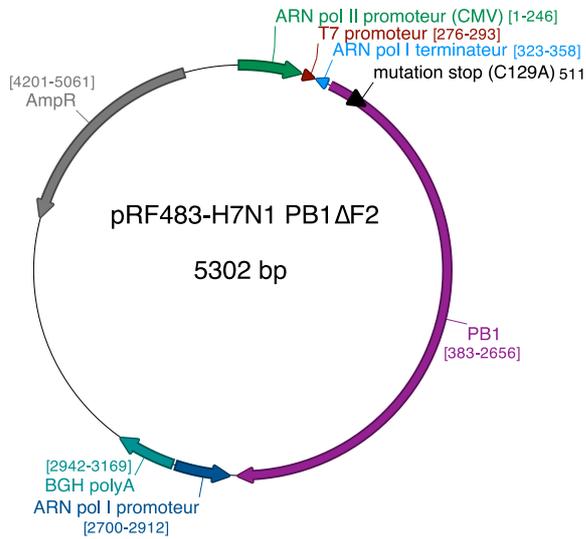
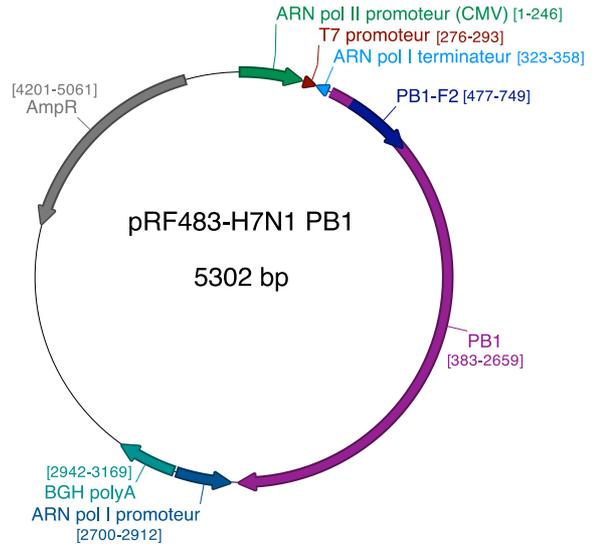
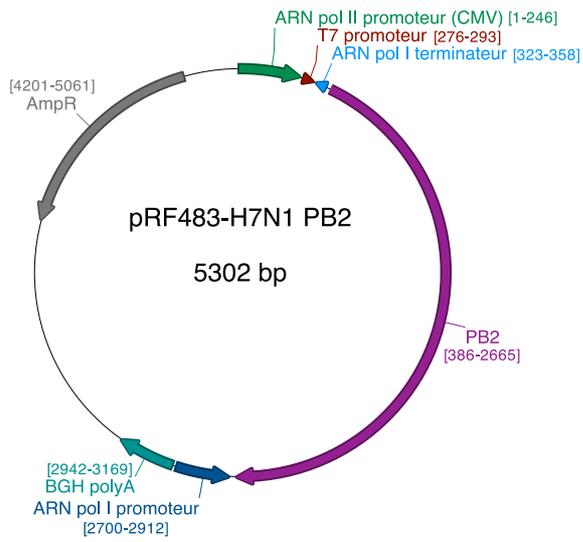
Le but de ces travaux a été de développer de nouveaux antiviraux contre les IAV. Il s'agit de macromolécules composées de β -cyclodextrines (β -CD) associées à de longues chaînes hydrophobes terminées par des motifs 6'sialyl-N-acetyllactosamine ou 3'sialyl-N-acetyllactosamine (6'SNL ou 3'SNL). La structure particulière des β -CD leur permet d'exercer des forces sur les particules virales entraînant leur déformation. Les motifs 6'SNL et 3'SNL miment les récepteurs préférentiels respectifs des IAV humains et aviaires (AS α 2-6gal et AS α 2-3gal). Ces motifs sont ainsi capables d'interagir avec les protéines HA et d'inhiber la fixation des particules virales à leurs cellules hôtes. Ma contribution à ces travaux a porté sur la détermination de la concentration efficace médiane d'un composé 3'SNL/ β -CD sur le virus H7N1 utilisé comme modèle aviaire dans cette thèse (Tableau 1).

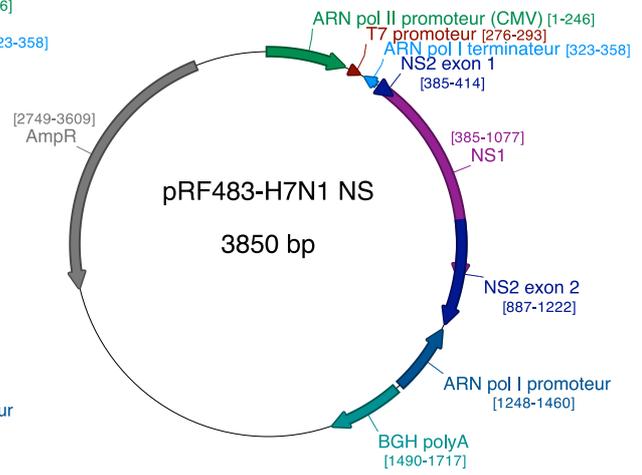
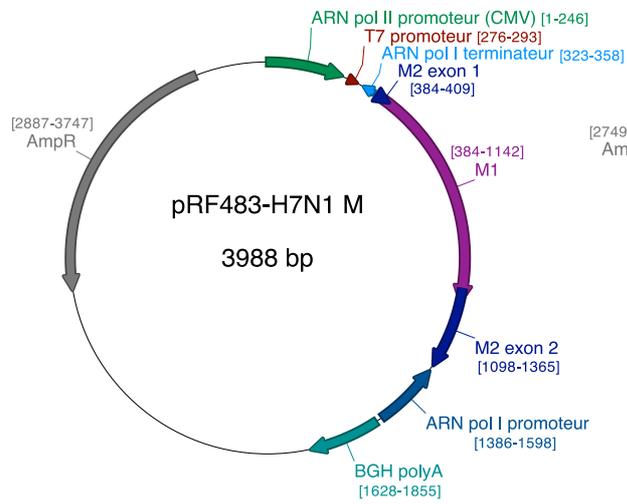
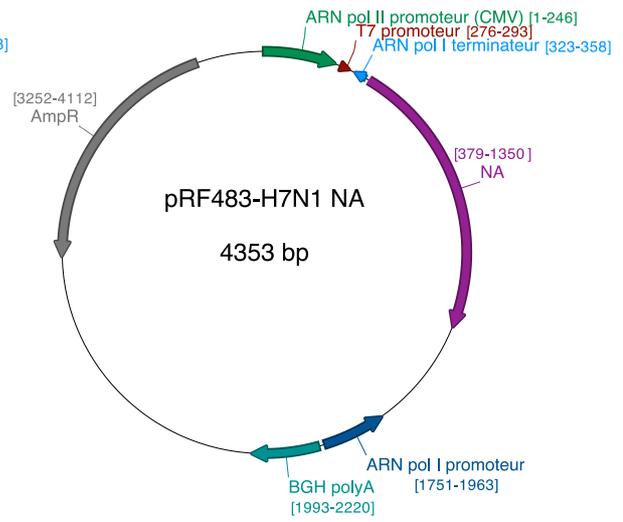
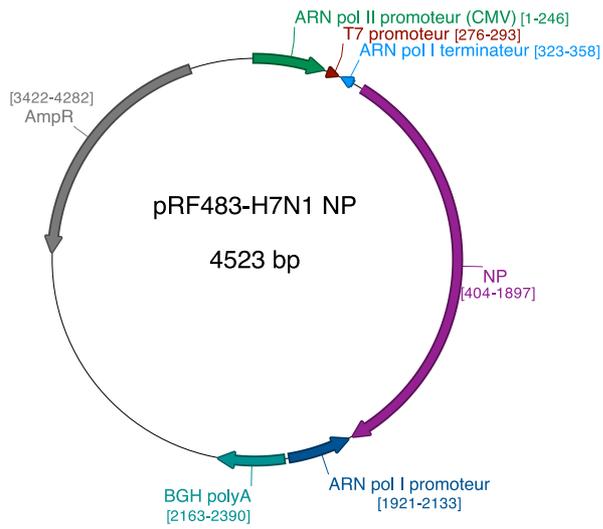
5 - Article publié dans la revue *Virulence* : Mettier J, Marc D, Sedano L, Da Costa B, Chevalier C, Le Goffic R. Study of the host specificity of PB1-F2-associated virulence. *Virulence*. 2021;12(1):1647-1660. doi: 10.1080/21505594.2021.1933848 (page 246)

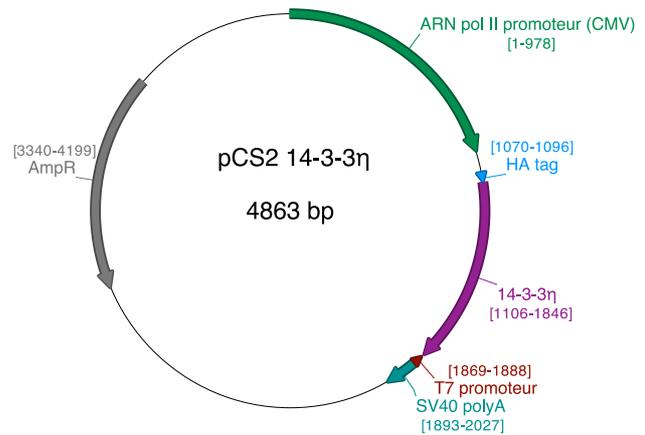
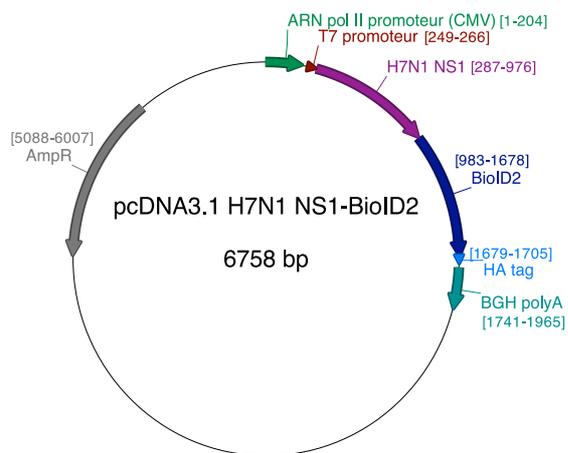
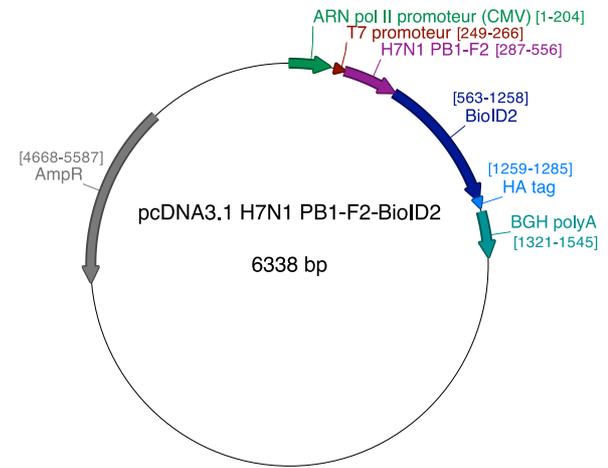
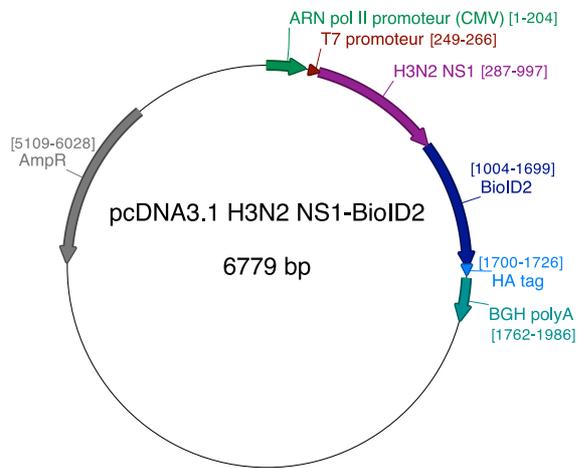
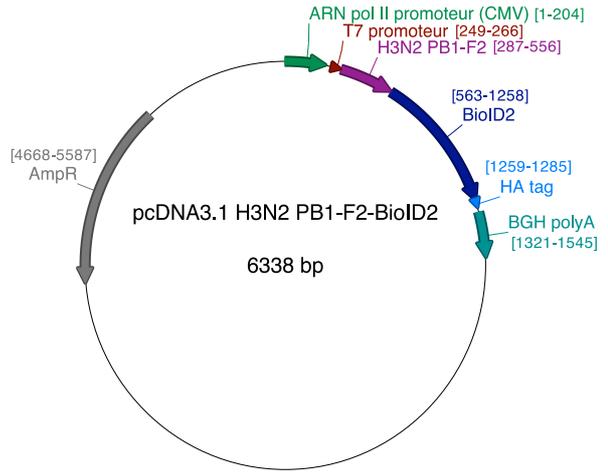
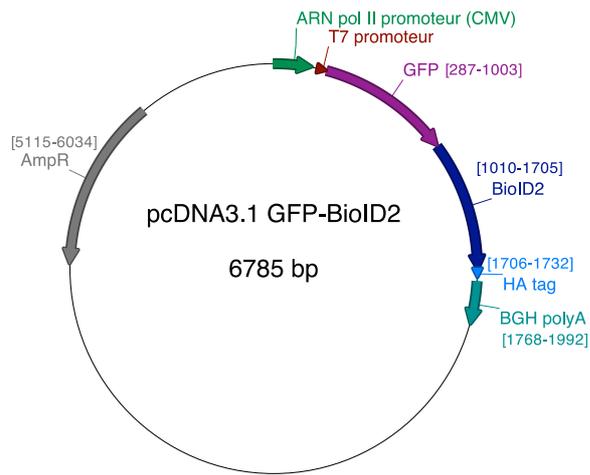
Cet article inclut des résultats présentés au sein des parties 4.1 et 4.2. L'objectif de cet article était ainsi d'étudier la contribution de PB1-F2 à la pathogénicité en considérant deux types d'hôtes (mammifère *vs* aviaire) mais également différentes souches virales (virus humain, aviaire ou chimérique correspondant à un fond génétique humain ayant intégré un segment PB1 aviaire). La partie 4.3 fera l'objet d'une valorisation post-thèse.

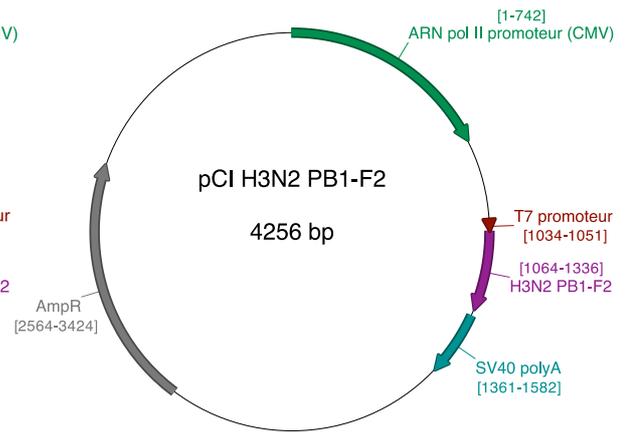
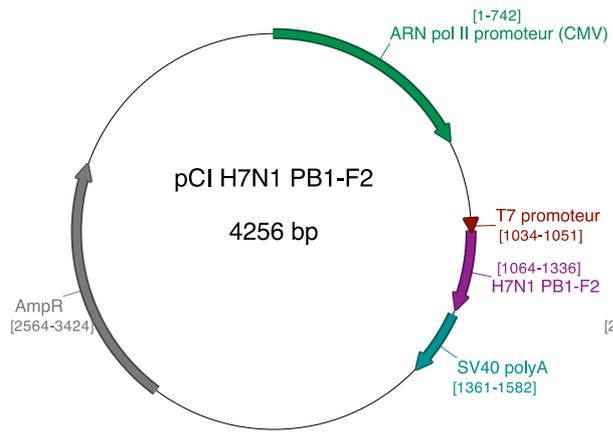














Murine Model for the Study of Influenza D Virus

J. Oliva,^a J. Mettier,^b L. Sedano,^b M. Delverdier,^a N. Bourgès-Abella,^c B. Hause,^d J. Loupias,^a I. Pardo,^c C. Bleuart,^c P. J. Bordignon,^e E. Meunier,^e R. Le Goffic,^b G. Meyer,^a M. F. Ducatez^a

^aHAP, Université de Toulouse, INRA, ENVT, Toulouse, France

^bUnité de Virologie et Immunologie Moléculaires (UR0892), INRA, Jouy-en-Josas, France

^cUniversité de Toulouse, ENVT, Toulouse, France

^dDiagnostic Medicine/Pathobiology, College of Veterinary Medicine, Kansas State University, Manhattan, Kansas, USA

^eInstitute of Pharmacology and Structural Biology, CNRS, Toulouse, France

ABSTRACT A novel genus within the *Orthomyxoviridae* family was identified in the United States and named influenza D virus (IDV). Bovines have been proposed to be the primary host, and three main viral lineages (D/OK-like, D/660-like, and D/Japan-like) have been described. Experimental infections had previously been performed in swine, ferrets, calves, and guinea pigs in order to study IDV pathogenesis. We developed a murine experimental model to facilitate the study of IDV pathogenesis and the immune response. DBA/2 mice were inoculated with 10⁵ 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀) of D/bovine/France/5920/2014 (D/OK-like). No clinical signs or weight loss were observed. Viral replication was observed mainly in the upper respiratory tract (nasal turbinates) but also in the lower respiratory tract of infected mice, with a peak at 4 days postinfection. Moreover, the virus was also detected in the intestines. All infected mice seroconverted by 14 days postinfection. Transcriptomic analyses demonstrated that IDV induced the activation of proinflammatory genes, such as gamma interferon (IFN- γ) and CCL2. Inoculation of NF- κ B-luciferase and *Irfar1*^{-/-} mice demonstrated that IDV induced mild inflammation and that a type I interferon response was not necessary in IDV clearance. Adaptation of IDV by serial passages in mice was not sufficient to induce disease or increased pathogenesis. Taken together, present data and comparisons with the calf model show that our mouse model allows for the study of IDV replication and fitness (before selected viruses may be inoculated on calves) and also of the immune response.

IMPORTANCE Influenza D virus (IDV), a new genus of *Orthomyxoviridae* family, presents a large host range and a worldwide circulation. The pathogenicity of this virus has been studied in the calf model. The mouse model is frequently used to enable a first assessment of a pathogen's fitness, replication, and pathogenesis for influenza A and B viruses. We showed that DBA/2 mice are a relevant *in vivo* model for the study of IDV replication. This model will allow for rapid IDV fitness and replication evaluation and will enable phenotypic comparisons between isolated viruses. It will also allow for a better understanding of the immune response induced after IDV infection.

KEYWORDS influenza D virus, mouse model, replication

In 2011, a new influenza virus was isolated from a pig with influenza-like symptoms in Oklahoma. Electronic microscopy and real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR) revealed that it was neither an influenza A virus (IAV) nor an influenza B virus (IBV). Next-generation sequencing (NGS) analyses allowed for the identification of 7 *Orthomyxovirus*-like RNA segments, but this virus presented only 50% overall identity to human influenza C virus (ICV). Furthermore, serological analyses demonstrated that antibodies against this new virus failed to cross-react with IAV, IBV, or ICV (1). All of

Citation Oliva J, Mettier J, Sedano L, Delverdier M, Bourgès-Abella N, Hause B, Loupias J, Pardo I, Bleuart C, Bordignon PJ, Meunier E, Le Goffic R, Meyer G, Ducatez MF. 2020. Murine model for the study of influenza D virus. *J Virol* 94:e01662-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.01662-19>.

Editor Stacey Schultz-Cherry, St. Jude Children's Research Hospital

Copyright © 2020 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to M. F. Ducatez, m.ducatez@envt.fr.

Received 30 September 2019

Accepted 24 November 2019

Accepted manuscript posted online 27 November 2019

Published 31 January 2020

these results suggested that it was a new genus of *Orthomyxoviridae*, temporarily named C/swine/Oklahoma/1334/2011 (C/swine/OK) and then influenza D virus (IDV) (1, 2).

IDV is widely distributed in the world: so far, it has been detected in North and Central America (1, 3–6), Asia (7–11), Europe (12–18), and Africa (19, 20). Two clades of IDV that are antigenically and phylogenetically different were identified in the United States, D/OK-like and D/660-like. Both were shown to frequently reassort in the United States (21). More recently, a third clade, circulating specifically in Japan, was identified (D/Japan-like) (11, 22, 23).

Several studies detected IDV in cattle, with a higher prevalence in sick than in healthy cattle (2, 10, 21) and a higher prevalence in cattle than in swine, suggesting that bovines could be a main host of IDV (1, 3). IDV was also detected in small ruminants, horses, and camels (19, 22, 23).

The zoonotic potential of IDV is still not clear, but serological and virological studies suggested that the virus might infect humans, especially those exposed to cattle (1, 24–26). An experimental study in ferrets was conducted in order to understand IDV pathogenesis and zoonotic potential (1). The ferret is a good model for studying human influenza virus. Indeed, these animals express the same pattern of viral receptors and present clinical signs similar to those observed in humans (27). Despite the absence of clinical signs, the virus replicated in the upper respiratory tract of the ferrets. Moreover, direct contact transmission between ferrets was observed. Taken together, these results suggested that humans could be susceptible to IDV, but studies are still needed to confirm this hypothesis.

IDV is involved in bovine respiratory disease complex (BRDC). BRDC causes a major economic and public health problems in young calves worldwide. The causes are multifactorial, represented by the following: (i) the presence of one or several pathogens (virus and/or bacteria), (ii) a compromised immune system of bovines, and (iii) environmental factors. Recently, three metagenomics studies identified IDV among viruses associated with BRDC. IDV was mainly associated with BRDC, alone or in combination with bovine adenovirus-3, and bovine rhinitis A in U.S. cattle (6) or with bovine rhinitis A and B viruses, bovine coronavirus, or bovine respiratory syncytial virus in Canadian cattle (5). The role of IDV in BRDC remains unclear, but the high prevalence in cattle and the mild clinical signs by experimental infections suggest that it could be an initiating pathogen (28, 29).

Little is known about IDV pathogenesis, transmission, or the associated immune response. It is therefore necessary to develop a small-animal model in order to have a better understanding of IDV's biology. Four experimental infection models had been developed in swine, ferrets, guinea pigs, and calves (1, 28, 30, 31). Swine and ferrets did not present clinical signs, and IDV was only detected in the upper respiratory tract (1). In guinea pigs, IDV replicated with high titers in the upper and lower respiratory tracts but was not associated with clinical signs (30). Ferguson et al. (28) and Salem et al. (29) also studied the pathogenesis and transmission of the virus in calves, the main host known so far. They observed mild clinical signs, and IDV was detected in both upper and lower respiratory tracts. Transmission by direct contact and aerosols was observed. Salem et al. (29) studied the immune response of calves post-IDV inoculation. The calves presented an innate immune response involving proinflammatory cytokines and chemokines, such as CCL2, CCL3, and CCL2. Surprisingly, the type I interferon mRNAs were not overexpressed. A mixed Th1 and Th2 response was also observed, with IDV-specific IgG1 production starting from 10 days postinfection.

Mice have so far not been used for studying the pathogenesis of IDV. Mice are, however, the most used animal model for studying influenza viruses (32). The mouse model is a very convenient model for studying viral replication (33), tissue tropism (34), and the immune response (35) but also for testing vaccines or antiviral molecules (36, 37). It has clear practical advantages such as a low cost, small size, ease of husbandry, and good availability of reagents for immunology testing (32). The main disadvantages are the inefficient influenza virus transmission between mice, the rare clinical signs, and

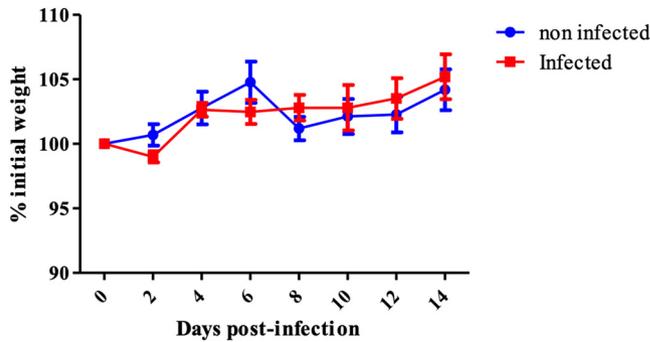


FIG 1 Absence of clinical signs during IDV infection in mice. A group of 36 mice was intranasally infected with 10^5 TCID₅₀ of D/5920, and a group of 11 noninfected mice was used as a control. Clinical signs and mortality were recorded every 2 days for 14 days. There was no significant weight variation between noninfected and infected DBA/2 mice ($P > 0.05$). Weight changes expressed as the mean percentage of initial body weight \pm standard deviation (SD).

the requirement of adaptation for some influenza virus strains. It was shown that the mouse genetic background has also an impact on their susceptibility to IAV (38).

The mouse model was especially used to study the pathogenicity of IAV, namely, tissue tropism, fitness of replication, and the immune response. The most visible clinical signs post-IAV infection are weight loss and changes in behavior. IAV was shown to replicate mainly in the upper and lower respiratory tract of mice, especially in epithelial cells, endothelial cells, and type I pneumocytes. A viral peak has often been observed around 3 to 4 days postinfection (dpi). Systemic replication was observed with a highly pathogenic H5N1 virus and was associated with severe disease (38, 39).

Here, we developed a murine experimental model to study the pathogenesis and immune response of IDV. We aimed to reproduce the clinical signs, viral replication, and tissue tropism as observed in the main host. We also used this model to better understand the immune response induced after infection of IDV in DBA/2, *Ifnar1*^{-/-}, and NF- κ B-luciferase transgenic mice.

RESULTS

Influenza D virus infects mice but does not cause clinical signs. DBA/2 mice are known to be highly susceptible to IAV infection and were therefore selected for the present study. In order to determine if the mice are susceptible to IDV, we infected a total of 50 DBA/2 mice intranasally with 10^5 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀) of D/bovine/France/5920/2014 (D/5920; D/OK-like clade), and 25 mice served as negative controls (inoculated with phosphate-buffered saline [PBS]). This infection was carried out in two separate experiments.

We did not observe clinical signs or weight loss in the DBA/2-infected mice. No mortality was recorded either, suggesting that IDV could not induce disease in mice (Fig. 1).

The antibody response against IDV was measured at 14 days postinfection (dpi), using a hemagglutination inhibition (HI) assay. Two viral strains were used, D/5920 (inoculum) and D/bovine/Nebraska/9-5/2012 (D/660-like, heterologous strain). All of the infected mice seroconverted, suggesting that they had all been infected by the virus. The mice presented high antibody titers ranging from 15 to 240 against D/5920 (homologous strain), but the antibody titers against D/Neb were much lower (>20 but <40) (Table 1).

IDV efficiently replicates in DBA/2 mice with a peak at 4 dpi. To assess the viral replication and tissue tropism of the virus, eight mice were necropsied at 2, 4, 6, and 8 dpi, and different organs and samples (brain, nasal turbinates, trachea, lungs, spleen, liver, kidneys, intestines, and blood) were collected. IDV was titrated by TCID₅₀ (Fig. 2). The virus was detected in nasal turbinates of all mice ($n = 10$) with high titers at 4 dpi ($10^{3.4}$ to $10^{4.7}$ TCID₅₀/g) but not at 2 or 6 to 8 dpi (Fig. 2B). The virus was detected in

TABLE 1 Seroconversion in infected DBA/2 mice 14 days postinfection with D/5920

Strain	HI titer in mouse no.:									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
D/5920 ^a	120	80	80	15	160	240	240	120	60	120
D/Neb ^b	20	20	20	20	20	40	40	40	20	20

^aD/5920, D/bovine/France/5920/2014.

^bD/Neb, D/bovine/Nebraska/9-5/2012. HI assays were performed with viral inoculum (D/5920) and a genetically and antigenically distinct strain of IDV (D/Neb). All noninfected mice did not seroconvert after IDV infection (data not shown).

the trachea of three mice only at 4 dpi but with low titers (10^2 to 10^3 TCID₅₀/g) compared to those in nasal turbinates (Fig. 2C). In the lungs, IDV was detected in two mice ($n = 2/10$) at 2 dpi ($10^{2.6}$ to 10^3 TCID₅₀/g), in four mice ($n = 4/10$) at 4 dpi ($10^{1.9}$ to $10^{2.8}$ TCID₅₀/g), and in one mouse ($n = 1/10$) at 8 dpi ($10^{2.1}$ TCID₅₀/g) (Fig. 2D).

The virus was also sporadically detected in nonrespiratory organs (Fig. 2A, F, and G). Four mice at 2 dpi were positive for IDV in the liver ($10^{2.4}$ to $10^{2.6}$ TCID₅₀/g), suggesting viremia (Fig. 2E). However, blood samples taken at 2 and 6 dpi were negative for IDV (undetected titers). Finally, the virus was detected in the intestines of mice with titers ranging from $10^{2.1}$ to $10^{3.3}$ TCID₅₀/g (6/8 mice virus positive at 2 dpi, 3/8 positive at 4 dpi, 2/8 positive at 6 dpi, and 3/5 positive at 8 dpi), suggesting that IDV could have an enteric tropism.

Histology analyses were performed for each organ at 2 and 6 dpi for negative-control mice and infected mice. At 2 dpi, no lesion was observed irrespective of the organ. At 6 dpi, mild inflammation was observed only in the nasal turbinates. In comparison with noninfected mice, there was an infiltration of lymphocytes, macrophages, and plasma cells, cell degeneration, and loss of cilia. Immunohistochemistry (IHC) staining confirmed the presence of virus in the nasal turbinates at 6 dpi (Fig. 3). No immunohistochemistry signal was detected in any other organs (data not shown).

These results confirmed that the virus presented a respiratory tropism, especially for the upper respiratory tract, regarding the viral titers. Although there were no clinical signs, we observed mild inflammation at 6 dpi in the nasal turbinates (Fig. 3).

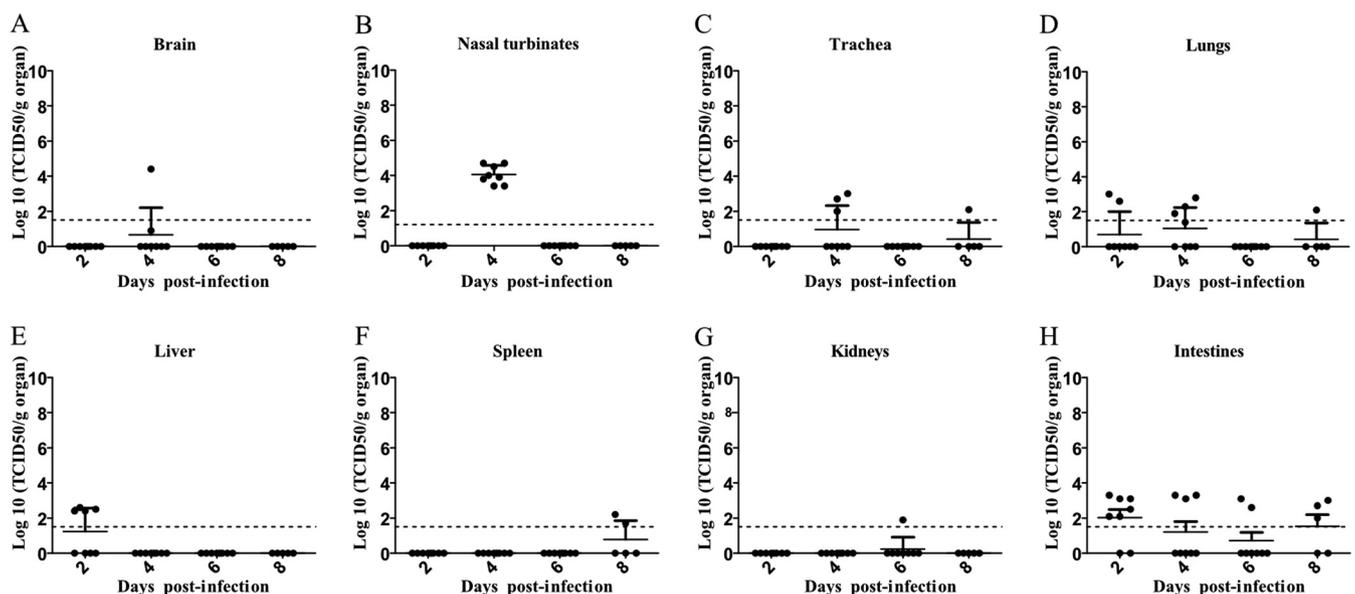


FIG 2 IDV mainly presented upper respiratory tropism. Mice were infected with 10^5 TCID₅₀ of D/5920. (A to H) At 2, 4, 6, and 8 dpi, 8 mice per days were euthanized, and brain (A), nasal turbinates (B), trachea (C), lungs (D), spleen (E), liver (F), kidneys (G), and intestines (H) were collected. Virus titers were determined using the TCID₅₀ method and are expressed in \log_{10} of TCID₅₀/g of tissue. Each dot represents one mouse. The dotted line represents the positivity threshold ($1.5 \log_{10}$ TCID₅₀/g of organ).

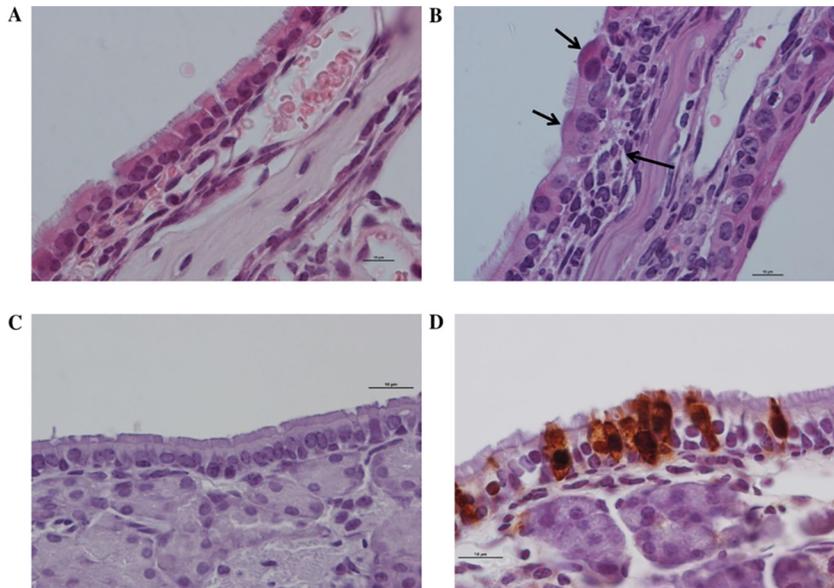


FIG 3 Microscopic lesions at 6 dpi and evidence of IDV replication in nasal turbinates of infected mice as done by hematoxylin and eosin staining (H&E) and immunohistochemical reaction (IHC). Magnification, $\times 1,000$; scale bar = $10\ \mu\text{m}$. (A and B) Hematoxylin and eosin staining shown for the control (A) and infected mice, with infiltration of macrophages, lymphocytes, and plasma cells (long arrow), epithelial cell degeneration, and loss of cilia (short arrows) (B). (C and D) IHC is shown for the control (C) and infected mice, with anti-IDV cytoplasmic and nuclear immunohistochemical expression (D).

IDV induces a mild proinflammatory response. To investigate the immune response against IDV, we evaluated the induction of genes involved in innate and adaptive responses in tissues by measuring the transcript levels of 36 associated genes. The immune response was assessed in the lungs (Fig. 4) to understand the local response, and in the spleen (Fig. 5) to understand the systemic response. Twofold changes between infected and noninfected control mice were considered significant.

In the lungs, we observed overexpression of several genes of the innate response. Looking at the sensors of the innate immunity, we observed a ≥ 2 -fold overexpression of Toll-like receptor 4 (TLR4) and TLR7 at 6 dpi compared to at 2 to 4 dpi. For TLR3, we observed a higher expression at 4 dpi than at 2 and 6 dpi. Finally, we did not observe significant overexpression of TLR9 or retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) transcripts (1.77- and 1.41-fold increases, respectively; Fig. 4). We also noticed an inflammatory response with a significant increase in interleukin 6 (IL-6) or IL-1 β at 2 dpi. The highest fold changes were observed at 2 dpi for CCL5 and gamma interferon (IFN- γ) (5.3- and 6.9-fold changes, respectively; Fig. 4), with a decrease in their expression at 4 to 6 dpi (5-fold decrease, Fig. 4). These results suggested that IDV could induce a mild innate response in the two first days postinfection.

The gene coding for 2',5'-oligoadenylate synthetase (2',5'-OAS) was slightly overexpressed at 2 dpi, suggesting that type I interferon could be induced after IDV infection. Moreover, we observed an increase in interferon regulatory factor 3 (IRF3) mRNA levels at 6 dpi. Surprisingly, we did not observe overexpression of IFN- β or IFN- λ mRNA levels. Finally, we also observed a slight increase of Gata3 and T-bet at 6 dpi, suggesting the involvement of an adaptive and mixed Th1/Th2 response (Fig. 4).

In the spleen, the pattern of transcript expression was different. We observed overexpression of the RIG-I transcript at 4 dpi but not of the Toll-like receptors (TLR). Overexpression of NF- κ Bp65 at 4 and 6 dpi was also detected, suggesting inflammation in the spleen. However, no increase in IL-6 or IL-1 β mRNA levels was observed. We noticed an increase in the anti-inflammatory cytokine transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) at 4 dpi. The highest increase in the expression of proinflammatory effectors was observed for CCL2 at 4 dpi. An increase in IFN- γ , lower than that observed in the

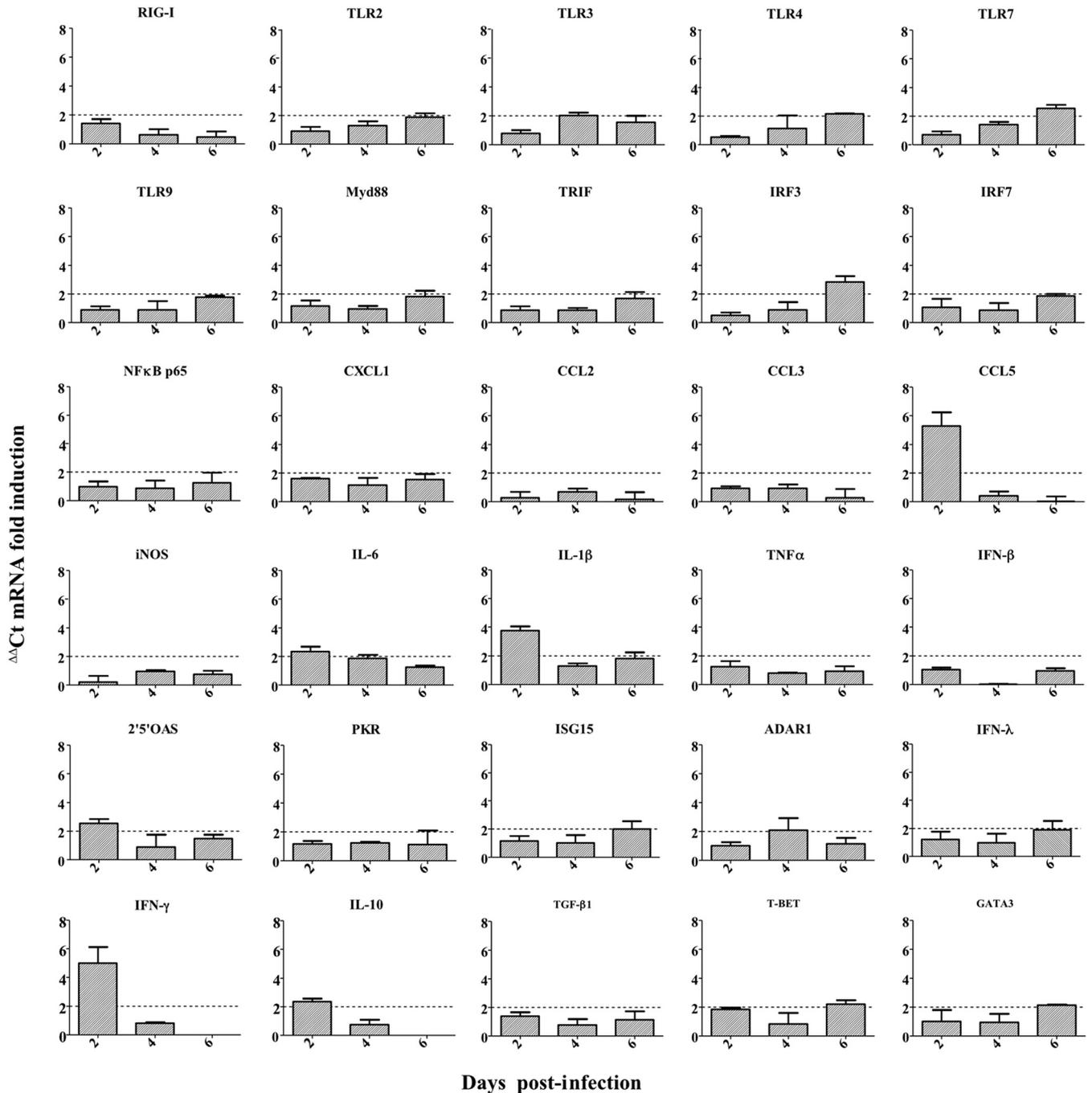


FIG 4 IDV induced a mild local proinflammatory response in DBA/2 mice. Mice were infected with 10^5 TCID₅₀ of D/5920. At 2, 4, and 6 dpi, 3 infected and 3 noninfected mice were euthanized per day, and lungs were collected. Relative expressions for each gene were calculated by $\Delta\Delta C_T$ analysis after normalization with the GAPDH housekeeping gene. The results are expressed as mRNA fold induction.

lungs, was also observed. At 6 dpi, slight overexpression of T-bet transcript was also observed but not of Gata3, in contrast to what was observed in the lungs (Fig. 5).

The NF- κ B transcription factor is involved in the activation of genes coding for some proinflammatory cytokines. As we observed overexpression of NF- κ B in the spleen of DBA/2 mice (3.3- and 4.4-fold changes at 4 and 6 dpi, respectively), we inoculated transgenic mice expressing a firefly luciferase gene under the control of the NF- κ B promoter (NF- κ B-luciferase mice) with D/5920 to determine the inflammation induced by IDV. The NF- κ B-dependent inflammatory response was analyzed daily by lumines-

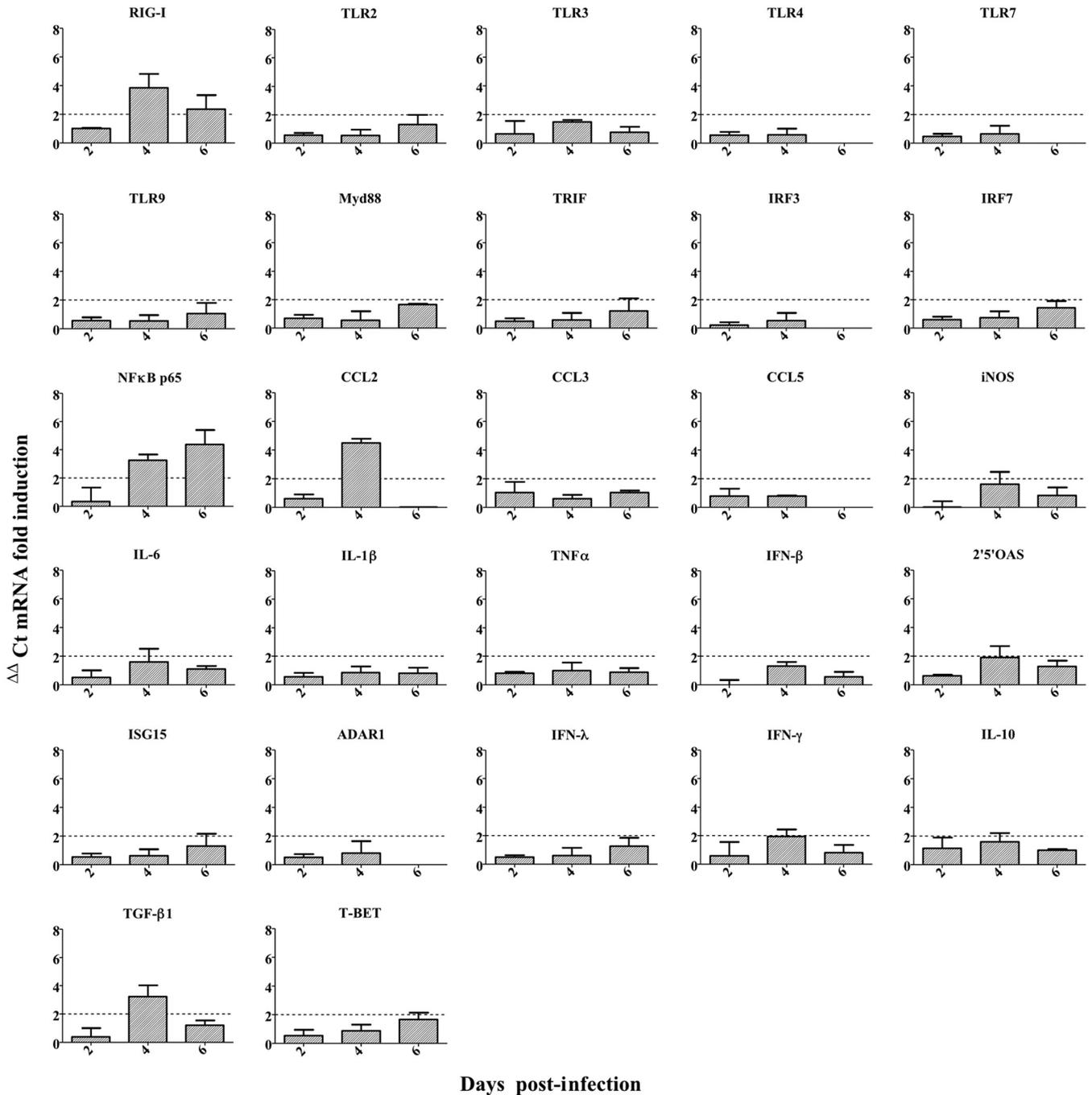


FIG 5 IDV induced a mild systemic proinflammatory response in DBA/2 mice. Mice were infected with 10^5 TCID₅₀ of D/5920. At 2, 4, and 6 dpi, 3 infected and 3 noninfected mice were euthanized per day, and spleens were collected. Relative expressions for each gene were calculated by $\Delta\Delta C_t$ analysis after normalization with the GAPDH housekeeping gene. The results are expressed as mRNA fold induction.

cence monitoring in the whole bodies of the infected mice. We observed mild inflammation in mice starting from 2 dpi and lasting until 6 dpi (Fig. 6A). A two-phase response was noticed, with peaks of luminescence at 2 and at 5 dpi (Fig. 6B).

These results suggested that IDV could induce only a mild proinflammatory response with a limited increase in NF- κ B transcript involved in cellular pathway for cytokine production.

The type I interferon response is not essential to resolve IDV infection. Type I interferons are especially involved in innate immunity against influenza A virus (IAV),

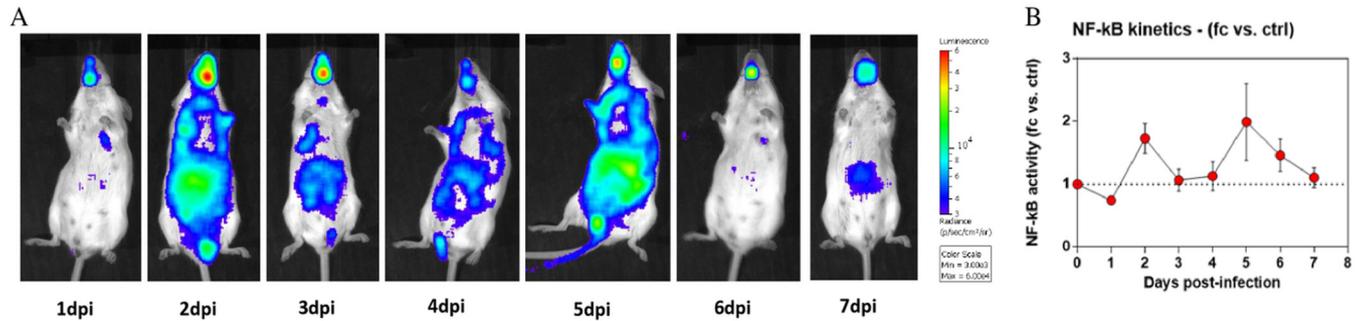


FIG 6 IDV infection induced two-phase inflammation in mice. NF-κB-luciferase mice were infected with 10^5 TCID₅₀ of D/5920 intranasally. (A) Bioluminescence was measured from 1 to 7 dpi by inoculation of luciferin intranasally (0.75 mg kg^{-1}) and using the IVIS system. The scale on the right indicates the average radiance, calculated as the sum of the photons per second from each pixel inside the region of interest (ROI)/number of pixels (photons/s/cm²/sr). (B) Bioluminescence activity was quantified using the Living Image software and represented as a graph. fc, fold change; ctrl, control.

and they are induced after NF-κB, IRF3, and IRF7 activation. Here, we conducted an experiment on mice with a type I interferon receptor knockout (*Ifnar1*^{-/-}) in order to understand the role of this pathway during IDV infection. Ten 12-week-old *Ifnar1*^{-/-} mice were infected intranasally with 10^5 TCID₅₀ of D/5920, and seven *Ifnar1*^{-/-} mice were inoculated with PBS as the controls.

As observed for the DBA/2 mice, the *Ifnar1*^{-/-} mice did not show clinical signs or weight loss (Fig. 7A). All of the mice seroconverted ($80 \leq \text{HI titers} \leq 160$), demonstrating that they had all been successfully infected by IDV. These observations suggested that type I interferon response is not essential for the protection against IDV.

To assess viral replication and tropism, we performed necropsies of four infected mice at 4 dpi. IDV presented almost the same tropism and viral titers in *Ifnar1*^{-/-} and DBA/2 mice, where the virus was detected in nasal turbinates ($10^{3.7}$ to 10^4 TCID₅₀/g), lungs ($10^{1.4}$ to $10^{2.9}$ TCID₅₀/g), and intestines ($10^{2.9}$ to $10^{3.4}$ TCID₅₀/g). Contrary to what was observed in DBA/2 mice, IDV was not detected in the trachea and liver of *Ifnar1*^{-/-} mice (Fig. 7B).

Together, these results suggested that type I IFN (IFN-I) response could be induced during IDV infection in mice but without being critical in antiviral response against IDV, in contrast to what has been observed for influenza A virus (40).

D/bovine/France/5920/2014 does not undergo much adaptation after passages in DBA/2 mice. In order to understand if D/5920 could adapt to mice after a few passages and then could induce clinical signs or higher viral replication, we performed 5 serial passages in DAB/2 mice. Briefly, three mice were infected with 10^5 TCID₅₀ of D/5920 intranasally. At 4 dpi, DBA/2 mice were euthanized, and the respiratory organs

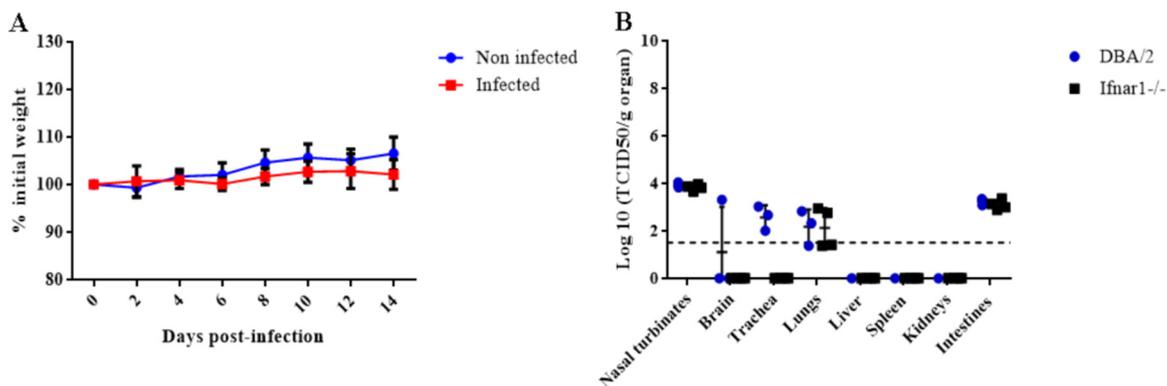


FIG 7 Pathogenicity of D/5920 in *Ifnar1*^{-/-} mice. *Ifnar1*^{-/-} mice were infected with 10^5 TCID₅₀ of D/5920. Clinical signs were recorded daily during 14 days. (A) Weight was recorded every 2 days for noninfected and infected mice. (B) At 4 dpi, 4 infected mice were euthanized, and different organs were collected. Virus titers were determined using the TCID₅₀ method and are expressed in log₁₀ of TCID₅₀/g of tissue. The dotted line represents the positivity threshold ($1.5 \text{ log}_{10} \text{ TCID}_{50}/\text{g}$ of organ). KO, knockout.

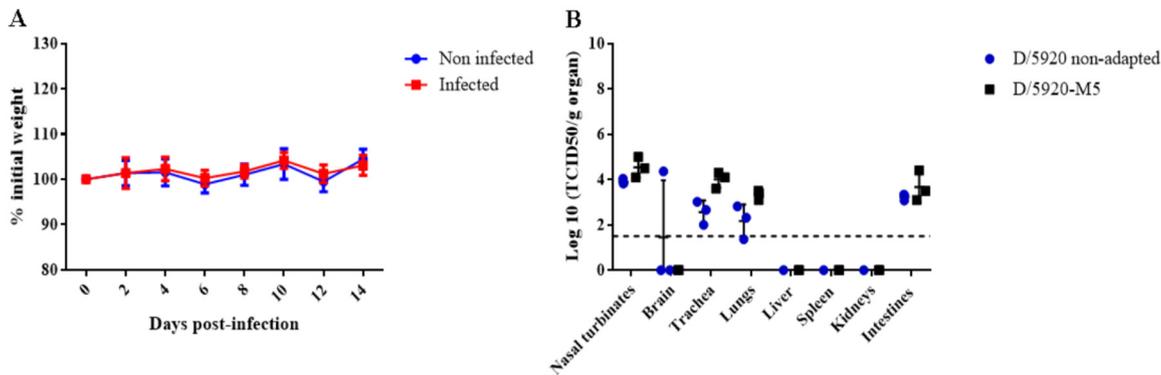


FIG 8 Adaptation of D/5920 in DBA/2 mice. Three DBA/2 mice were infected with 10^5 TCID₅₀ of D/5920. At 4 dpi, mice were euthanized, and nasal turbinates, trachea, and lungs were collected and homogenized. The pure homogenate was used to inoculate three naive DBA/2 mice. After five serial passages, 8 DBA/2 mice were infected intranasally with 30 μ l of mouse passage 5 IDV (D/5920-M5). (A) Weight was measured every 2 days, and clinical signs were recorded daily. (B) At 4 dpi, 4 infected mice were euthanized, and different organs were collected. Virus titers were determined using the TCID₅₀ method and are expressed in log₁₀ of TCID₅₀/g of tissue. The dotted line represents the positivity threshold (1.5 log₁₀ TCID₅₀/g of organ).

(nasal turbinates, trachea, and lungs) were collected and homogenized. The homogenates were used to inoculate three new mice intranasally again. We performed 5 serial passages and then infected eight DBA/2 mice intranasally with the “mouse passage 5” virus (D/5920-M5). Each passage was titrated to confirm the presence of the virus.

The DBA/2 mice infected with the D/5920-M5 virus did not show clinical signs or weight loss, as observed with DBA/2 mice infected with nonadapted virus (Fig. 8A). All of the mice infected with the D/5920-M5 virus seroconverted, with antibody titers similar to those observed with mice infected with nonadapted virus. The viral replication at 4 dpi was assessed in the different organs. IDV tissue tropism was unchanged, as it replicated in respiratory organs and intestines. Moreover, the viral titers were similar between mice infected with nonadapted and mouse passage 5 virus in nasal turbinates ($10^{4.1}$ to 10^5 TCID₅₀/g), trachea ($10^{3.6}$ to $10^{4.3}$ TCID₅₀/g), lungs ($10^{3.1}$ to $10^{3.4}$ TCID₅₀/g), and intestines ($10^{3.1}$ to $10^{4.4}$ TCID₅₀/g) compared with mice infected with nonadapted virus ($P > 0.05$) (Fig. 8B).

We then performed whole-genome sequencing on the D/5920-M5 homogenate. No mutations were observed in the PB1, PB2, P3, NS, and M1 genes. A single substitution (nucleotide [nt] C842T, amino acid [aa] A281V) was observed on the HEF gene.

These results suggested that adaptation did not increase the pathogenicity of IDV (clinical signs or higher viral replication) or that the number of passages (5 passages) was not sufficient to adapt the virus.

DISCUSSION

This study aimed to develop a murine model in order to understand the pathogenesis of a recently identified virus, influenza D virus (IDV).

IDV and absence of clinical signs in mice. In this study, DBA/2 mice infected with D/5920 did not present respiratory or general clinical signs or weight loss. IDV does not seem to induce disease in mice, as observed in guinea pigs, ferrets, and specific-pathogen-free (SPF) and feral swine models. This contrasts with IAV infection in mice, where mortality and/or morbidity is often observed with high doses of low-pathogenic virus, with mouse-adapted strains, or with highly pathogenic strains (32, 41). IDV was discovered recently, and so far, the pathogenicity of the viral strains remains unknown. We cannot exclude the possibility that the D/5920 strain is more or less pathogenic than are other IDV strains, but further analyses, such as the screening of different viral strains *in vivo*, could help answer this question. It is likely that the viral dose used for the infection was not responsible for the absence of clinical signs; indeed, we used 10^5 TCID₅₀, which is a strong dose in mice. The minimal infectious dose for IDV in mice remains unknown, and an

experiment with mice infected with different doses of IDV would help determine if the infective dose may play a role in the induction of clinical signs. In the calf model, a dose of 10^7 TCID₅₀ of D/5920 was used, and only mild clinical signs were observed (29).

The absence of pathogenesis in mice has also been observed with other respiratory viruses, such as the highly prevalent bovine and human respiratory syncytial viruses (bRSV and hRSV, respectively). Several studies used BALB/c mice to reproduce the clinical signs, viral replication, and immune response of hRSV. Almeida et al. developed a murine BALB/c model of bRSV; however, the mice did not present clinical signs, and the virus was difficult to detect using PCR (42). In another study, BALB/c mice were infected with recombinant hRSV expressing the firefly luciferase protein. Despite replication in the mouse respiratory tract, the mice did not present any clinical signs or mortality (43).

IDV adaptation in mice. Sreenivasan et al. suggested that viruses from the swine D/OK-like clade and from the bovine D/660-like clade may have different tropisms in guinea pigs (30). They hypothesized that the recognition of the HEF glycoprotein to its receptor may vary depending on the clade. A mutation in the binding site of the HEF glycoprotein was observed between isolates from swine D/OK-like (K212) and bovine D/660-like clades (R212); this mutation may modify the specificity and affinity of HEF for its cellular receptor and thus may modify tissue tropism between the two clades (21). So far, the potential differences of IDV strains have not been studied.

As mice are not the main host for IDV, viral adaptation may be required to induce disease. We attempted to adapt the IDV in DBA/2 mice in order to see if this would reveal clinical signs or an increase in viral replication. Many IAV strains indeed need adaptation to induce disease or even viral replication in mice (32, 44). Here, we performed five serial passages in mice to obtain a virus named D/5920-M5. DBA/2 mice infected with D/5920-M5 did not present clinical signs or a significant increase in viral replication at 4 dpi compared to DBA/2 mice infected with original virus. We observed very little genetic adaptation in mice; indeed, full-genome sequencing showed that adaptation only induced one mutation in the HEF gene (not located in the receptor binding site). In comparison, 6 amino acid mutations were observed on D/bovine/Oklahoma/660/2013 after one passage in the guinea pig model (30).

The number of serial passages was maybe not sufficient to adapt IDV to DBA/2 mice. For example, an adaptation of seasonal H1N1 (A/Brisbane/59/2007) virus in mice showed that mice presented clinical signs from the fifth passage and mortality from the sixth. A higher level of viral replication was also observed after the fifth passage in mice (45). For influenza B virus (IBV), clinical signs and an increase in viral replication were observed after 12 passages in mice (46). D/5920, however, did not lose fitness in mice after passages, as evident by similar titers and tissue tropisms. Another hypothesis is that IDV may not induce disease in mice no matter the number of passages. However, we noticed an important D/5920 adaptation in swine testis (ST) cells. Our inoculum virus, passaged 5 times on ST cells, was indeed different from the initially sequenced D/5920 virus, with 2 mutations in HEF (G628A and G684A) suggesting adaptation in cells (data not shown). It is unknown whether a wild-type, non-cell-culture-adapted virus would be virulent in mice.

IDV's tropism in mice is respiratory but also enteric. The limited literature available on IDV pathogenesis *in vivo* suggested a respiratory tropism of the pathogen. In ferrets and pigs, IDV replicated in nasal turbinates only (1). In calves and guinea pigs, virus replicated in both the upper and lower respiratory tract (28–30).

Our findings confirmed the respiratory tropism of D/5920 in mice. Here, D/5920 (D/OK-like clade) replicated mainly in the upper respiratory tract, with a peak at 4 dpi (nasal turbinates). We also observed replication to a lower extent in the middle (trachea) and lower respiratory tract, as observed in a guinea pig model (30). Contrary to this model, we observed lesions only in the nasal turbinates but not in the lungs of mice. We also noticed a time difference between virus detection and microscopic lesions for D/5920 infection

(positive virus detection data at 4 dpi and microscopic lesions at 6 dpi). The immune response at 6 dpi may be sufficient to inhibit IDV replication and avoid more severe lesions. Interestingly, viral replication was similar to that observed in the main host, bovines, experimentally (29). In the calf model developed by Salem et al., the viral strain D/5920 replicated both in the upper and lower respiratory tract (29). In this model, the virus was detected at a higher titer in nasal swabs ($5.6 \cdot 10^8$ RNA copies/ml) than in bronchoalveolar lavage fluid ($1.4 \cdot 10^5$ RNA copies/ml), and also with similar titers in organs (lungs and nasal mucosa).

IDV was also detected with low titers in the intestines, but no lesions were observed. Previous studies of IAV infection showed high titers of H1N1 viruses in the respiratory tract and low titers in the intestines and feces of DBA/2 mice (47). Bao et al. also observed low titers of H7N9 in BALB/c intestines (48). No IDV (or with very low titers) has been detected in the enteric organs so far in other experimental models (intestines for ferrets [1] and rectal swabs for a calf model [28, 29]). The differences in physiology and receptor expression in the intestines could be responsible for these results. In a recent study, however, IDV was detected in rectal swabs from goats, suggesting that IDV could present an enteric tropism or could be orally transmitted in other susceptible species (9). Unfortunately, no rectal swabs were so far tested for cattle or swine in the field, which makes difficult to determine if IDV harbors an enteric tropism. IDV is able to bind cells through 9-O-acetylated sialic acids expressed on the cell surface (49). So far, the presence of 9-O-acetylated sialic acids has not been demonstrated in mouse intestines. However, a study demonstrated that rats express these sialic acids in the intestines, suggesting that it could be the same in mice (50). Here, we cannot exclude the possibility of oral contamination during infection.

Surprisingly, IDV was detected in mouse livers with low titers at 2 dpi, while blood samples were negative at the same time point. Transient viremia may occur early in the course of IDV infection. Blood samples collected in the first hours postinfection would help us understand if IDV indeed causes viremia. It was previously suggested that IAV could be viremic in mice. Indeed, virus was detected in the red blood cell fraction in the early step of infection, but it was virus strain dependent and required high PCR sensitivity and a high dose of inoculum (51). Recently, a study from China detected IDV in diseased dairy cattle, buffalo, and goat serum samples using PCR (9). Transient viremia was also observed in feral swine and calf experimental models. The virus was detected at 3 and 5 dpi in feral swine and 3 and 5 dpi in cattle, with around $3 \log_{10}$ TCID₅₀/ml in both studies, suggesting that IDV induces viremia (31, 52). We hypothesize that IDV could pass into the bloodstream using blood vessels in nasal turbinates and thus infect other tissues, such as those of the liver or the intestines. Further evidence, however, is warranted to really assess the putative viremia associated with IDV in mice. Our IHC findings confirm the presence of IDV in nasal turbinates but not in any other organs (Fig. 3). This suggests either that the sensitivity of the technique does not allow for the detection of low levels of virus or that the nonrespiratory tissues may carry virus without it replicating locally. Previously, IDV seemed to harbor a respiratory tropism in the field and in all animal models (1, 28, 30). Most IDV studies focused on the respiratory tract, except for a pathogenesis study in ferrets, where no IDV replication was observed outside the respiratory tract (1). We now have confirmed the respiratory tropism of IDV, but our findings also warrant further investigation of a putative viremia and/or intestinal tropism of the pathogen at least in mice.

Influenza viruses and the humoral immune response. The antibody response likely plays an important role in controlling IDV infection, as it does for IAV infection. Previously, when several antigens were used to determine the titer of IDV antibodies in ruminant sera using a hemagglutination inhibition assay, 2-fold differences in titers were observed in average (19), suggesting a limited antigenic diversity between the 2 IDV clades (genotypes). In contrast, here, all infected mice seroconverted at 14 dpi, with antibody titers ranging from 1:15 to 1:240 against the homologous strain and from 1:20 to 1:40 against a

heterologous strain (D/Neb or D/5920), suggesting a high antigenic difference between the two clades, as was initially observed in the United States by Collin et al. (21).

A mild proinflammatory response is sufficient to clear IDV infection. To understand the immune response against IDV in mice, we analyzed 36 genes involved in innate and adaptive responses using transcriptomics. Previously, the immune response was analyzed only in the calf model, using both transcriptomics and proteomics (29). IDV seems to induce a mild innate response in mice. Here, we observed differences between the mouse and calf models. First, we observed a lower induction of proinflammatory gene expression in mice than in calves. The greater IDV fitness in calves than that in mice could explain these differences, although we cannot exclude the possibility that the immune response in calves contributes to the clinical outcome.

Differences between the calf and mouse models could also be explained by the type of samples and the times of sample collection; bronchoalveolar lavage fluid was used for calves versus lung and spleen homogenates used for mice, and the immune response was measured at 2, 4, and 6 dpi in mice but at 2, 7, and 14 dpi in calves. The methodology and biostatistical analyses used for the two studies (microfluidic quantitative PCR [qPCR] on the platform BioMark for calves and classical real-time RT-PCR on a LightCycler for mice) were different. Indeed, the immune response was monitored for each time point with the same calves, and the statistical analysis was performed using a linear mixed model with random effect for group, considering interactions between time and status (infected or control). In the mouse model, one mouse was used at each time point, modifying the data analysis.

Another difference between the two models was the pattern of gene overexpression after IDV infection. A higher number of genes was overexpressed in calves than in mice. The highest fold changes between infected and control mice were observed for IFN- γ , IL-1 β , and CCL5 at 2 dpi and TLR7 at 6 dpi in the lungs, and for RIG-I, CCL2, and TGF- β 1 at 4 dpi and NF- κ B at 4 to 6 dpi in the spleen. In calves, an overexpression of RIG-I, TGF- β 1, IFN- γ , and CCL2 at the different time points was observed. Moreover, an increase in TLR, chemokine, cytokine, and pathway molecule transcript levels was also observed in calves. No overexpression of NF- κ B, IL-1 β , and CCL5 was, however, recorded in this model, but the different methodologies could be responsible for this observation (29).

TLR7 is an endosomal TLR and recognizes single-stranded RNA (ssRNA), whereas RIG-I recognizes RNA bearing a 5'-triphosphate end (53). The activation of TLR7 and RIG-I led to the recruitment of transcriptional factors such as NF- κ B and then the production of cytokines. IDV infection induced an increase in NF- κ B and in IL-1 β , TGF- β 1, CCL2, and CCL5 transcript levels in the lungs or spleen of mice. These molecules are produced by epithelial cells, neutrophils, and monocytes during the first step of the immune response. CCL2 and CCL5 are proinflammatory chemokines involved in the recruitment of T cells and monocytes. TGF- β 1 is involved in the regulation of immune response, both inflammatory and regulatory. Recently, it has been demonstrated that TGF- β 1 acts as a proviral molecule in the lungs of mice infected by IAV by inhibiting the type I interferon response (54). The early overexpression of IFN- γ and CCL5 suggests the involvement of NK cells during IDV infection. Indeed, CCL5 is known to recruit NK cells in the lungs of mice infected with IAV (55). It has been demonstrated that NK cells are important during the early stage of IAV infection by secreting different cytokines, including IFN- γ , and also acting as cytotoxic cells. The production of IFN- γ by NK cells also stimulates the activation of macrophages (56, 57).

Finally, at 6 dpi, mild overexpression of Gata-3 and T-bet transcription factors suggests the activation of mixed and local Th1/Th2 lymphocyte responses, as observed in the calf model (29). Contrary to the observation in the calf model, we did not detect IFN- γ or IL-13 overexpression in the latest stage of IDV infection. Their secretion in mice may occur at a later point (after 6 dpi).

In order to confirm the mild inflammation induced by IDV infection, we inoculated NF- κ B-luciferase mice. This mouse model was previously used for IAV infection. Indeed,

NF- κ B-luciferase mice infected with 1.10^5 PFU of A/WSN/1933 (H1N1) developed clinical signs and presented a high level of inflammation, with detection of luciferase starting at 1 dpi, reaching a peak at 2 to 3 dpi in the respiratory tract, and showing systemic inflammation after 3 dpi (58).

Here, we did not observe clinical signs during IDV infection. Moreover, we only observed a mild and two-phase response after infection at 2 and 5 dpi. The inflammation observed at 2 and 5 dpi in NF- κ B-luciferase mice seems to correlate with the time pattern of cytokine expression observed in DBA/2 mice and viral replication at 4 dpi. Moreover, the intensity of inflammation in NF- κ B-luciferase mice correlates with the mild overexpression of proinflammatory genes in DBA/2 mice. Unfortunately, a transcriptomic method cannot allow us to discriminate which cells are secreting the cytokines. Analyses with flow cytometry could help us gain a better understanding of the immune response after IDV infection in mice. In NF- κ B-luciferase mice, we can hypothesize that the inflammation observed at 2 dpi could be induced by the infected epithelium of respiratory organs. These cells are the first target of influenza virus and induce a rapid production of antiviral, proinflammatory, and chemotactic molecules after TLR induction. Airway epithelial cells produce IFN-I and cytokines such as IL-1, IL-6, and CCL5 during the first 3 to 6 h postinfection to target the virus and recruit and polarize the immune cells (59). The second peak of inflammation at 5 dpi in NF- κ B-luciferase mice could be induced by the other cells involved in innate immunity, such as monocytes, macrophages, and neutrophils, which also secrete proinflammatory cytokines during infection.

In infected DBA/2 mice, we did not detect overexpression of IFN-I, but we observed an increase in IRF3 and 2',5'-OAS transcript levels, suggesting the involvement of this pathway during IDV infection. Type I IFNs are critical in the anti-IAV response in mice (40, 60). In order to determine the role of these proteins during IDV infection, *lfnar1*^{-/-} mice, which do not express the receptor for IFN-I, were infected with D/5920. These mice did not present clinical signs or higher level of viral replication than with DBA/2 mice.

Four hypotheses could explain our results. The first is that IFN-I are not involved in the immune response against IDV. Another possibility is that IFN-I would be involved in the immune response but the virus would inhibit them rapidly after secretion, hence the absence of overexpression or differences in *lfnar1*^{-/-} mice. IAV escape from the immune system occurs thanks to the NS1 protein. It has been demonstrated that NS1 inhibits IFN-I by the inhibition of STAT1 and STAT2 phosphorylation and upregulation of the JAK/STAT inhibitors SOCS1 and SOCS3 (61).

Our results are supported by the results obtained in the calf model. Indeed, no overexpression of IFN-I or IFN-I pathway molecules was observed in calves infected with D/5920. Salem et al. observed overexpression of SOCS1 and SOCS3 (29). In DBA/2 mice, we unfortunately failed to detect SOCS1 mRNA in both the lungs and spleen. Moreover, we did not also analyze SOCS3 transcripts; therefore, we are unable to further explore this hypothesis. Thus, analyses are required to understand the involvement of the IFN-I response during IDV infection. The third hypothesis is the involvement of type III interferons (IFN-III) instead of IFN-I during IDV infection. These cytokines are also induced during IAV infection and stimulate the same interferon-stimulated genes (ISGs) as IFN-I (62). Here, we did not observe overexpression of IFN- λ in the lungs and spleen of DBA/2 mice, suggesting that IFN-III are not major players in the immunity against IDV. It is also possible that SOCS1 and SOCS3 are able to inhibit these interferons, as IFN-III use the same signaling pathway as IFN-I (62). Finally, since the *lfnar1*^{-/-} mice used here were not generated on a DBA/2 strain (but on a C57Bl/6 strain), one cannot rule out that the genetic background plays a role on mouse susceptibility to IDV infection (hypothesis 4). However, 10 wild-type C57Bl/6 mice were infected with IDV as a control, and virus replication was observed in the respiratory tract with titers similar to those in DBA/2 mice (data not shown).

In summary, despite the absence of clinical signs, mice were susceptible to IDV infection. IDV replicated mainly in the upper respiratory tract, corroborating the notion

that IDV presents a respiratory tropism. IDV might also induce viremia and show a slight enteric tropism. Little is known about the immune response against IDV. Susceptible hosts, including mice, seroconverted after infection, suggesting a strong antibody response (IgG), but the induced innate and cellular responses are still to be fully assessed. Taken together, mice are a convenient and relevant small-animal model to study IDV viral replication and will help better understand the phenotypes associated with different strains of the recently discovered pathogen. It could also be a useful model to study the immune response through transgenic mice and the availability of reagents. Disease, however, cannot be reproduced in DBA/2 mice, and further studies are warranted to develop a more relevant model to study IDV pathogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Cells and viruses. Swine testis cells (ATCC) were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) complemented with 10% fetal bovine serum and penicillin-streptomycin (Dutscher) and incubated for 24 h at 37°C with 5% CO₂. In this study, we used the viral strain D/bovine/France/5920/2014 (D/5920) (29). Viruses were grown on ST cells in Opti-MEM medium complemented with penicillin-streptomycin (Dutscher) at 37°C and 5% CO₂ for 5 days. Viruses were stored at -80°C until further used. The virus titers were determined by the TCID₅₀, as described below.

Mice. Six- and 10-week-old female DBA/2Jrj mice were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). Twelve-week-old *Irfar1*^{-/-} (C57BL/6 backbone) mice were bred at IBPS (Toulouse). Ten-week-old NF-κB-luciferase BALB/c mice were bred at INRA-VIM (Jouy-en-Josas). The DBA/2 and *Irfar1*^{-/-} mice were housed at the Veterinary School of Toulouse in animal biosafety level 2 (ABSL-2) facilities and had food and water provided *ad libitum*. NF-κB-luciferase BALB/c mice were housed at INRA of Jouy-en-Josas (France) in ABSL-2 facilities as well. Experimentations were conducted in accordance with European and French legislations on Laboratory Animal Care and Use (French Decree 2001-464 and European Directive CEE86/609), and the animal protocol was approved by the ethics committee Sciences et Santé Animale, committee number 115 (protocol no. 2018030212288103) and by the Animal Care and Use Committee at Centre de Recherche de Jouy-en-Josas (COMETHEA) (protocol no. 2015100910396112v1).

Experimental design. (i) Infection of DBA/2 mice. Six-week-old female DBA/2Jrj mice were separated in two groups, with 11 noninfected (controls) mice and 36 infected mice. Mice were lightly anesthetized with a ketamine-xylazine combination and infected with 30 μl of virus intranasally or with PBS as a control. Clinical observations were recorded daily, and weight was measured every 2 days. Any animal showing a weight loss greater than 30% or signs of suffering was humanely euthanized. Mice were infected intranasally with 10⁵ TCID₅₀ of D/5920. Necropsies were performed at 2, 4, 6, and 8 dpi (5 infected mice per day), and brain, nasal turbinate, tracheal, lung, spleen, liver, kidney, and intestinal (duodenum, jejunum, and colon) tissues were sampled. Blood was also collected at 2, 6, and 14 dpi. All the mice were euthanized at 14 dpi.

(ii) Comparison between DBA/2 and *Irfar1*^{-/-} mice. Ten-week-old female DBA/2Jrj mice and 12-week-old *Irfar1*^{-/-} mice were separated into two groups, with 11 noninfected (controls) and 11 infected DBA/2 mice and 7 noninfected (3 females and 4 males) and 10 infected (5 males and 5 females) *Irfar1*^{-/-} mice. Mouse infection and monitoring were performed as described above.

Necropsies were performed at 2, 4, and 6 dpi for DBA/2 mice with 3 noninfected and 3 infected mice per day. For *Irfar1*^{-/-} mice, necropsies were performed only at 4 dpi (1 female noninfected and 2 females infected, and 2 males noninfected and 2 males infected). The brain, nasal turbinates, trachea, lungs, spleen, liver, kidneys, and intestines were collected and treated as described in Materials and Methods. Blood was collected at 14 dpi before the remaining mice were euthanized.

(iii) Infection of NF-κB-luciferase mice. Ten-week-old NF-κB-luciferase mice were separated into two groups, with 5 noninfected (controls) and 8 infected mice. Infection was performed under anesthesia, and 10⁵ TCID₅₀ of D/5920 were inoculated intranasally in mice. Control mice were inoculated with PBS. Weight loss and clinical signs were recorded daily. Bioluminescence measurements were performed from 1 to 7 dpi. Mice were anesthetized with isoflurane (2% in oxygen as a carrier gas), and luminescence was measured 2 min after intranasal inoculation of 50 μl of PBS containing luciferin (0.75 mg kg⁻¹; Sigma). Luciferase activity was measured using the Living Image software (version 4.0; PerkinElmer). Bioluminescence images were acquired for 1 min with f/stop = 1 and binning = 8. A digital false-color photon emission image of the mouse was generated, and photons were counted within the whole-body area. Photon emission was measured as radiance in p s⁻¹ cm⁻² sr⁻¹ (58).

(iv) Adaptation of IDV in DBA/2 mice. Six-week-old female DBA/2Jrj mice were infected with 10⁵ TCID₅₀ of D/5920 intranasally. Necropsies were performed at 4 dpi for three mice, and nasal turbinates, trachea, and lungs were collected and the tissues homogenized. The pure homogenate was used to intranasally infect three naive mice (30 μl/mouse) and titrated in parallel using the TCID₅₀ method. After five serial passages, 16 DBA/2 mice were separated in two groups, with 8 noninfected (controls) mice and 8 mice infected intranasally with 30 μl of mouse-passaged IDV (D/5920-M5). Clinical observations were recorded daily, and necropsies were performed at 4 dpi (3 mice infected and 3 mice noninfected; the organs collected were the brain, nasal turbinates, trachea, lungs, spleen, liver, kidneys, and intestines). Blood was collected at 14 dpi before euthanasia of the remaining mice.

Sample treatments. Whole organs were dissociated using the tissue homogenizer Precellys 24 (Ozyme), resuspended in 500 μl of PBS, centrifuged, and stored at -80°C until further analysis. Blood was also taken at the end of the experiments (14 dpi) for serology. Blood was taken at 2 dpi and 6 dpi to study viremia.

Determination of virus titers by TCID₅₀. All samples from infected mice were titrated using the 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀), as described elsewhere (63), using ST cells and with a 5-day culture. The titers were determined using the Reed and Muench method (64). A positivity threshold was set at 1.5 log₁₀ TCID₅₀/g of organ.

Real-time PCR to study the immune response. The real-time RT-PCR for immune response quantification was performed using the iTaq Universal SYBR green one-step kit (Bio-Rad), and the primer sequences are available upon request. For the relative quantification, we used a housekeeping gene (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [GAPDH]) to normalize the amount of the target gene. We used the following calibrator formula: $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Here, C_T is the cycle threshold, and $\Delta\Delta C_T$ represents the following: ΔC_T (sample) ($[C_{T_{\text{cytokine gene}}} - C_{T_{\text{housekeeping gene}}}]$ of infected mice) $- \Delta C_T$ (calibrator) ($[C_{T_{\text{cytokine gene}}} - C_{T_{\text{housekeeping gene}}}]$ of noninfected mice). The mean ΔC_T values were used for analysis, and the results are represented as the mean \pm standard deviation (SD).

Hemagglutination inhibition assay. Sera were treated with receptor-destroying enzyme (RDE; Seika), following the manufacturer's instructions. Then, they were hemadsorbed on packed horse red blood cells. The HI assay was performed as previously described (29), with 4 hemagglutination units (UHA) of D/bovine/France/5920/2014 or D/bovine/Nebraska/9-5/2012 and 1% horse red blood cells.

Histology and immunocytochemistry. At 2 dpi and 6 dpi, organs were collected and fixed in 10% paraformaldehyde for 2 days. Nasal turbinates were decalcified in EDTA for 1 week. After fixation, tissues were routinely processed in paraffin blocks, sectioned at 3 μ m, and stained with hematoxylin and eosin for microscopic examination. Lesions were assessed histologically and graded as follows: $-$, no lesion; $+$, light lesions; $++$, moderate lesions; and $+++$, marked lesions.

Immunoreaction was performed on the paraffin-embedded sections with an in-house polyclonal rabbit anti-IDV antibody (0.05% pronase retrieval solution, 10 min at 37°C; antibody dilution 1/1,000, incubation overnight at 4°C) after a blocking step with normal goat serum (1/10 dilution; catalog no. X0907; Dako). The anti-IDV antibody was revealed with a biotinylated polyclonal goat anti-rabbit immunoglobulin conjugated with horseradish peroxidase (HRP; LSAB2 system-HRP, catalog no. K0675; Dako) and the diaminobenzidine chromogen of the HRP (catalog no. TA-125-HDX; Thermo Scientific).

Sequencing. Viral RNA was extracted from organ homogenates or from cell culture supernatant for the inoculum, as described above, and cDNA was generated using the RevertAid reverse transcriptase (RT) kit (Thermo Fisher), according to the manufacturer's instructions. PCR was performed for each gene segment using Phusion high-fidelity polymerase (Thermo Fisher) and previously published primers (12). The PCR products were purified using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Sanger sequencing was performed using the GATC Biotech platform (Germany), and the sequences were aligned with ClustalW, available on BioEdit (65), and compared with reference D/5920 sequences.

Statistics. The variations in the weights of the mice were analyzed using a two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Bonferroni multiple-comparison test. The viral (TCID₅₀) titers were compared with a one-way ANOVA, followed by the Tukey multiple-comparison test. The fold changes in mRNA transcript levels for the immune response were compared using a one-way ANOVA, followed by Dunn's multiple-comparison test. Statistical tests were performed using GraphPad Prism 5.0. A *P* value of ≤ 0.05 was considered significant.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jean-Marc Delmas and Marion Robine (ENVT) for their help in the animal facility and Séverine Boullier for providing us with horse blood.

This work was funded by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR), project FLUD. J. Oliva is supported by a PhD scholarship of the French Ministry of Higher Education and Research. We thank the MIMA2 platform for access to IVIS200, which was acquired with funds from the Ile de France région (SESAME).

REFERENCES

- Hause BM, Ducatez M, Collin EA, Ran Z, Liu R, Sheng Z, Armien A, Kaplan B, Chakravarty S, Hoppe AD, Webby RJ, Simonson RR, Li F. 2013. Isolation of a novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses. *PLoS Pathog* 9:e1003176. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003176>.
- Hause BM, Collin EA, Liu R, Huang B, Sheng Z, Lu W, Wang D, Nelson EA, Li F. 2014. Characterization of a novel influenza virus in cattle and swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. *mBio* 5:e00031-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.00031-14>.
- Ferguson L, Eckard L, Epperson WB, Long L-P, Smith D, Huston C, Genova S, Webby R, Wan X-F. 2015. Influenza D virus infection in Mississippi beef cattle. *Virology* 486:28–34. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.08.030>.
- Luo J, Ferguson L, Smith DR, Woolums AR, Epperson WB, Wan X-F. 2017. Serological evidence for high prevalence of influenza D viruses in Cattle, Nebraska, United States, 2003–2004. *Virology* 501:88–91. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.11.004>.
- Zhang M, Hill JE, Fernando C, Alexander TW, Timsit E, van der Meer F, Huang Y. 2019. Respiratory viruses identified in western Canadian beef cattle by metagenomic sequencing and their association with bovine respiratory disease. *Transbound Emerg Dis* 66:1379–1386. <https://doi.org/10.1111/tbed.13172>.
- Mitra N, Cernicchiaro N, Torres S, Li F, Hause BM. 2016. Metagenomic characterization of the virome associated with bovine respiratory disease in feedlot cattle identified novel viruses and suggests an etiologic role for influenza D virus. *J Gen Virol* 97:1771–1784. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000492>.
- Murakami S. 2016. Influenza D virus infection in herd of cattle, Japan. *Emerg Infect Dis* 22:1517–1519. <https://doi.org/10.3201/eid2208.160362>.
- Horimoto T, Hiono T, Mekata H, Odagiri T, Lei Z, Kobayashi T, Norimine

- J, Inoshima Y, Hikono H, Murakami K, Sato R, Murakami H, Sakaguchi M, Ishii K, Ando T, Otomaru K, Ozawa M, Sakoda Y, Murakami S. 2016. Nationwide distribution of bovine influenza D virus infection in Japan. *PLoS One* 11:e0163828. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163828>.
9. Zhai S, Zhang H, Chen S, Zhou X, Lin T, Liu R, Lv D, Wen X, Wei W, Wang D, Li F. 2017. Influenza D virus in animal species in Guangdong Province, southern China. *Emerg Infect Dis* 23:1392–1396. <https://doi.org/10.3201/eid2308.170059>.
 10. Jiang W-M, Wang S-C, Peng C, Yu J-M, Zhuang Q-Y, Hou G-Y, Liu S, Li J-P, Chen J-M. 2014. Identification of a potential novel type of influenza virus in bovine in China. *Virus Genes* 49:493–496. <https://doi.org/10.1007/s11262-014-1107-3>.
 11. Mekata H, Yamamoto M, Hamabe S, Tanaka H, Omatsu T, Mizutani T, Hause BM, Okabayashi T. 2017. Molecular epidemiological survey and phylogenetic analysis of bovine influenza D virus in Japan. *Transbound Emerg Dis* 65:e355–e360. <https://doi.org/10.1111/tbed.12765>.
 12. Ducatez MF, Pelletier C, Meyer G. 2015. Influenza D virus in cattle, France, 2011–2014. *Emerg Infect Dis* 21:368–371. <https://doi.org/10.3201/eid2102.141449>.
 13. Oliva J, Eichenbaum A, Belin J, Gaudino M, Guillotin J, Alzieu J-P, Nicollet P, Brugidou R, Gueneau E, Michel E, Meyer G, Ducatez MF. 2019. Serological evidence of influenza D virus circulation among cattle and small ruminants in France. *Viruses* 11:516. <https://doi.org/10.3390/v11060516>.
 14. Foni E, Chiapponi C, Baioni L, Zanni I, Merenda M, Rosignoli C, Kyriakis CS, Luini MV, Mandola ML, Bolzoni L, Nigrelli AD, Faccini S. 2017. Influenza D in Italy: towards a better understanding of an emerging viral infection in swine. *Sci Rep* 7:11660. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12012-3>.
 15. Chiapponi C, Faccini S, De Mattia A, Baioni L, Barbieri I, Rosignoli C, Nigrelli A, Foni E. 2016. Detection of influenza D virus among swine and cattle, Italy. *Emerg Infect Dis* 22:352–354. <https://doi.org/10.3201/eid2202.151439>.
 16. Flynn O, Gallagher C, Mooney J, Irvine C, Ducatez M, Hause B, McGrath G, Ryan E. 2018. Influenza D virus in cattle, Ireland. *Emerg Infect Dis* 24:389–391. <https://doi.org/10.3201/eid2402.170759>.
 17. Snoeck C, Oliva J, Pauly M, Losch S, Wildschutz F, Muller C, Hübschen J, Ducatez M. 2018. Influenza D virus circulation in cattle and swine, Luxembourg, 2012–2016. *Emerg Infect Dis* 24:1388–1389. <https://doi.org/10.3201/eid2407.171937>.
 18. Dane H, Duffy C, Guelbenzu M, Hause B, Fee S, Forster F, McMenamy MJ, Lemon K. 2019. Detection of influenza D virus in bovine respiratory disease samples, U.K. *Transbound Emerg Dis* 66:2184–2187. <https://doi.org/10.1111/tbed.13273>.
 19. Salem E, Cook E, Lbacha H, Oliva J, Awoume F, Aplong G, Couacy Hymann E, Muloi D, Deem S, Alali S, Zouagui Z, Fèvre E, Meyer G, Ducatez M. 2017. Serologic evidence for influenza C and D virus among ruminants and camelids, Africa, 1991–2015. *Emerg Infect Dis* 23:1556–1559. <https://doi.org/10.3201/eid2309.170342>.
 20. Murakami S, Odagiri T, Melaku SK, Bazartseren B, Ishida H, Takenaka-Uema A, Muraki Y, Sentsui H, Horimoto T. 2019. Influenza D virus infection in dromedary camels, Ethiopia. *Emerg Infect Dis* 25:1224–1226. <https://doi.org/10.3201/eid2506.181158>.
 21. Collin EA, Sheng Z, Lang Y, Ma W, Hause BM, Li F. 2015. Cocirculation of two distinct genetic and antigenic lineages of proposed influenza D virus in cattle. *J Virol* 89:1036–1042. <https://doi.org/10.1128/JVI.02718-14>.
 22. Quast M, Sreenivasan C, Sexton G, Nedland H, Singrey A, Fawcett L, Miller G, Lauer D, Voss S, Pollock S, Cunha CW, Christopher-Hennings J, Nelson E, Li F. 2015. Serological evidence for the presence of influenza D virus in small ruminants. *Vet Microbiol* 180:281–285. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.09.005>.
 23. Nedland H, Wollman J, Sreenivasan C, Quast M, Singrey A, Fawcett L, Christopher-Hennings J, Nelson E, Kaushik RS, Wang D, Li F. 2017. Serological evidence for the co-circulation of two lineages of influenza D viruses in equine populations of the Midwest United States. *Zoonoses Public Health* 65:e148–e154. <https://doi.org/10.1111/zph.12423>.
 24. Eckard L. 2016. Assessment of the zoonotic potential of a novel bovine influenza virus. PhD dissertation. University of Tennessee Health Science Center, Memphis, TN.
 25. White SK, Ma W, McDaniel CJ, Gray GC, Lednicky JA. 2016. Serologic evidence of exposure to influenza D virus among persons with occupational contact with cattle. *J Clin Virol* 81:31–33. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.05.017>.
 26. Borkenhagen LK, Mallinson KA, Tsao RW, Ha S-J, Lim W-H, Toh T-H, Anderson BD, Fieldhouse JK, Philo SE, Chong K-S, Lindsley WG, Ramirez A, Lowe JF, Coleman KK, Gray GC. 2018. Surveillance for respiratory and diarrheal pathogens at the human-pig interface in Sarawak, Malaysia. *PLoS One* 13:e0201295. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201295>.
 27. Belser JA, Katz JM, Tumpey TM. 2011. The ferret as a model organism to study influenza A virus infection. *Dis Model Mech* 4:575–579. <https://doi.org/10.1242/dmm.007823>.
 28. Ferguson L, Olivier AK, Genova S, Epperson WB, Smith DR, Schneider L, Barton K, McCuan K, Webby RJ, Wan X-F. 2016. Pathogenesis of influenza D virus in cattle. *J Virol* 90:5636–5642. <https://doi.org/10.1128/JVI.03122-15>.
 29. Salem E, Hägglund S, Cassard H, Corre T, Näslund K, Foret C, Gauthier D, Pinard A, Delverdier M, Zohari S, Valarcher J-F, Ducatez M, Meyer G. 2019. Pathogenesis, host innate immune response and aerosol transmission of influenza D virus in cattle. *J Virol* 93:e01853-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01853-18>.
 30. Sreenivasan C, Thomas M, Sheng Z, Hause BM, Collin EA, Knudsen DEB, Pillatzki A, Nelson E, Wang D, Kaushik RS, Li F. 2015. Replication and transmission of the novel bovine influenza D virus in a guinea pig model. *J Virol* 89:11990–12001. <https://doi.org/10.1128/JVI.01630-15>.
 31. Ferguson L, Luo K, Olivier AK, Cunningham FL, Blackmon S, Hanson-Dorr K, Sun H, Baroch J, Lutman MW, Quade B, Epperson W, Webby R, DeLiberto TJ, Wan X-F. 2018. Influenza D virus infection in feral swine populations, United States. *Emerg Infect Dis* 24:1020–1028. <https://doi.org/10.3201/eid2406.172102>.
 32. Bouvier NM, Lowen AC. 2010. Animal models for influenza virus pathogenesis and transmission. *Viruses* 2:1530–1563. <https://doi.org/10.3390/v20801530>.
 33. Pica N, Iyer A, Ramos I, Bouvier NM, Fernandez-Sesma A, García-Sastre A, Lowen AC, Palese P, Steel J. 2011. The DBA.2 mouse is susceptible to disease following infection with a broad, but limited, range of influenza A and B viruses. *J Virol* 85:12825–12829. <https://doi.org/10.1128/JVI.05930-11>.
 34. Ibricevic A, Pekosz A, Walter MJ, Newby C, Battaile JT, Brown EG, Holtzman MJ, Brody SL. 2006. Influenza virus receptor specificity and cell tropism in mouse and human airway epithelial cells. *J Virol* 80:7469–7480. <https://doi.org/10.1128/JVI.02677-05>.
 35. Miao H, Hollenbaugh JA, Zand MS, Holden-Wiltse J, Mosmann TR, Perelson AS, Wu H, Topham DJ. 2010. Quantifying the early immune response and adaptive immune response kinetics in mice infected with influenza A virus. *J Virol* 84:6687–6698. <https://doi.org/10.1128/JVI.00266-10>.
 36. Groves HT, McDonald JJ, Langat P, Kinneer E, Kellam P, McCauley J, Ellis J, Thompson C, Elderfield R, Parker L, Barclay W, Tregoning JS. 2018. Mouse models of influenza infection with circulating strains to test seasonal vaccine efficacy. *Front Immunol* 9:126. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00126>.
 37. Ding Y, Cao Z, Cao L, Ding G, Wang Z, Xiao W. 2017. Antiviral activity of chlorogenic acid against influenza A (H1N1/H3N2) virus and its inhibition of neuraminidase. *Sci Rep* 7:45723. <https://doi.org/10.1038/srep45723>.
 38. Boon ACM, deBeauchamp J, Hollmann A, Luke J, Kotb M, Rowe S, Finkelstein D, Neale G, Lu L, Williams RW, Webby RJ. 2009. Host genetic variation affects resistance to infection with a highly pathogenic H5N1 influenza A virus in mice. *J Virol* 83:10417–10426. <https://doi.org/10.1128/JVI.00514-09>.
 39. Evseenko VA, Bukin EK, Zaykovskaya AV, Sharshov KA, Ternovoi VA, Ignatyev GM, Shestopalov AM. 2007. Experimental infection of H5N1 HPAI in BALB/c mice. *Virology* 361:477. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.04.022>.
 40. Arimori I, Nakamura R, Yamada H, Shibata K, Maeda N, Kase T, Yoshikai Y. 2013. Type I interferon limits influenza virus-induced acute lung injury by regulation of excessive inflammation in mice. *Antiviral Res* 99:230–237. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.05.007>.
 41. Kamal RP, Katz JM, York IA. 2014. Molecular determinants of influenza virus pathogenesis in mice, p 243–274. *In* Compans RW, Oldstone MBA (ed), *Influenza pathogenesis and control*, vol 1. Springer, Cham, Switzerland.
 42. Almeida RS, Domingues HG, Coswig LT, D'Arce RCF, de Carvalho RF, Arns CW. 2004. Detection of bovine respiratory syncytial virus in experimentally infected BALB/c mice. *Vet Res* 35:189–197. <https://doi.org/10.1051/vetres:2004003>.
 43. Rameix-Welti M-A, Le Goffic R, Hervé P-L, Sourimant J, Rémot A, Riffault S, Yu Q, Galloux M, Gault E, Eléouët J-F. 2014. Visualizing the replication of respiratory syncytial virus in cells and in living mice. *Nat Commun* 5:5104. <https://doi.org/10.1038/ncomms6104>.
 44. Barnard DL. 2009. Animal models for the study of influenza pathogenesis and therapy. *Antiviral Res* 82:A110–A122. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.12.014>.

45. Xu L, Bao L, Li F, Lv Q, Ma Y, Zhou J, Xu Y, Deng W, Zhan L, Zhu H, Ma C, Shu Y, Qin C. 2011. Adaptation of seasonal H1N1 influenza virus in mice. *PLoS One* 6:e28901. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028901>.
46. Kim E-H, Park S-J, Kwon H-I, Kim SM, Kim Y, Song M-S, Choi E-J, Pascua PNQ, Choi Y-K. 2015. Mouse adaptation of influenza B virus increases replication in the upper respiratory tract and results in droplet transmissibility in ferrets. *Sci Rep* 5:15940. <https://doi.org/10.1038/srep15940>.
47. Koçer ZA, Krauss S, Stallknecht DE, Rehg JE, Webster RG. 2012. The potential of avian H1N1 influenza A viruses to replicate and cause disease in mammalian models. *PLoS One* 7:e41609. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041609>.
48. Bao L, Xu L, Zhu H, Deng W, Chen T, Lv Q, Li F, Yuan J, Xu Y, Huang L, Li Y, Liu J, Yao Y, Yu P, Chen H, Qin C. 2014. Transmission of H7N9 influenza virus in mice by different infective routes. *Virol J* 11:185. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-185>.
49. Song H, Qi J, Khedri Z, Diaz S, Yu H, Chen X, Varki A, Shi Y, Gao GF. 2016. An open receptor-binding cavity of hemagglutinin-esterase-fusion glycoprotein from newly-identified influenza D virus: basis for its broad cell tropism. *PLoS Pathog* 12:e1005505. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005505>.
50. Klein A, Krishna M, Varki NM, Varki A. 1994. 9-O-Acetylated sialic acids have widespread but selective expression: analysis using a chimeric dual-function probe derived from influenza C hemagglutinin-esterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7782–7786. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7782>.
51. Mori I, Komatsu T, Takeuchi K, Nakakuki K, Sudo M, Kimura Y. 1995. Viremia induced by influenza virus. *Microb Pathog* 19:237–244. [https://doi.org/10.1016/S0882-4010\(95\)90290-2](https://doi.org/10.1016/S0882-4010(95)90290-2).
52. Zhang X, Outlaw C, Olivier AK, Woolums A, Epperson W, Wan X-F. 2019. Pathogenesis of co-infections of influenza D virus and Mannheimia haemolytica in cattle. *Vet Microbiol* 231:246–253. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.03.027>.
53. Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM, Peiris M, Kedzierska K, Doherty PC, Palese P, Shaw ML, Treanor J, Webster RG, García-Sastre A. 2018. Influenza. *Nat Rev Dis Primers* 4:3. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y>.
54. Denney L, Branchett W, Gregory LG, Oliver RA, Lloyd CM. 2018. Epithelial-derived TGF- β 1 acts as a pro-viral factor in the lung during influenza A infection. *Mucosal Immunol* 11:523–535. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.77>.
55. Carlin LE, Hemann EA, Zacharias ZR, Heusel JW, Legge KL. 2018. Natural killer cell recruitment to the lung during influenza A virus infection is dependent on CXCR3, CCR5, and virus exposure dose. *Front Immunol* 9:781. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00781>.
56. Schultz-Cherry S. 2015. Role of NK cells in influenza infection, p 109–120. *In* Oldstone MBA, Compans RW (ed), *Influenza pathogenesis and control*, vol II. Springer International Publishing, Cham, Switzerland.
57. Guo H, Kumar P, Malarkannan S. 2011. Evasion of natural killer cells by influenza virus. *J Leukoc Biol* 89:189–194. <https://doi.org/10.1189/jlb.0610319>.
58. Vidy A, Maisonnasse P, Costa BD, Delmas B, Chevalier C, Goffic RL. 2016. The influenza virus protein PB1-F2 increases viral pathogenesis through neutrophil recruitment and NK cells inhibition. *PLoS One* 11:e0165361. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165361>.
59. Oslund KL, Baumgarth N. 2011. Influenza-induced innate immunity: regulators of viral replication, respiratory tract pathology & adaptive immunity. *Future Virol* 6:951–962. <https://doi.org/10.2217/fvl.11.63>.
60. García-Sastre A. 2011. Induction and evasion of type I interferon responses by influenza viruses. *Virus Res* 162:12–18. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.10.017>.
61. Jia D, Rahbar R, Chan RWY, Lee SMY, Chan MCW, Wang BX, Baker DP, Sun B, Peiris JSM, Nicholls JM, Fish EN. 2010. Influenza virus non-structural protein 1 (NS1) disrupts interferon signaling. *PLoS One* 5:e13927. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013927>.
62. Jewell NA, Cline T, Mertz SE, Smirnov SV, Flaño E, Schindler C, Grieves JL, Durbin RK, Kotenko SV, Durbin JE. 2010. Lambda interferon is the predominant interferon induced by influenza A virus infection in vivo. *J Virol* 84:11515–11522. <https://doi.org/10.1128/JVI.01703-09>.
63. World Health Organization. 2002. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. World Health Organization, Geneva, Switzerland. <https://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/en/whocdscsmcs20025rev.pdf>.
64. Reed LJ, Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Epidemiol* 27:493–497. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>.
65. Hall T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* :95–98.



Targeting the Respiratory Syncytial Virus N⁰-P Complex with Constrained α -Helical Peptides in Cells and Mice

Marie Galloux,^a Nadège Gsponer,^e Vanessa Gaillard,^e Brice Fenner,^{e*} Thibaut Larcher,^b Marthe Vilotte,^c Julie Rivière,^{c,d} Charles-Adrien Richard,^a Jean-François Eléouët,^a Ronan Le Goffic,^a Joelle Mettier,^a  Origène Nyanguile^e

^aVIM, INRAE, Jouy-en-Josas, France

^bINRA, UMR 703 APEX, Nantes, France

^cUniversité Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, Jouy-en-Josas, France

^dUniversité Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, MICALIS, Jouy-en-Josas, France

^eHES-SO Valais-Wallis, Institute of Life Technologies, Sion, Switzerland

ABSTRACT Respiratory syncytial virus (RSV) is the main cause of severe respiratory infection in young children worldwide, and no therapies have been approved for the treatment of RSV infection. Data from recent clinical trials of fusion or L polymerase inhibitors for the treatment of RSV-infected patients revealed the emergence of escape mutants, highlighting the need for the discovery of inhibitors with novel mechanisms of action. Here we describe stapled peptides derived from the N terminus of the phosphoprotein (P) that act as replication inhibitors. We demonstrate that these peptides inhibit RSV replication *in vitro* and *in vivo* by preventing the formation of the N⁰-P complex. The present strategy provides a novel means of targeting RSV replication with constrained macrocyclic peptides or small molecules and is broadly applicable to other viruses of the *Mononegavirales* order.

KEYWORDS N⁰-P complex, RSV resistance mutants, antiviral agents, inhibitors, phosphoprotein, respiratory syncytial virus, stapled peptides

Respiratory syncytial virus (RSV) is very contagious and represents the main cause of severe acute respiratory tract illness in young children worldwide. In 2005, RSV caused almost 34 million cases of lower respiratory infections in children under 5 years of age, with 3 to 10% of them requiring hospitalization, accounting for 45% of the total child admissions (1). In the United States, it has been estimated that RSV is responsible for 86,000 child hospitalizations per year, with an estimated cost of \$394 million (2). A recent study performed by Pneumonia Etiology Research for Child Health (PERCH) across 7 countries revealed that RSV was the reason for hospitalization for 31% of all children hospitalized with severe pneumonia (3). In addition, the virus is also increasingly recognized as an important pathogen in the elderly population as well as in bone marrow transplant recipients (4). The current standard of care consists of prophylactic treatment of at-risk infants with palivizumab (Synagis), a monoclonal antibody that is administered monthly as an injectable during the peak season of infection (typically, November to March in Europe and in the United States). However, its limited efficacy (approximately 50%) and high cost (€5,000 per treatment) limit its use to preterm infants with bronchopulmonary dysplasia and chronic respiratory disease and newborns with congenital heart disease (2). As a result, 60% of at-risk children remain untreated, and no efficient therapy is available to treat the adult population.

RSV is an enveloped negative-strand RNA virus that belongs to the *Mononegavirales* order and that is a member of the *Pneumovirus* family (5). The genomic RNA of RSV is 15 kb in length and contains 10 tandemly linked genes that encode 11 proteins in the following order: the nonstructural NS1 and NS2, nucleoprotein (N), phosphoprotein (P),

Citation Galloux M, Gsponer N, Gaillard V, Fenner B, Larcher T, Vilotte M, Rivière J, Richard C-A, Eléouët J-F, Le Goffic R, Mettier J, Nyanguile O. 2020. Targeting the respiratory syncytial virus N⁰-P complex with constrained α -helical peptides in cells and mice. *Antimicrob Agents Chemother* 64:e00717-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00717-20>.

Copyright © 2020 Galloux et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Origène Nyanguile, origene.nyanguile@hevs.ch.

* Present address: Brice Fenner, Lonza, Visp, Switzerland.

Received 15 April 2020

Returned for modification 17 May 2020

Accepted 30 June 2020

Accepted manuscript posted online 13 July 2020

Published 21 September 2020

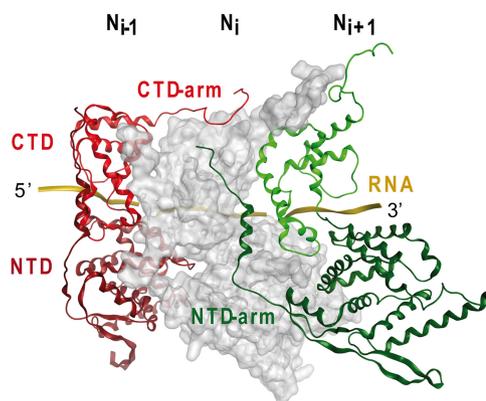


FIG 1 Partial representation of the nucleoprotein ring with 3 out of the 10 N subunits, showing the interactions between protomers (PDB accession number [2WJ8](#)). The surface of the N_i protomer is shown in gray. The ribbon structures of the N_{i-1} and N_{i+1} protomers are shown in red and green, respectively, and the RNA is shown in gold. The CTD and NTD are indicated on the structure of the N_{i-1} protomer. The N_{i-1} protomer CTD-arm, which binds atop the N_i protomer CTD, and the N_{i+1} protomer NTD-arm, which binds against the flank of the N_i protomer, are shown.

matrix (M), small hydrophobic (SH), glycoprotein (G), fusion (F), M2-1 and M2-2 (bicistronic), and large (L) proteins. To replicate, the negative-strand RNA genome must be converted into the antigenome positive strand by the RNA-dependent RNA L polymerase. The newly synthesized antigenome strand serves as the template for further copies of the genomic RNA. Both the neosynthesized antigenome and genome strands are encapsidated by nucleoprotein N to form ribonucleocapsids (RNCs). The nucleoprotein oligomerizes and enwraps the genomic RNA with its two globular domains, the N-terminal domain (NTD) and the C-terminal domain (CTD), linked through a hinge region (6). The NTD and the CTD have N- and C-terminal extensions, named NTD-arm and CTD-arm, respectively (Fig. 1), that play a key role in the formation of the nucleocapsid: the N_{i-1} protomer CTD-arm binds atop of the N_i protomer CTD, and simultaneously, the N_{i+1} protomer NTD-arm binds against the flank of the N_i protomer (i is the middle subunit of three adjacent N protomers). These two protein-protein interactions mediated by the CTD- and NTD-arms hold the protomers together and are therefore critical for the oligomerization of N. Prior to the encapsidation of genomic RNA, N is kept in an assembly-competent form known as N^0 by binding to the chaperone phosphoprotein (P) until it is delivered to nascent synthesized viral RNA (4).

Because of the high propensity of nucleoprotein N to interact with RNA and oligomerize, the isolation and characterization of the N^0 -P complex are challenging and have not yet been successfully achieved, and the molecular mechanisms involved in the transition from the N^0 -P complex to the N-RNA nucleocapsid still remain to be elucidated. Bioinformatic studies have suggested that all P proteins of the *Mononegavirales* use their N-terminal subdomain (P N-ter) as a means to maintain N in its monomeric RNA-free N^0 form (7). The resolution of the N^0 -P X-ray structures of Nipah virus (8), measles virus (MeV) (9), human metapneumovirus (HMPV) (10), Ebola virus (11), Marburg virus (12), vesicular stomatitis virus (VSV) (13), and parainfluenza virus 5 (PIV5) (14) confirmed this hypothesis and brought evidence that these viruses share a similar mechanism. In all cases, P N-ter competes with the binding of the N_{i+1} protomer NTD-arm to the N_i protomer, thereby preventing the oligomerization of N. However, the mechanism to prevent the binding of RNA appears to differ among viruses; in the case of VSV, P N-ter folds into a long α -helix and directly blocks the RNA-binding groove (13), while for MeV, HMPV, PIV5, and Nipah, Ebola, and Marburg viruses, P N-ter folds into two shorter α -helices and uses an allosteric mechanism to keep N^0 in an open, RNA-free conformation. For RSV, although no X-ray structure of the N^0 -P complex has been resolved to date, recent studies have provided hints about how this complex might be structured. First, nuclear magnetic resonance (NMR) studies have

identified a transient α -helix at the P N-ter spanning residues Asp12 to Ile24 (15). Second, the residues of P N-ter that are required to bind specifically to N^o have been identified by Ala scan mutagenesis, and it was shown that overexpression of P N-ter from residues 1 to 29 [P(1–29)] can impair RSV polymerase activity (16). Third, a biochemical study of the RSV N^o-P complex in solution suggested a strong structural homology with the N^o-P complex of HMPV (17). The X-ray structure of the HMPV N^o-P complex revealed that P uses two structural motifs to bind to the N^o CTD subdomain: P(14–28) folds as an α -helix and binds atop the CTD, and P(1–12) is unfolded in an extended conformation and binds at the flank of the CTD (10). Superimposition of the N^o-P complex with the N-RNA complex showed that the P peptide competes with the binding of the N_{*i*+1} protomer NTD-arm and the N_{*i*-1} protomer CTD-arm.

In the present work, we wished to investigate whether peptides derived from RSV P(1–30) can be used to inhibit RSV replication through preventing the oligomerization of N. Such a strategy has already been proposed for RSV and rabies and Nipah viruses (8, 16–18). However, developing peptides into a drug can be very challenging due to their poor bioavailability. Recently, the stapled peptide technology has emerged as a promising tool to solve this issue (19, 20). Nonnatural olefinic amino acids are incorporated into the peptides, and the olefinic side chains are cross-linked by ruthenium-catalyzed metathesis. The nature of the staple incorporated can increase dramatically the potency, proteolytic stability, and cellular permeation of the peptide, as it consists of a large hydrophobic all-hydrocarbon macrocycle (21). In the study described here, we performed a stapled peptide scan of the RSV P N-ter and we identified a peptide capable of inhibiting RSV infection *in vivo*.

RESULTS

Stapled peptide scan across the P N-terminal domain. Previous NMR studies have shown that P(12–24) folds into an α -helix upon binding to N^o (15). The helical wheel representation of P(11–28) shows that the transient helix is composed of a core of hydrophobic residues on one face of the α -helix and hydrophilic residues on the other face (Fig. 2A and B), a characteristic of amphipathic helices. The amino acids that were identified by Ala scan mutagenesis to be required for the binding of P to N^o (16) are located on the predicted hydrophobic face of the helix. Consistent with this, modeling of the RSV N^o-P complex revealed that Ala13, Gln14, Ala17, Phe20, Leu21, and Ile24 make van der Waals contact in the CTD N^o binding groove (17) (Fig. 2C). Based on these predictions, we decided to stabilize the transient α -helix of P(12–24). Given that at least 16 to 18 residues are usually required to successfully stabilize an α -helix in aqueous solution (22) and that Phe28 appeared to fit well into the helical wheel representation, we decided to focus on P(11–30). A stapled peptide scan of P(11–30) was performed by inserting the all-hydrocarbon cross-link at the hydrophilic face of the helix, the presumed noninteracting face of the helix. (19). We tested all *i*, *i* + 3 and *i*, *i* + 4 staples, which span one turn of the α -helix, as well as the *i*, *i* + 7 staples, which span two turns of the α -helix (*i* is the position at the N terminus of the peptide where the first amino acid used for stapling is incorporated) (Table 1). We also prepared negative controls, peptides 1d and 2d, where the staple was introduced at two positions, which should impair the binding of the peptide to N^o. The peptides were synthesized by solid-phase peptide synthesis, and the staples were incorporated by closure of the macrocyclic bridge using ruthenium-mediated ring-closing olefin metathesis (19).

To investigate whether the insertion of the staples in the P peptide resulted in an increase in the α -helical content, the peptides were analyzed by circular dichroism (CD). As it can be seen in Fig. 3, the CD spectra of wild-type peptide P(11–30) displayed a negative Cotton effect at approximately 195 nm, the signature of a random coil conformation. As expected, the insertion of a staple in the peptide resulted in a significant shift in the CD spectra, which then displayed two negative Cotton effects at approximately 207 and 222 nm, as well as a positive Cotton effect in the far-UV range, the CD signature of α helices (Fig. 3A to C). The stabilization of P(11–30) was observed

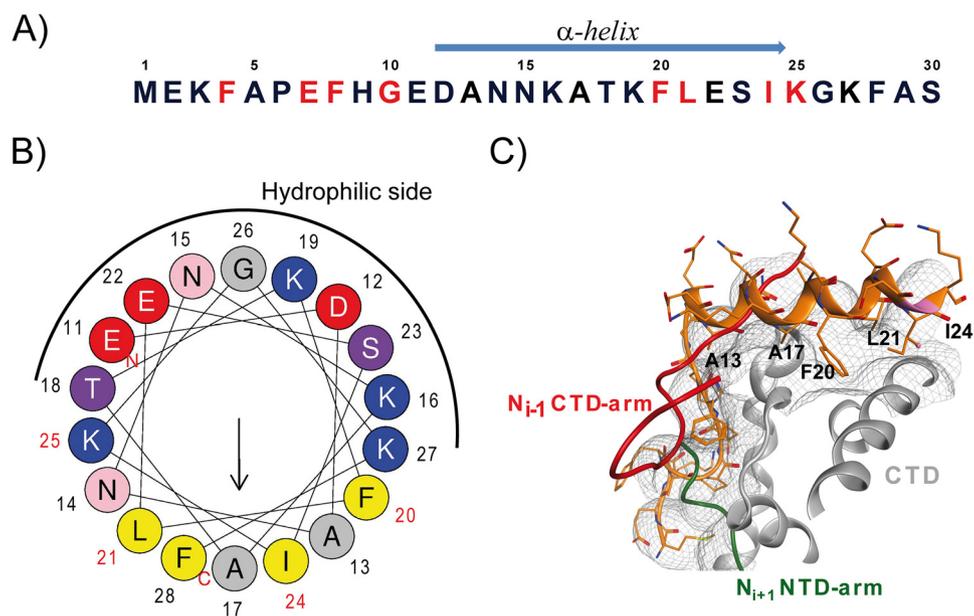


FIG 2 Primary amino acid sequence of the P N terminus and model of the P binding site on monomeric N. (A) The sequence of the first 30 N-terminal amino acid of P is presented, with residues identified to be critical for the interaction with N⁰ indicated in red. The location of the α -helix, characterized by NMR (15), is indicated by a blue arrow above the sequence. (B) Helical wheel representation (made with HeliQuest online software) of the putative α -helix located between residues 11 and 28 of P. Residues critical for N⁰ binding (16) are numbered in red. The hydrophilic face is indicated by a black half circle. Positively charged residues are in blue, negatively charged residues are in red, neutral residues are in gray, serine and threonine are in purple, uncharged residues are in pink, and hydrophobic residues are in yellow. (C) Model of the N⁰-P binding site. The surface of N⁰ is presented in gray. The ribbon structures of the peptide P(1–28) (orange), of the N_{*i*-1} protomer CTD-arm (red), and of the N_{*i*+1} protomer NTD-arm (green) are superimposed on the N surface, showing that the P binding site overlaps both the NTD- and CTD-arms of adjacent protomers. The putative P residues making hydrophobic contacts with N⁰ are shown on the α -helix in black. This model was generated with the Molecular Operating Environment (MOE) using the structures with PDB accession numbers [2WJ8](#) and [5FVD](#).

in all staples tested, although the degree of α -helical content varied dramatically depending on the staple (5% to 100%) (Fig. 3 and Table 1). Peptides displaying α -helical contents higher than 30% were peptides 1c, 1e, and 1f for the $i, i + 3$ staples, peptides 2b, 2e, and 2f for the $i, i + 4$ staples, and peptides 3a, 3b, 3c, and 3d for the $i, i + 7$ staples. The α -helical stabilization appeared to be higher for the $i, i + 7$ staples overall. Altogether, these data are consistent with those from previous studies (15–17) and suggest that P N-ter does contain a transient α -helix subdomain.

Affinity of stapled peptides for the monomeric N protein. Next, we implemented a biochemical fluorescence polarization (FP) assay to investigate the impact of the incorporation of the staple on the binding affinity of the P peptides to N⁰. For this assay, fluorescently labeled P(1–40) was synthesized and incubated with monomeric N protein (N^{mono}), a recombinant N^{K170A/R185A} double mutant reported previously (16). The K179A/R185A mutations were shown to impair the binding of RNA to the N protein (here named N^{mono}), thereby enabling the purification of a monomeric, RNA-free RSV N protein. Upon binding to N^{mono}, the rotation of the fluorophore of 6-carboxyfluorescein (FAM)-P(1–40) is reduced, thereby causing a significant increase in the polarization of the fluorescence signal. The difference in the fluorescent signal between the bound probe and the free probe could then be used to perform a dose-response competition assay in the presence of a competitor capable of displacing the labeled probe. The wild-type unstapled peptide, P(11–30), was able to displace the binding of the labeled probe to N^{mono} with a half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of 7.9 μ M (Table 1). As expected, no competition could be observed for negative-control peptides 1d and 2d. In contrast to the beneficial effect observed in the circular dichroism studies, stapling did not improve the competitive binding activity of the

TABLE 1 Amino acid sequences, α -helical content, and IC_{50} values of single stapled peptides derived from P(11–30)^a

Staple and peptide ^b	Sequence at position:																			% helicity	IC_{50} (μ M)	
	11			15			20			25			30									
Wild type	E	D	A	N	N	K	A	T	K	<u>F</u>	<u>L</u>	E	S	<u>I</u>	<u>K</u>	G	K	F	A	S	NA	7.9 \pm 1.8
<i>i; i + 3</i>																						
1a	-	-	-	-	+	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.5	>100
1b	-	-	-	-	-	+	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11.5	33.7 \pm 2.5
1c	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	58.9	49.7 \pm 26.1
1d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	X	-	-	-	-	-	-	24.2	>100
1e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	X	-	-	-	-	30.7	37.6
1f	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	X	-	>100	1.3 \pm 1.1
1g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	X	25.5	>100
<i>i; i + 4</i>																						
2a	-	-	-	-	X	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17.9	23.2 \pm 7.4
2b	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	31.0	11.4 \pm 5.3
2c	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	16.8	8.8 \pm 1.8
2d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	10.1	>100
2e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	X	-	-	-	-	-	>100	13.6 \pm 2.4
2f	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	X	-	-	-	-	46.5	NA
2g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	X	-	24.1	ND
<i>i; i + 7</i>																						
3a	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	64.6	2.1 \pm 0.7
3b	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	36.5	NA
3c	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	96.0	39.2 \pm 640
3d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-	X	-	-	35.3	2.3 \pm 1.1
3e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-	X	-	19.9	25.13

^a8, *R*-octenylalanine; X, *S*-pentenylalanine; +, *R*-pentenylalanine; -, no change in sequence from the wild type; IC_{50} , half-maximal inhibitory concentration; NA, not applicable (the labeled probe displays a polarization signal higher than that of the N^{mono}/labeled probe complex in the presence of the stapled peptide); ND, not determined. The key amino acids that were shown to be required to bind to N⁰ are underlined (16); the amino acids in bold are predicted with our model (Fig. 2C) to make hydrophobic contact with N⁰.

^bPeptides 1d and 2d were used as negative controls and are identified in boldface.

studied peptides (IC_{50} value range, 1 to 50 μ M). In two instances (peptides 1a and 1g), stapling appeared to be detrimental to the binding (Fig. 3D). Unexpectedly, we could not assess the competitive binding activity of peptides 2f and 3b in this assay, because the polarization signal increased instead of decreased in the presence of the competitor (Fig. 3E and F). We found that this artifact was due to the nonspecific binding of the peptides to the fluorescently labeled probe only, which most likely results in an oligomer inducing a higher polarization than the N⁰-P(1–40) bound complex (data not shown).

Identification of stapled peptide inhibitors of RSV replication. To investigate if the P α -helix can be further stabilized on the N terminus, we extended the peptide length to P(7–30) and performed another stapled peptide scan at the N terminus of the peptide (Table 2). P(1–6) was not included because of the presence of Pro6, a strong helix-breaking residue (23) that most likely results in a random coil region at the N terminus of P. Similar to what had been observed with the stapled peptide scan of P(11–30), we measured an increase in the helical content in the range of from 17% to 48%, except for peptide 4, peptide 4a, and peptide 4c, which were mostly random coils (Fig. 4A). This is expected, since peptide 4 is unstapled and since peptide 4a and peptide 4c bear a staple beyond the region predicted to be a transient helix (15). In parallel, the binding affinity of the P peptides to N⁰ was assessed as described above using our FP biochemical binding assay (Fig. 4B). The wild-type unstapled peptide 4 was able to displace the binding of the labeled probe to N^{mono} with an IC_{50} of 39.4 μ M (Table 2). Peptides 4a, 4c, and 4f were not able to compete with the binding of the labeled probe to N⁰ at peptide concentrations as high as 400 μ M. However, the other peptides, peptides 4b, 4d, 4e, and 4g, showed IC_{50} values close to 5 to 6 μ M (Table 2). To investigate whether double stapling can improve the inhibitory potency of such short peptides, as has been observed previously (24), we combined these staples with

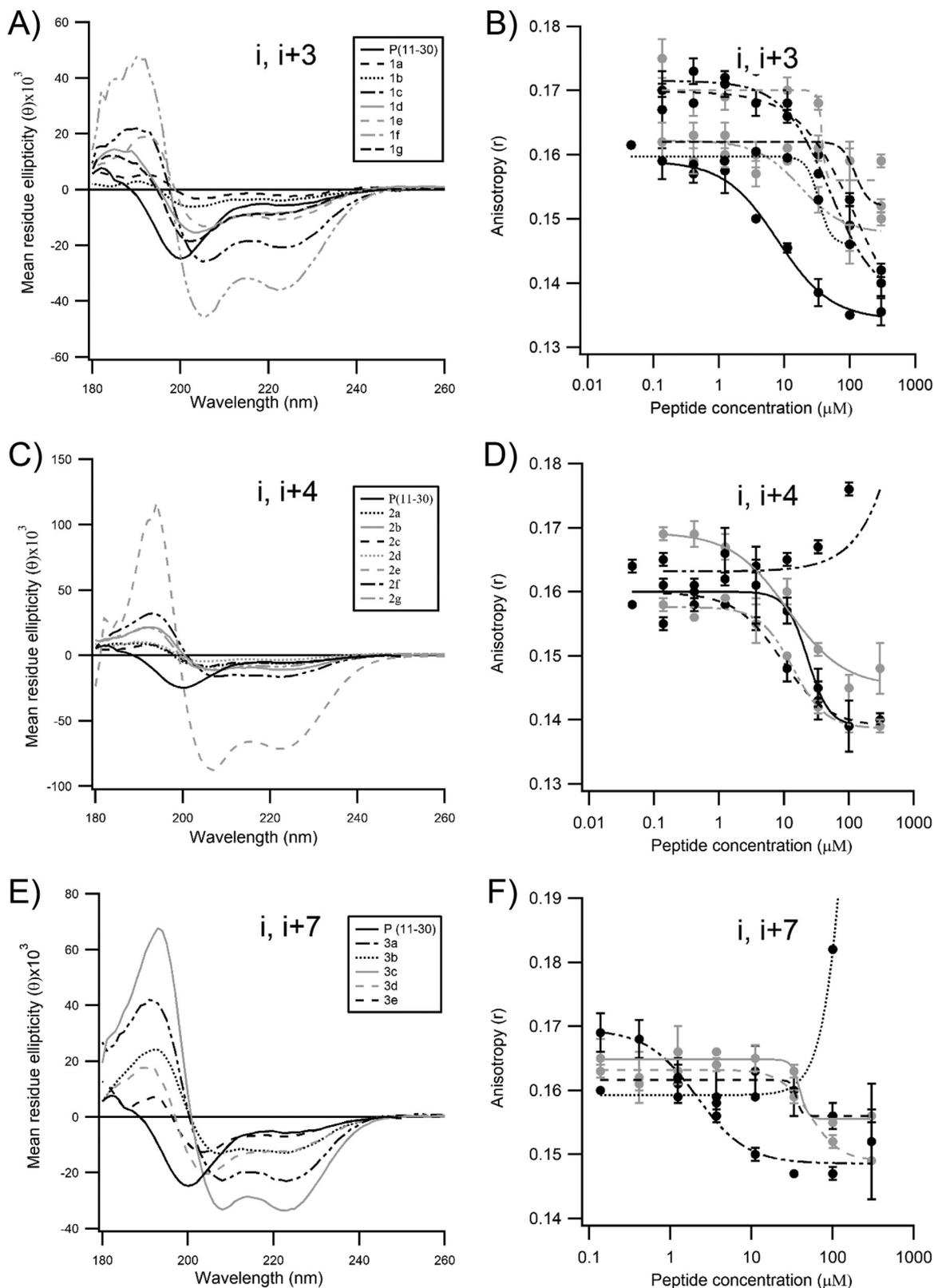


FIG 3 Biochemical characterization of the stapled peptides derived from P(11-30) tested in this study. The circular dichroism spectra (A, B, and C) and the results of the N^{mono} fluorescence polarization competition assay (D, E, and F) for peptides containing staples at positions $i, i + 3$; $i, i + 4$, and $i, i + 7$, respectively, are shown. Peptides 1d and 2d, in which the staple was introduced at two positions which should impair the binding of the peptide to N^o, were used as negative controls. The curves were fitted in Igor Pro software using the Hill equation function. Error bars are standard deviations from duplicates.

TABLE 2 Amino acid sequences, α -helical content, and IC_{50} values of single stapled peptides derived from P(7–30)^a

Peptide	Sequence at position:																				% helicity	IC_{50} (μ M)				
	7	10	15	20	25	30																				
4	<u>E</u>	<u>F</u>	H	<u>G</u>	E	D	A	N	N	K	A	T	K	<u>F</u>	<u>L</u>	E	S	<u>I</u>	<u>K</u>	G	K	F	A	S	NA	39.4 \pm 16.7
4a	-	-	+	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9.5	>400
4b	-	-	-	-	-	+	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21.7	5.8 \pm 1.1
4c	-	X	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.5	>100
4d	-	-	-	-	-	X	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28.0	5.2 \pm 1.1
4e	-	-	8	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28.8	5.5 \pm 0.8
4f	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17.2	>100
4g	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	47.6	6.5 \pm 1.7

^a8, *R*-octenylalanine; X, *S*-pentenylalanine; +, *R*-pentenylalanine; -, no change in sequence from the wild type; IC_{50} , half-maximal inhibitory concentration; NA, not applicable. The key amino acids that were shown to be required to bind to N^0 are underlined (16); the amino acids in bold are predicted with our model (Fig. 2C) to make hydrophobic contact with N^0 .

the best staples of peptides 1f and 3b found in the P(11–30) scan (Table 3). Circular dichroism analysis revealed that all double-stapled peptides contained a significant content of α -helical structure (30 to 75%), confirming that the insertion of a second staple further stabilized the secondary structure (Fig. 5A and C). However, these modifications did not improve the affinity for N^0 , as measured using the FP assay (Table 3). Nevertheless, we decided to assess the inhibitory activity of the resulting double-stapled peptides on RSV-infected cells. As the targeted N^0 -P complex is located in the cytoplasm, the antiviral activity depends both on the affinity of the peptides for N^0 and on their capacity to enter the cell. It has been shown previously that the incorporation of the staples can result in enhanced cellular permeability through an endosomal uptake mechanism (20). To evaluate peptide antiviral activity, HEp-2 cells were infected with a recombinant RSV expressing the mCherry reporter gene, and the inhibitory activity of the stapled peptides was quantified by fluorescence analysis, as previously described (24, 25) (Fig. 5B and D). We found that although it was inactive in the FP competitive binding assay, peptide 4a3b was the most potent inhibitor, with a half-maximal response inhibitory concentration (EC_{50}) of 14.6 μ M (Table 3), whereas peptides 4d3b, 3a1f, 4c3b, 2b1f, 2e1f, and 4e3b were somehow less active (EC_{50} , 19.8 μ M, 25.3 μ M, 39.9 μ M, 41.0 μ M, 67.9 μ M, and 73.2 μ M, respectively). Similar results were obtained when the cells were treated during and after infection, showing that peptides do not target virus entry and that their activity depends on long-lasting events mainly

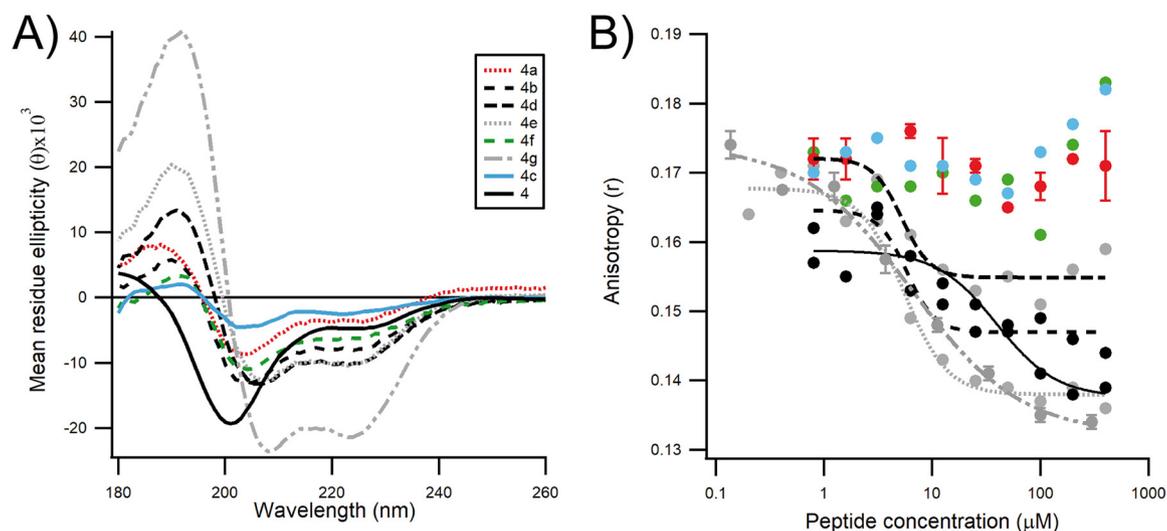


FIG 4 Effect of extending the single stapled peptides at the N terminus of P(7–30). (A) The circular dichroism spectra of single stapled peptides show that insertion of a staple at the N terminus does not stabilize the α -helical conformation. Peptide 4 without a staple was used as a negative control. (B) The results of the biochemical fluorescence competition assay of single stapled peptides show that the insertion of staples beyond P(12–25) does provide inhibitory activity to the peptides.

TABLE 3 Amino acid sequences, α -helical content, and IC_{50} and EC_{50} values of double-stapled peptides derived from P(7–30)^a

Peptide	Sequence at position:															% helicity	IC_{50} (μ M)	EC_{50} (μ M)									
	7	10		15			20			25			30														
4	<u>E</u>	<u>F</u>	H	<u>G</u>	E	D	A	N	N	K	A	T	K	<u>F</u>	<u>L</u>	E	S	<u>I</u>	<u>K</u>	G	K	F	A	S	NA	39.4 \pm 16.7	>100
1c1f	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	X	-	-	-	+	-	-	X	-	39.2	>100	>100
2b1f	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	X	-	-	-	+	-	-	X	-	37.6	NA	41.0 \pm 0.5
2e1f	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	B	-	-	X	-	27.0	NA	67.9 \pm 0.0
3a1f	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	+	-	-	X	-	37.7	NA	25.3 \pm 17.9
3b1f	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-	X	-	-	-	+	-	-	X	-	46.6	NA	>100
4a3b	-	-	+	-	-	X	-	-	-	8	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	73.2	>100	14.6 \pm 13.9
4c3b	-	X	-	-	-	X	-	-	-	8	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	34.2	64.0 \pm 1.7	39.9 \pm 4.5
4d3b	-	-	-	-	-	X	-	-	-	B	-	-	-	-	-	/	-	-	-	-	-	-	-	-	36.1	19.8 \pm 9.0	19.8 \pm 9.0
4e3b	-	-	8	-	-	-	-	-	-	B	-	-	-	-	-	/	-	-	-	-	-	-	-	-	51.1	57.9 \pm 21	73.2 \pm 31.1

^a8, R-octenylalanine; X, S-pentenylalanine; +, R-pentenylalanine; /, S-octenylalanine; B, bis-S-pentenylalanine; -, no change in sequence from the wild type; IC_{50} , half-maximal inhibitory concentration; EC_{50} , half-maximal response inhibitory concentration; NA, not applicable (the labeled probe displays a polarization signal higher than that of the N^{mono} /labeled probe complex in the presence of the stapled peptide). The key amino acids that were shown to be required to bind to N^0 are underlined (16); the amino acids in bold are predicted with our model (Fig. 2C) to make hydrophobic contact with N^0 .

dependent on their capacity to cross the cellular membrane (data not shown). Given that no cytotoxicity was observed in HEp-2 cells with a peptide concentration as high as 100 μ M (data not shown), the question of how peptide 4a3b was still able to inhibit viral replication arose. We hypothesized that the loss of one ion pair in peptide 4a3b, resulting from the replacement of Asp12 and Lys16 by the unnatural amino acids used to insert the staple, had a negative impact on the binding kinetics toward recombinant N^{mono} . Ion pairs are thought to be particularly important in stabilizing α -helix domains in solution (26). Charged residues (Lys, Arg, Glu, Asp) located across adjacent turns of the helix can have an important effect on the thermodynamic stability of the helix. To investigate this, we introduced novel ion pairs or moved existing ion pairs at the noninteracting face of the peptide by inserting Lys and/or Glu at the i , $i + 3$ or i , $i + 4$ positions (Table 4). When the resulting peptides (peptides 5a to 5d) were tested in the FP assay, we found that the binding to N^{mono} was restored for all peptides tested. Consistent with previous studies, the best helix former was obtained when two ($i + 4$)E,K ion pairs were inserted (peptide 5a) and the worse helix former was obtained when a reverse ($i + 4$)K,E bridge was inserted (peptide 5d) (26). For all peptides modified with these ion pairs, inhibition of viral infectivity was maintained at EC_{50} values similar to those for parent peptide 4a3b (Fig. 6A). However, peptides 5b and 5d showed some toxicity at a peptide concentration of 50 μ M (Fig. 6B). Altogether, these data suggest that peptide 4a3b inhibits replication in HEp-2 cells by targeting the N^0 -P complex.

To confirm that the double-stapled peptides identified here (peptides 5a to 5d) specifically target the N^0 -P complex, we tested the inhibitory activity of the peptides using a plasmid-based RSV minigenome replication assay (27). Briefly, the dicistronic RSV minigenome pM/Luc was cotransfected into BSRT7/5 cells expressing T7 RNA polymerase, together with plasmids pN, pP, pL, and pM2-1, resulting in the replication and transcription of the minigenome. Hence, preventing the formation of an N^0 -P complex competent for genomic or antigenomic RNA encapsidation would result in a decrease in the production of the luciferase (Luc) reporter. As shown in Fig. 6C, incubation of the cells in the presence of 25 μ M peptides reduced approximately 30% to 40% of the luciferase activity compared to that of the control untreated cells. It is noteworthy that at this concentration no cellular toxicity was detected for any peptide except peptide 5d, which induced 40% cell mortality at this concentration (Fig. 6D). Given that no toxicity for uninfected HEp-2 cells was seen in the viral cellular inhibition assay with 50 μ M peptides 5a and 5c (Fig. 6B), the toxicity observed here at concentrations higher than 30 μ M was most likely due to the transfection of the plasmids with the Lipofectamine reagent and not to the administration of the peptides. Previously, we have shown, using the same minigenome assay, that the replacement of P residues critical for the interaction with N^0 by Ala resulted in a 50% reduction in polymerase

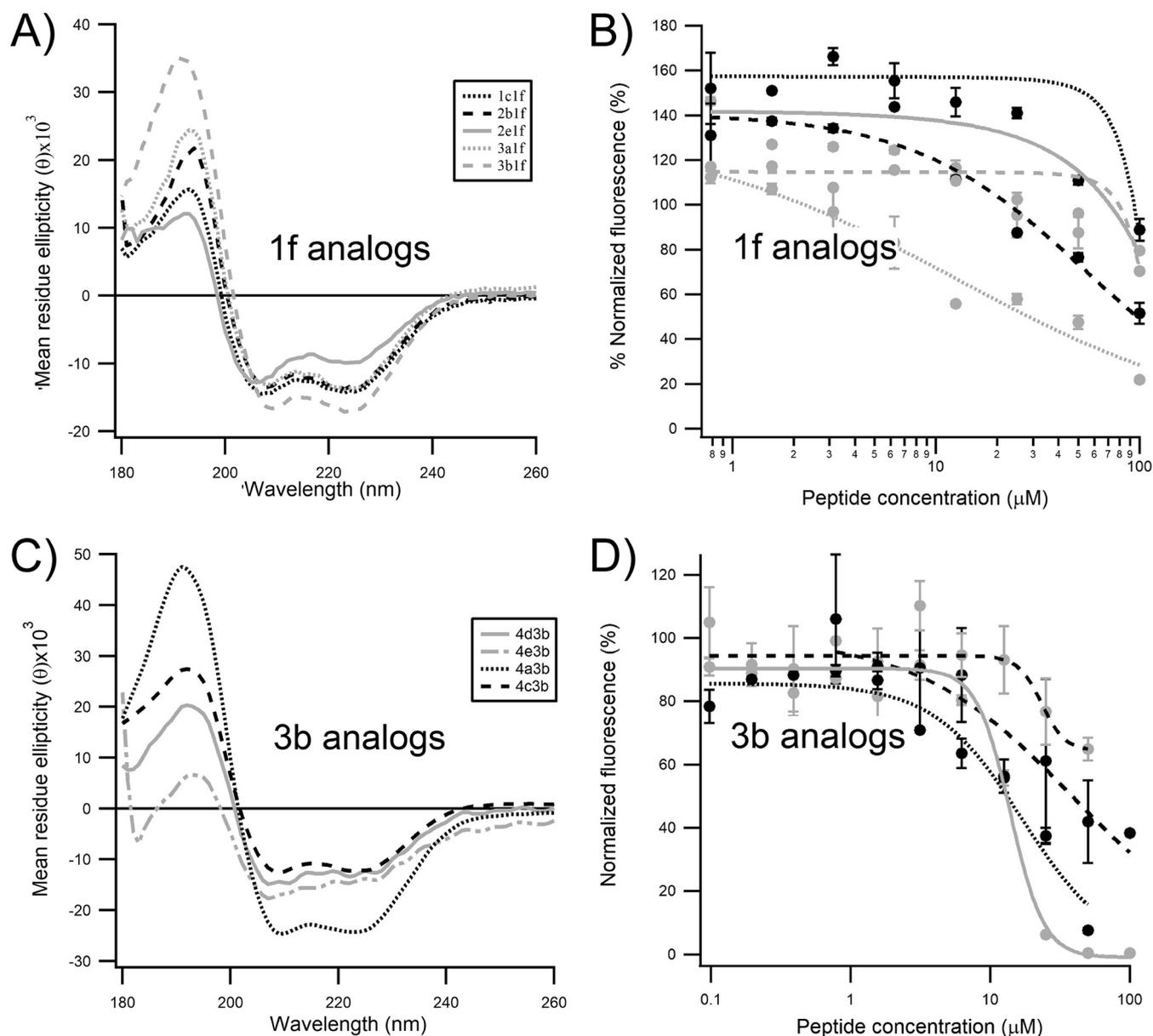


FIG 5 Effect of double-staple optimization on peptide 4. The single staples of P(7–30) were combined with the best staples of peptides 1f (A and C) and 3b (B and D) identified in the P(11–30) scan. (A, B) Circular dichroism spectra of double-stapled peptides derived from P(7–30). (C, D) Inhibition of RSV infection in HEp-2 cells by optimized double-stapled peptides. Cells were infected with rHRV5-mCherry at an MOI of 0.2, and the mCherry fluorescence was measured at 48 h postinfection. The curves were fitted in Igor Pro software using the Hill equation function. Error bars are standard deviations from duplicates. Data are representative of those from three independent experiments.

activity (16). We have also shown that the overexpression of P(1–29) led to the partial inhibition of the polymerase activity. The data obtained with the stapled peptides 5a, 5b, and 5c in the present study are consistent with these previous observations.

***In vivo* activity of peptide 5a in living mice.** Next, we assessed the antiviral activity of our lead stapled peptide in a mouse RSV infection model (25). Given the similar range of potency that was observed for our peptide 5a to 5d series in the cellular viral and minigenome inhibition assays, peptide 5a was selected for this study, first, because it displayed the highest affinity toward the N^{mono} value in the biochemical inhibition assay (Table 4) and, second, because it showed no toxicity (Fig. 6B and D). We first investigated the potential toxicity of peptide 5a *in vivo* by treatment of BALB/c mice 8 weeks of age ($n = 5$) by intranasal (i.n.) administration of peptide 5a (50 μl at 215 μM in phosphate-buffered saline [PBS]) or PBS at days 0 and 2. Daily monitoring of the

TABLE 4 Amino acid sequences, α -helical content, and IC_{50} and EC_{50} values of double-stapled peptides derived from peptide 4a3b^a

Peptide	Sequence at position:															% helicity	IC_{50} (μ M)	EC_{50} (μ M)									
	7	10			15			20			25			30													
4a3b	<u>E</u>	<u>F</u>	+	<u>G</u>	E	X	A	N	N	8	A	T	K	<u>F</u>	<u>L</u>	E	X	<u>I</u>	K	G	K	F	A	S	73.2	>100	14.6 \pm 13.9
5a	-	-	-	-	-	-	-	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	-	-	-	-	>100	0.83 \pm 0.13	18.4 \pm 9.3
5b	-	-	-	-	-	-	-	E	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>100	1.94 \pm 0.26	16.9 \pm 5.1
5c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	-	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	79.7	1.84 \pm 0.18	18.5 \pm 10.6
5d	-	-	-	-	K	-	-	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	75.7	14.21 \pm 2.94	6.0 \pm 4.2

^a8, *R*-octenylalanine; X, *S*-pentenylalanine; +, *R*-pentenylalanine; -, no change in sequence from the wild type; IC_{50} , half-maximal inhibitory concentration; EC_{50} , half-maximal response inhibitory concentration. The key amino acids that were shown to be required to bind to N^0 are underlined (16); the amino acids in bold are predicted with our model (Fig. 2C) to make hydrophobic contact with N^0 .

mouse body weight from days 0 to 4 did not reveal any signs of toxicity (Fig. 7A). At day 4, the mice were sacrificed and the lungs were collected to detect potential lesions. As shown in Fig. 7B, no macroscopic sign of toxicity was observed upon treatment with peptide 5a. Histological analysis of the lungs revealed some focal lesions of the pulmonary parenchyma with infiltration by neutrophils for 3 of the 5 animals treated with peptide 5a, in contrast to the findings for the untreated control mice (which were administered PBS), which showed no lesions (Fig. 7C). To test the antiviral activity of peptide 5a, BALB/c mice 8 weeks of age ($n = 5$) were treated as described above by intranasal administration of peptide 5a (50 μ l at 215 μ M in PBS) or PBS, followed by i.n. inoculation of a recombinant human RSV (rHRSV) encoding the gene for firefly luciferase, rHRSV-Luc (1×10^5 PFU) (25). The mice were then anesthetized at 2 days postinjection (dpi), and viral replication was quantified using an *in vivo* imaging system (IVIS) after i.n. injection of D-luciferin. Although no significant difference was detected at this time point when considering the whole luminescence signal, a 2-fold reduction in the level of RSV replication was detected in the noses of mice treated with peptide 5a compared to that in the noses of untreated mice (Fig. 8A and B). Peptide 5a was then administered a second time to the mice, and replication was measured at 4 dpi. As shown in Fig. 8B, a significant reduction in the amount of bioluminescence was detected at 4 dpi in mice treated with peptide 5a compared to that detected in the untreated control group. Furthermore, the bioluminescence in the lungs was significantly reduced in mice treated with peptide 5a compared to that in the untreated RSV-infected mice. Daily monitoring of mouse body weights revealed that RSV infection did not induce any significant weight loss (Fig. 8C). This result is not surprising, since mice infected by RSV under experimental conditions similar to those used in the present study did not show clinical symptoms, as previously reported (25). Likewise, a statistically nonsignificant loss of weight was observed in infected animals which were treated with peptide 5a. Histological analysis of the lungs showed that RSV infection led to a multifocal extensive marked interstitial pneumonia, characterized by a diffuse thickening of the alveolar walls with mixed inflammatory cells. Mild periarteritis sometimes associated with focal hemorrhages and mild bronchitis with intraluminal necrotic debris were also observed in all 5 animals tested (Fig. 8D). In contrast, the intensity of interstitial pneumonia decreased upon inoculation of peptide 5a. Consistent with this observation, the vascular and bronchial lesions were less severe and were seen in only 2 out of 5 animals. These observations confirm the antiviral effect of peptide 5a.

Altogether, these data show that stapled peptides targeting the N^0 -P complex are capable of inhibiting RSV infection *in vivo*. Furthermore, no major sign of *in vivo* toxicity was observed in the present study.

DISCUSSION

RSV is the main cause of severe respiratory infection in young children worldwide, and no therapies have been approved for the treatment of infections caused by RSV. Most of the antivirals under development aim at targeting the fusion protein (F), responsible for virus entry (28, 29), or the enzymatic activities of L polymerase (30–32). Importantly, most of the studies focusing on these antivirals report the appearance of

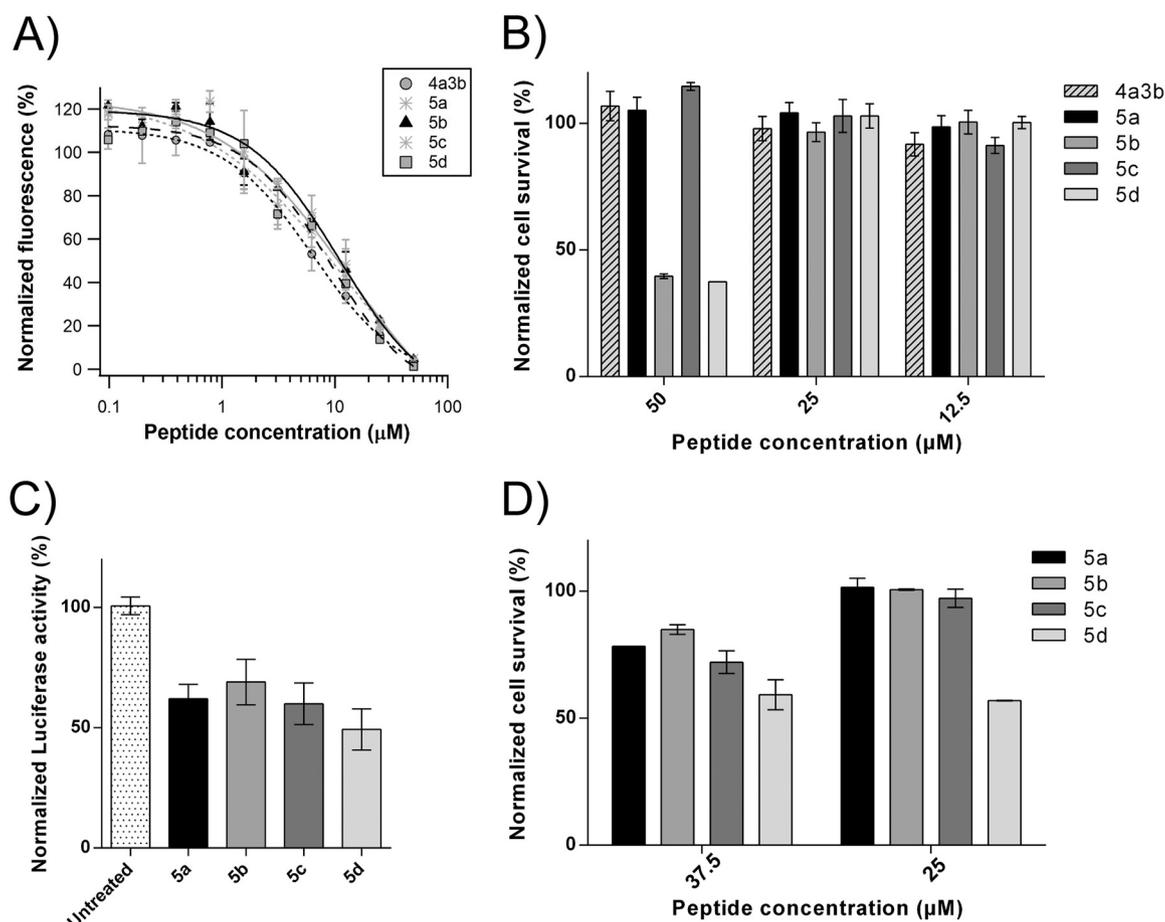


FIG 6 Validation of the antiviral activity and the specificity of double-stapled peptides derived from P(7–30) in cells. (A) Inhibition of RSV infection in HEP-2 cells by double-stapled peptides. Cells were infected with rHRV5-mCherry at an MOI of 0.2, and the mCherry fluorescence was measured at 48 h postinfection. The curves were fitted in Igor Pro software using the Hill equation function. Error bars are standard deviations from duplicates. Data are representative of those from three independent experiments. (B) HEP-2 cell viability upon treatment with peptides alone at peptide concentrations of 50, 25, and 12.5 μM . Error bars are standard deviations from duplicates. Data are representative of those from two independent experiments. (C) Inhibition of RSV polymerase complex by double-stapled peptides. BSRT/5 cells were transfected with plasmids pP, pN, pM2-1, pL, and pM/Luc, together with pRSV- β -Gal for transfection standardization. At 6 h posttransfection, the medium was replaced by DMEM without antibiotics containing stapled peptides at 25 μM . The luciferase activities were quantified with an Infinite 200 Pro microplate reader and normalized based on β -galactosidase (β -Gal) expression and on the signal obtained for untreated cells. Error bars are standard deviations from triplicates. Data are representative of those from three independent experiments. (D) Viability of BSRT/5 cells transfected with the minigenome and treated with peptides at a concentration of 37.7 or 25 μM . Error bars are standard deviations from duplicates. Data are representative of those from two independent experiments.

escape mutants upon selection pressure (33–39). The detection of novel specific targets is thus warranted to support the development of combination therapies to minimize the emergence of resistance. Recent reports suggest that the RSV N⁰-P complex may be a suitable target for the development of antivirals. According to these studies, the N terminus of P (P N-ter) prevents the oligomerization of N, required for specific encapsidation of the viral antigenome and genome, through folding into an α -helix and binding in a region of N where the CTD- and NTD-arms of the N protomers interact (15–17). Consistent with these observations, the overexpression of P N-ter was shown to be inhibitory in an RSV minigenome replication assay (16). Here, we wished to develop peptide inhibitors derived from P N-ter using the stapled peptide technology (19), with the aim to stabilize the transient α -helical conformation of this P subdomain.

Using this chemistry, we performed a stapled peptide scan of sequences derived from P N-ter. We observed that the insertion of a staple at the noninteracting face of the predicted α -helix of P stabilizes the α -helical configuration. We identified novel

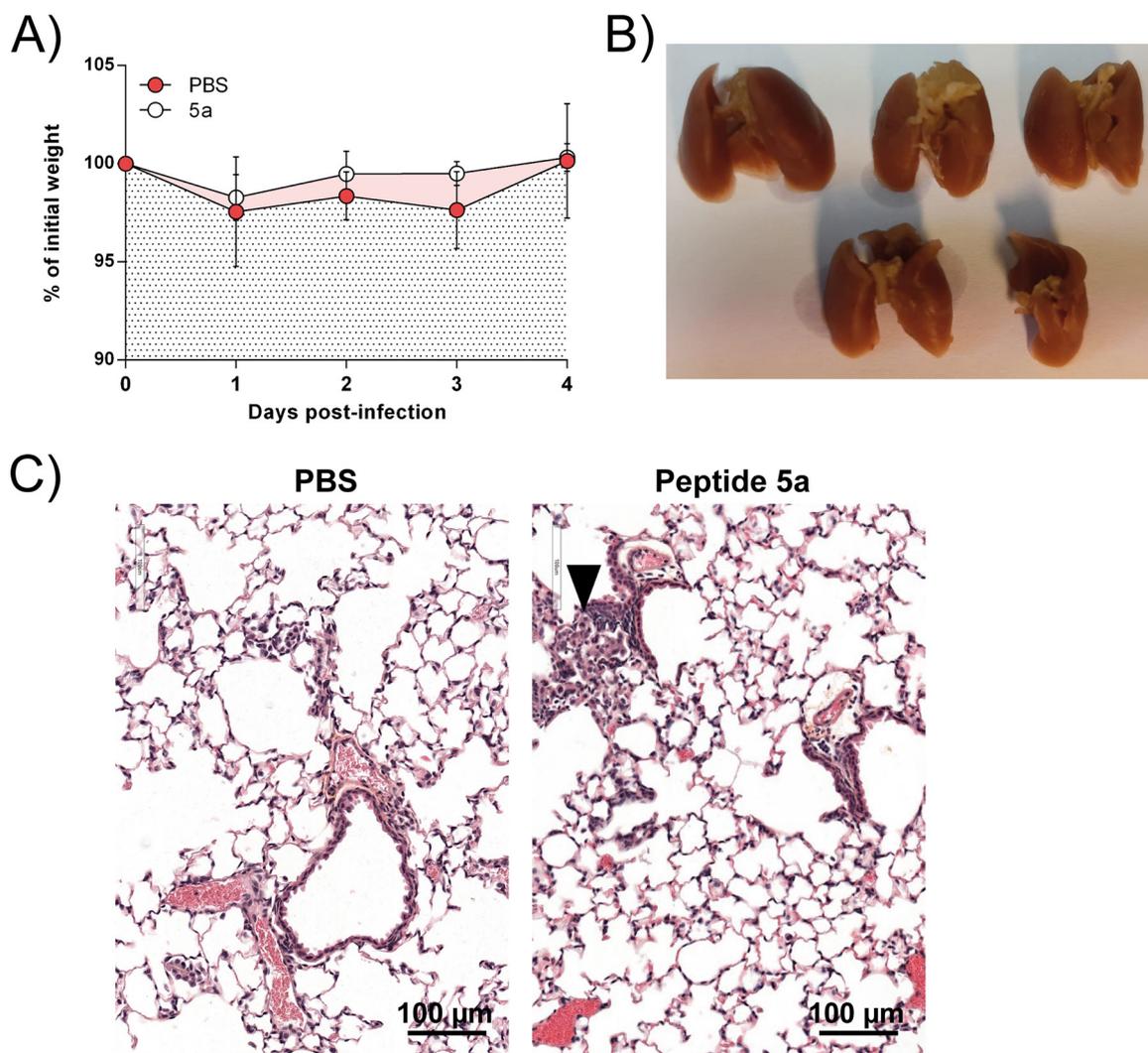


FIG 7 *In vivo* toxicity assessment of peptide 5a. Groups of 5 BALB/c mice were treated at days 0 and 2 either with 50 μl of PBS or with peptide 5a in PBS (50 μl at 215 μM) and sacrificed at day 4. (A) Daily body weight monitoring of BALB/c mice treated with or without peptide 5a. (B) View of the lungs of euthanized mice treated with peptide 5a. (C) Histopathological analysis of lungs treated with PBS or peptide 5a. Sections of fixed lungs were subjected to HES staining. Compared to control mice (left), animals treated with peptide 5a (right) showed small scattered foci of mixed inflammatory cell infiltration (arrowhead) in the lung parenchyma.

double-stapled peptides that interfere with the binding of N^0 to P, thereby preventing the delivery of N to the nascent RNA, unlike the unstapled peptides, which were previously shown to not be capable of inhibiting RSV in cells (40). Of all the single staples that were screened, only the staples inserted in P(15–30) could successfully stabilize the α -helix, corroborating the hypothesis that the α -helix must be located within Asp12 and Lys25 (15, 16). Our efforts to further stabilize the helix at the N terminus of P(7–12) were unsuccessful. Given that the N terminus contains an α -helix-breaking residue (Pro6), it is therefore unlikely that P(6–12) folds into a second short α -helix, as it has been described for other viruses (8–12). This observation is consistent with the findings of the bioinformatics studies of Karlin and Belshaw (7), which predicted that all *Pneumovirinae* have a conserved N-terminal motif, named *mir*, located between Phe8 and Phe20 in RSV. Recently, the X-ray structure of the N^0 -P complex of HMPV has been solved (10), revealing that HMPV P uses two α -helices to contact N^0 , a long helix spanning Gly12 to Leu26 and a short helix spanning Glu5 to Ile9 (yellow and green, respectively, in Fig. 9A). These two helices bind to N^0 in an L shape and are connected by Leu10 and Phe11, which make a deep hydrophobic contact with N^0 . The alignment of the RSV and HMPV P

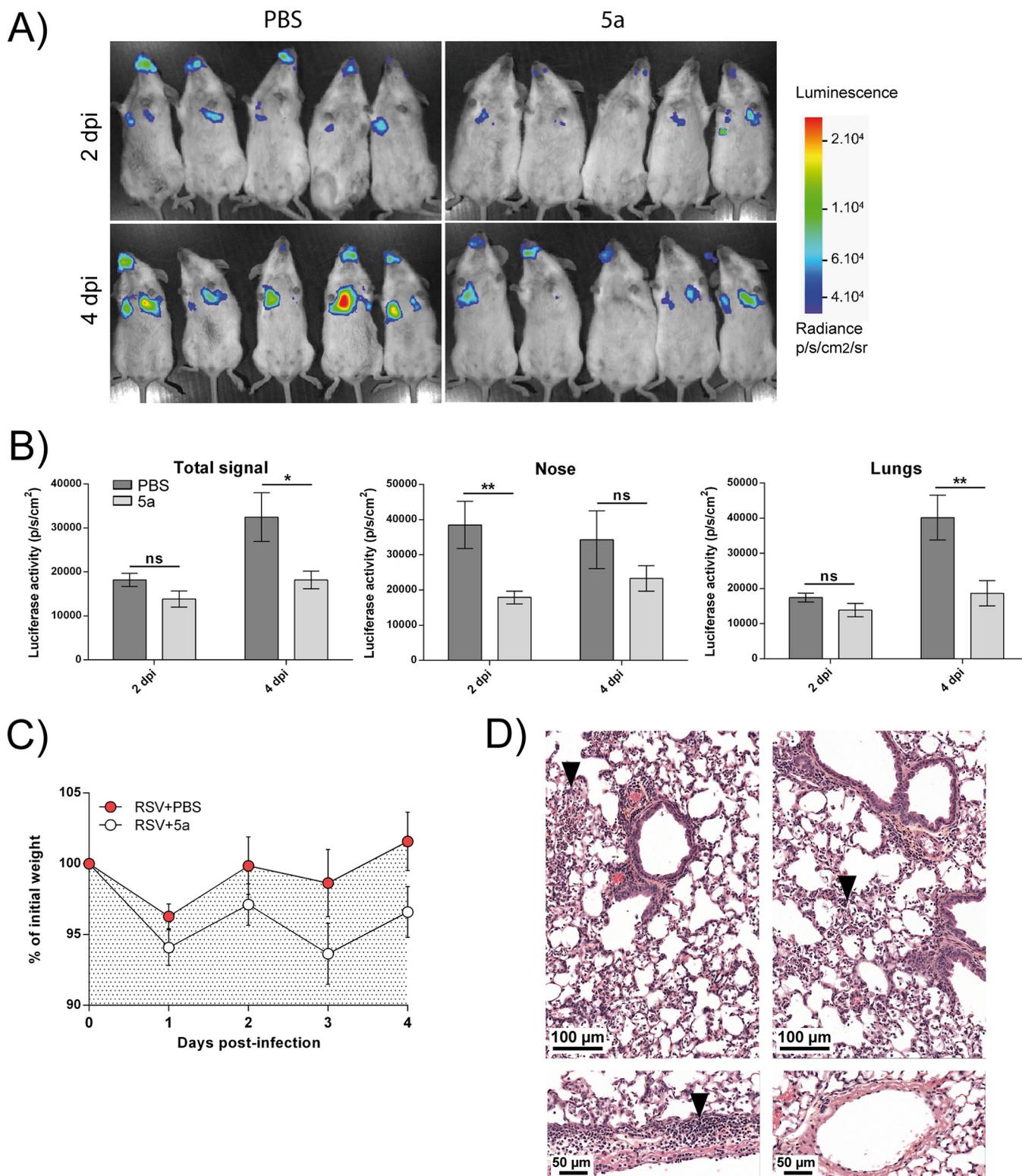


FIG 8 *In vivo* anti-RSV activity of stapled peptide 5a in mice. Groups of 5 female BALB/c mice were treated i.n. with peptide 5a or PBS as a control. The mice were then infected with 1×10^5 PFU of rHRSV-Luc intranasally. The bioluminescence was measured at 2 dpi, and the mice were treated a second time. Finally, bioluminescence was measured at 4 dpi, the mice were sacrificed, and the lungs were collected. (A) Bioluminescence was measured by inoculation of D-luciferin i.n. ($7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and by using an IVIS. The scale on the right indicates the average radiance (sum of the number of photons per second from each pixel inside the ROI/number of pixels). p/s/cm²/sr, number of photons per second per square centimeter per steradian. (B) Bioluminescence activities were quantified using Living Image software. The whole luminescent signal or specific signals in the nose or lungs of infected mice were quantified. The significance of the difference between groups was determined using the Mann-Whitney test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ns, not significant). p/s/cm², number of photons per second per square centimeter. (C) Body weight monitoring of RSV-infected mice treated or not treated with peptide 5a. (D) Histopathological analysis of lungs of RSV-infected mice (Continued on next page)

mechanism of viral replication occurs within cells. We optimized stapled peptides derived from P(7–30) and were able to achieve inhibition of viral replication in cell culture with an EC_{50} of approximately $10 \mu\text{M}$. Importantly, we found that the most active peptide, peptide 5a, inhibited viral replication *in vivo* in a mouse model. Usually, peptide antiviral strategies target the viral entry step because this mechanism has the advantage of being extracellular and therefore does not require a cell-permeant molecule to be inhibited. To prevent proteolytic degradation and improve the binding affinity to the target, peptides are constrained with various macrocyclization chemistries. A plethora of examples has been reported, including the insertion of a lactam bridge in RSV F (41, 42) or the influenza virus hemagglutinin stem (43) and the insertion of staples in RSV F (24, 44), HIV gp41 (21, 45), and Ebola virus GP2 (46). Because the mechanism for viral replication occurs intracellularly, cell-permeant molecules are needed to inhibit the N^0 -P complex. Despite the fact that the peptide was administered through nasal inhalation, peptide 5a was still capable of reaching the upper and lower respiratory tracts of living mice and inhibit viral replication. This is a significant achievement, suggesting that stapled peptides may be used to develop novel antivirals targeting the N^0 -P complex.

Of course, a medicinal chemistry effort is still needed to improve the potency of these molecules, such as the replacement of critical residues of P by natural and nonnatural amino acids with the aim to enhance the binding affinity of the stapled peptides for N^0 .

In conclusion, we have shown that constrained α -helical stapled peptides derived from P N-ter can inhibit RSV replication by targeting the N^0 -P complex. Based on the structural homology between the N^0 -P complexes of the *Mononegavirales*, such a strategy could also be used for all viruses of this order. More specifically, given the strong sequence homology between the N termini of the RSV and HMPV P proteins, it can be expected that the peptides identified in the work presented here may be directly amenable to the inhibition of HMPV. Regardless of whether stapled peptides, other macrocyclic peptides, or small molecules are used to target the N^0 -P interaction, the present strategy is a novel means to develop antivirals with activity against RSV and/or other *Mononegavirales* and opens new perspectives for combination therapies.

MATERIALS AND METHODS

Materials. 9-Fluorenylmethoxy carbonyl (Fmoc)-amino acids and coupling reagents were purchased from Aapptec, Bachem, PolyPeptide, and Sigma-Aldrich. The nonnatural olefin-containing amino acids were purchased from Okeanos Technology Co., Ltd. Solvents were purchased from Acros Organic, Biosolve, and Sigma-Aldrich.

Cell culture. HEp-2 cells (ATCC number CCL-23) were maintained in Eagle's minimum essential medium (EMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, and penicillin-streptomycin solution. BHK-21 cells (clone BSRT7/5) constitutively expressing the T7 RNA polymerase (47) were grown in Dulbecco modified essential medium (DMEM) supplemented with 10% FCS, 2 mM glutamine, and antibiotics. Cells were grown in an incubator at 37°C in 5% CO_2 . Recombinant human RSV strains corresponding to the RSV Long strain expressing either the mCherry or the luciferase protein (rHRSV-mCherry and rHRSV-Luc, respectively) were amplified and titrated as previously described (25). All experiments with RSV were carried out in biosafety level 2 facilities.

Peptide synthesis. Peptides were synthesized by solid-phase peptide chemistry on Rink Amide AM resin LL (100 to 200 mesh; Novabiochem), using an Apex 396 automated multiple-peptide synthesizer (Aapptec) at a $50\text{-}\mu\text{mol}$ scale. Each coupling was performed for 1 h at room temperature, using $200 \mu\text{mol}$ of Fmoc-amino acid preactivated with $190 \mu\text{mol}$ of 1H-benzotriazolium-1-[bis(dimethylamino)methylene]-5-chloro-hexafluoro-phosphate-(1-),3-oxide (HCTU) and $400 \mu\text{mol}$ of diisopropylethylamine (DIEA) in N-methyl-2-pyrrolidone (NMP). For the coupling following the nonnatural olefinic amino acids, HCTU was replaced by $190 \mu\text{mol}$ of 1-[bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate (HATU), and the coupling was performed twice for 1 h each time at room temperature. Following final Fmoc deprotection and N-terminal acetylation, the metathesis was performed under constant nitrogen degassing in a 2-ml solution containing 10 mM 1st-generation Grubb's catalyst in dichloroethane (DCE). The metathesis was performed for 2 h at room temperature. The peptides were deprotected and cleaved from the resin with a cleavage cocktail consisting of trifluoroacetic acid-triisopropylsilane- H_2O (95:2.5:2.5) for an hour and a half. Crude peptides were analyzed by ultraperformance liquid chromatography (UPLC)-mass spectrometry (performed with a Waters Acquity ultraperformance liquid chromatograph and a Micromass Quattro micro API mass spectrometer) on an Acquity UPLC BEH C_{18} column (particle size diameter, $1.7 \mu\text{m}$; 1.0 by 50mm) and purified by preparative

high-performance liquid chromatography (performed with a Waters 2777 sample manager, a Waters 2545 binary gradient module, and a Waters 2487 dual λ absorbance detector, using a Waters C₁₈ Xbridge PreShield RP18 column [19 by 100 mm; particle size diameter, 5 μ m]). Samples were lyophilized and quantified with a Qubit (version 2.0) fluorometer (Life Technologies).

Expression and purification of recombinant monomeric N protein. *Escherichia coli* BL21(DE3) bacteria (Novagen, Madison, WI) were transformed with the pET-N^{K170A/R185A} vector, which has been described previously (16). The bacteria were grown at 37°C for 8 h in Luria-Bertani (LB) medium containing kanamycin (50 μ g/ml), and then the same volume of LB was added and protein expression was induced by adding 80- μ g/ml isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) to the medium. The bacteria were incubated for 15 h at 28°C and then harvested by centrifugation. The protein was purified using a C-terminal 6 \times His tag. Briefly, bacterial pellets were resuspended in lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8, 500 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 10 mM imidazole, 1-mg/ml lysozyme) supplemented with cOmplete protease inhibitor cocktail (Roche). After sonication, NaCl was added to obtain a final concentration of 1 M, before centrifugation. The lysates were incubated for 30 min with chelating Sepharose Fast Flow beads charged with Ni²⁺ (GE Healthcare). The beads were then successively washed in washing buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8, 1 M NaCl) containing increasing concentrations of imidazole (10, 50, and 100 mM), and the proteins were eluted in the same buffer with 500 mM imidazole. In order to isolate the recombinant monomeric N protein (N^{monomeric}), eluate was loaded onto a Sephacryl S-200 HR 16/30 column (GE Healthcare) and eluted in 20 mM Tris-HCl, pH 8.5, 150 mM NaCl, 5% glycerol.

CD spectroscopy. The circular dichroism spectra were acquired on a Chirascan spectropolarimeter. The samples were prepared in 10 mM phosphate buffer, pH 7.5, at a peptide concentration of 50 μ M. Data were recorded at 25°C by step scan from 180 nm to 260 nm in a 0.5-mm-pathlength quartz cell using 0.2-nm-wavelength increments, a 1-nm bandwidth, and a response time of 1 s. Each spectrum was an average of three measurements and was subtracted from the buffer baseline. The data were converted to per residue molar ellipticity units (θ ; in degrees \cdot square centimeters \cdot decimoles⁻¹ \cdot number of residues⁻¹) and smoothed using Igor Pro software. Percent helicity was calculated as follows: $(100 \times CD_{222}) / (C \times N \times \{40,000 \times [1 - (2.5/N)]\})$, where CD_{222} is the molar ellipticity (θ) at 222 nm (in millidegrees), N is the number of amino acids in the peptide, and C is the peptide molar concentration (in moles per liter).

Fluorescence polarization assay. The FAM-P(1–40) peptide probe was synthesized by standard SPPS procedures at GenScript. The fluorescence polarization assay was performed in 384-well plates using a SpectraMax Paradigm microplate reader (Molecular Devices) and excitation and emission wavelengths of 485 nm and 535 nm, respectively. The acquisition time was 700 ms, and the read height was 1 mm. Ten microliters of the appropriate peptide inhibitor concentration (serially diluted) in FP buffer (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8.5), 10 μ l of FAM-P (1–40), and 10 μ l of the N^{monomeric} recombinant protein were added in that order, and the mixture was incubated for 30 min at room temperature in the dark. The final concentration of N^{monomeric} protein was 2 to 8 μ M, and the concentration of the FAM-P probe was 10 nM. The IC₅₀ value was calculated using Igor software.

rHRSV-mCherry inhibition assay. HEp-2 cells seeded at 5×10^4 cells per well in 96-well plates were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 0.2 for 2 h with rHRSV-mCherry diluted in minimum essential medium (MEM) without phenol red and without fetal calf serum (FCS). In parallel, peptides were 2-fold serially diluted in dimethyl sulfoxide (11 dilutions) and then further diluted in MEM without phenol red medium containing 2% SVF. After infection, the medium was replaced by MEM containing the different concentrations of peptides. The plates were incubated 48 h at 37°C, and the mCherry fluorescence was measured using a spectrophotometer (Tecan Infinite M200PRO) with excitation and emission wavelengths of 580 and 620 nm, respectively. The value obtained for noninfected HEp-2 cells was used as a standard for the fluorescence background level, and the value obtained for infected and untreated cells was used to normalize the data. The EC₅₀ value was calculated using Igor software. Cytotoxicity assays were done with the CellTiter-Glo luminescent cell viability assay (Promega). Each experiment was performed in duplicate and repeated at least twice.

Minigenome assay. BSRT7/5 cells at 90% confluence in 96-well dishes were transfected with a plasmid mixture containing 62.5 ng of pM/Luc, 62.5 ng of pN, 62.5 ng of pP, 31.25 ng of pL, and 15.6 ng of pM2-1, as well as 15.6 ng of pRSV- β -Gal (Promega), to normalize transfection efficiencies (27). Cells were transfected using the Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) in Opti-MEM medium (Gibco), as described by the manufacturer. At 6 h posttransfection, the medium was replaced by DMEM without antibiotics containing the stapled peptides at 25 μ M. The cells were harvested at 24 h posttransfection and lysed in luciferase lysis buffer (30 mM Tris, pH 7.9, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 1% Triton X-100, 15% glycerol). The luciferase activities were determined for each cell lysate with an Infinite 200 Pro microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland) and normalized based on β -galactosidase (β -Gal) expression and on the value obtained for transfected and untreated cells. The transfections were done in triplicate, and each independent transfection experiment was performed three times.

Mouse infection and treatment. Female BALB/c mice were purchased from the Centre d'Élevage R. Janvier (Le Genest Saint-Isle, France) and were used at 8 weeks of age. Mice ($n = 5$ per group) were anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine (1 mg and 0.2 mg per mouse, respectively) and were treated intranasally (i.n.) with 50 μ l of peptide 5a at 215 μ M in PBS or PBS for control mice. For the infection assay, the mice were infected i.n. with 50 μ l of rHRSV-Luc (2×10^6 PFU/ml) 10 min later. Mouse body weight was measured each day. At 2 days postinfection (dpi), the mice were anesthetized to perform the *in vivo* luminescence measurement and treated i.n. a second time with 50 μ l of peptide 5a at 215 μ M in PBS. Luminescence measurement was then performed at 4 dpi.

In vivo luminescence measurements. Mice were anesthetized at 2 and 4 days postinfection (dpi), and bioluminescence was measured 5 min following the i.n. injection of 50 μ l of PBS containing 7 mg \cdot kg⁻¹ D-luciferin (Sigma). Living Image software (version 4.0; Caliper Life Sciences) was used to measure the luciferase activity. Bioluminescence signals were acquired with an exposure time of 1 min. Digital false-color photon emission images of the mice were generated and show the average radiance (in number of photons per second per square centimeter per steradian). Photons were counted within three different regions of interest (ROI), corresponding to the nose, the lungs, and the whole airway area. Signals are expressed as the total flux normalized to the surface of the ROI (in number of photons per second per square centimeter). The data were analyzed using GraphPad Prism software (version 6). The nonparametric Mann-Whitney test (comparison of two groups, $n \geq 4$) was used to compare unpaired values (GraphPad Prism software). Significance is indicated in the appropriate figure legends.

Histological analysis. The mice were sacrificed at 4 dpi, the chest cavity was opened, and the lungs were perfused intratracheally with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS. The lungs were then removed and immersed in 4% PFA for 12 h before transfer in 70% ethanol. The lungs were embedded in paraffin, and 5- μ m sections were cut, stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES), and evaluated microscopically. Qualitative histological changes were described and, when applicable, were scored semiquantitatively using a three-point scale ranging from 0 to 2 (0, none; 1, mild; 2, marked), focusing on histological characterization of the lesion (interstitial pneumonia, respiratory epithelial cell apoptosis, and hyperplasia) and inflammation.

Ethics statement. The *in vivo* studies were carried out in accordance with INRAE guidelines, which are compliant with the European animal welfare regulation. The protocols were approved by the Animal Care and Use Committee at the Centre de Recherche de Jouy-en-Josas (COMETHEA) under relevant institutional authorization (Ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche; authorization number 201803211701483v2, APAFIS number 14660). All experimental procedures were performed in a biosafety level 2 facility.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Microscopy and Imaging Facility for Microbes, Animals and Foods (MIMA2) platform for kindly providing the material used to generate the *in vivo* luminescence experiments (<https://doi.org/10.15454/1.5572348210007727E12>).

This work has benefited from the facilities and expertise of @BRIDGe (Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, Jouy-en-Josas, France). This work was funded by the HES-SO University of Applied Sciences and Arts Western Switzerland RealTech Program (grant no. 32324) and by The Ark Foundation (project no. 314-10).

O.N. and M.G. designed the study and planned the experiments. N.G., V.G., and B.F. synthesized and purified the stapled peptides and performed the circular dichroism and fluorescence biochemical polarization assay. M.G. and C.-A.R. purified the recombinant N protein. M.G. and J.-F.E. performed the *in vitro* cellular and minigenome assays. M.G., R.L.G., and J.M. performed the *in vivo* experiments. T.L. performed the histological analysis. M.G. and O.N. wrote the paper, and O.N. edited the manuscript. All authors commented on the manuscript.

O.N., J.-F.E., and M.G. are coinventors of application PCT/EP2015/054930, filed at the European Patent Office on 10 March 2015, entitled Respiratory Syncytial Virus (RSV) Replication Inhibitor.

REFERENCES

- Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, Auinger P, Griffin MR, Poehling KA, Erdman D, Grijalva CG, Zhu Y, Szilagyi P. 2009. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med* 360:588–598. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0804877>.
- Olszewska W, Openshaw P. 2009. Emerging drugs for respiratory syncytial virus infection. *Expert Opin Emerg Drugs* 14:207–217. <https://doi.org/10.1517/14728210902946399>.
- Pneumonia Etiology Research for Child Health (PERCH) Study Group. 2019. Causes of severe pneumonia requiring hospital admission in children without HIV infection from Africa and Asia: the PERCH multi-country case-control study. *Lancet* 394:757–779. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30721-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30721-4).
- Cowton VM, McGivern DR, Fearn R. 2006. Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis. *J Gen Virol* 87:1805–1821. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81786-0>.
- Afonso CL, Amarasinghe GK, Bányai K, Bào Y, Basler CF, Bavari S, Bejerman N, Blasdel KR, Briand F-X, Briese T, Bukreyev A, Calisher CH, Chandran K, Chéng J, Clawson AN, Collins PL, Dietzgen RG, Dolnik O, Domier LL, Dürrwald R, Dye JM, Easton AJ, Ebihara H, Farkas SL, Freitas-Astúa J, Formenty P, Fouchier RAM, Fù Y, Ghedin E, Goodin MM, Hewson R, Horie M, Hyndman TH, Jiāng D, Kitajima EW, Kobinger GP, Kondo H, Kurath G, Lamb RA, Lenardon S, Leroy EM, Li C-X, Lin X-D, Liú L, Longdon B, Marton S, Maisner A, Mühlberger E, Netesov SV, Nowotny N, et al. 2016. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Arch Virol* 161:2351–2360. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2880-1>.
- Tawar RG, Duquerroy S, Vonrhein C, Varela PF, Damier-Piolle L, Castagné N, MacLellan K, Bedouelle H, Bricogne G, Bhella D, Eléouët JF, Rey FA. 2009. Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. *Science* 326:1279–1283. <https://doi.org/10.1126/science.1177634>.
- Karlin D, Belshaw R. 2012. Detecting remote sequence homology in disordered proteins: discovery of conserved motifs in the N-termini of Mononegavirales phosphoproteins. *PLoS One* 7:e31719. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031719>.
- Yabukarski F, Lawrence P, Tarbouriech N, Bourhis JM, Delaforge E, Jensen MR, Ruigrok RW, Blackledge M, Volchkov V, Jamin M. 2014. Structure of Nipah virus unassembled nucleoprotein in complex with its

- viral chaperone. *Nat Struct Mol Biol* 21:754–759. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2868>.
9. Guryanov SG, Liljeroos L, Kasaragod P, Kajander T, Butcher SJ. 2015. Crystal structure of the measles virus nucleoprotein core in complex with an N-terminal region of phosphoprotein. *J Virol* 90:2849–2857. <https://doi.org/10.1128/JVI.02865-15>.
 10. Renner M, Bertinelli M, Leyrat C, Paesen GC, Saraiva de Oliveira LF, Huiskenon JT, Grimes JM. 2016. Nucleocapsid assembly in pneumoviruses is regulated by conformational switching of the N protein. *Elife* 5:e12627. <https://doi.org/10.7554/eLife.12627>.
 11. Leung DW, Borek D, Luthra P, Binning JM, Anantpadma M, Liu G, Harvey IB, Su Z, Endlich-Frazier A, Pan J, Shabman RS, Chiu W, Davey RA, Otwinowski Z, Basler CF, Amarasinghe GK. 2015. An intrinsically disordered peptide from Ebola virus VP35 controls viral RNA synthesis by modulating nucleoprotein-RNA interactions. *Cell Rep* 11:376–389. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.034>.
 12. Bruhn JF, Kirchdoerfer RN, Urata SM, Li S, Tickle IJ, Bricogne G, Saphire EO. 2017. Crystal structure of the Marburg virus VP35 oligomerization domain. *J Virol* 91:e01085–16. <https://doi.org/10.1128/JVI.01085-16>.
 13. Leyrat C, Yabukarski F, Tarbouriech N, Ribeiro EA, Jensen MR, Blackledge M, Ruigrok RW, Jamin M. 2011. Structure of the vesicular stomatitis virus N^o-P complex. *PLoS Pathog* 7:e1002248. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002248>.
 14. Aggarwal M, Leser GP, Kors CA, Lamb RA. 2017. Structure of the paramyxovirus parainfluenza virus 5 nucleoprotein in complex with an amino-terminal peptide of the phosphoprotein. *J Virol* 92:e01304-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01304-17>.
 15. Pereira N, Cardone C, Lassoué S, Galloux M, Fix J, Assir N, Lescop E, Bontems F, Eléouët JF, Sizun C. 2017. New insights into structural disorder in human respiratory syncytial virus phosphoprotein and implications for binding of protein partners. *J Biol Chem* 292:2120–2131. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.765958>.
 16. Galloux M, Gabiane G, Sourimant J, Richard CA, England P, Moudjou M, Aumont-Nicaise M, Fix J, Rameix-Welti MA, Eléouët JF. 2015. Identification and characterization of the binding site of the respiratory syncytial virus phosphoprotein to RNA-free nucleoprotein. *J Virol* 89:3484–3496. <https://doi.org/10.1128/JVI.03666-14>.
 17. Esneau C, Raynal B, Roblin P, Brule S, Richard CA, Fix J, Eleouet JF, Galloux M. 2019. Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus N(0)-P complex in solution. *J Biol Chem* 294:3647–3660. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006453>.
 18. Castel G, Chtéoui M, Caignard G, Préhaud C, Méhouas S, Réal E, Jallet C, Jacob Y, Ruigrok RW, Tordo N. 2009. Peptides that mimic the amino-terminal end of the rabies virus phosphoprotein have antiviral activity. *J Virol* 83:10808–10820. <https://doi.org/10.1128/JVI.00977-09>.
 19. Kim YW, Grossmann TN, Verdine GL. 2011. Synthesis of all-hydrocarbon stapled α -helical peptides by ring-closing olefin metathesis. *Nat Protoc* 6:761–771. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.324>.
 20. Verdine GL, Hilinski GJ. 2012. Stapled peptides for intracellular drug targets. *Methods Enzymol* 503:3–33. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396962-0.00001-X>.
 21. Bird GH, Madani N, Perry AF, Princiotta AM, Supko JG, He X, Gavathiotis E, Sodroski JG, Walensky LD. 2010. Hydrocarbon double-stapling remedies the proteolytic instability of a lengthy peptide therapeutic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:14093–14098. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002713107>.
 22. Scholtz JM, Baldwin RL. 1992. The mechanism of alpha-helix formation by peptides. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 21:95–118. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.21.060192.000523>.
 23. Chou PY, Fasman GD. 1974. Conformational parameters for amino acids in helical, beta-sheet, and random coil regions calculated from proteins. *Biochemistry* 13:211–222. <https://doi.org/10.1021/bi00699a001>.
 24. Gaillard V, Galloux M, Garcin D, Eleouet JF, Le Goffic R, Larcher T, Rameix-Welti MA, Boukadiri A, Heritier J, Segura JM, Baechler E, Arell M, Mottet-Osman G, Nyanguile O. 2017. A short double-stapled peptide inhibits respiratory syncytial virus entry and spreading. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e02241-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02241-16>.
 25. Rameix-Welti MA, Le Goffic R, Hervé PL, Sourimant J, Rémot A, Riffault S, Yu Q, Galloux M, Gault E, Eléouët JF. 2014. Visualizing the replication of respiratory syncytial virus in cells and in living mice. *Nat Commun* 5:5104. <https://doi.org/10.1038/ncomms6104>.
 26. Marqusee S, Baldwin RL. 1987. Helix stabilization by Glu⁻–Lys⁺ salt bridges in short peptides of de novo design. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:8898–8902. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.8898>.
 27. Tran TL, Castagné N, Duboscq V, Noinville S, Koch E, Moudjou M, Henry C, Bernard J, Yeo RP, Eléouët JF. 2009. The respiratory syncytial virus M2-1 protein forms tetramers and interacts with RNA and P in a competitive manner. *J Virol* 83:6363–6374. <https://doi.org/10.1128/JVI.00335-09>.
 28. Battles MB, Langedijk JP, Furmanova-Hollenstein P, Chaiwatpongakorn S, Costello HM, Kwanten L, Vranckx L, Vink P, Jaensch S, Jonckers TH, Koul A, Arnoult E, Peeples ME, Roymans D, McLellan JS. 2016. Molecular mechanism of respiratory syncytial virus fusion inhibitors. *Nat Chem Biol* 12:87–93. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1982>.
 29. Cockerill GS, Good JAD, Mathews N. 2019. State of the art in respiratory syncytial virus drug discovery and development. *J Med Chem* 62:3206–3227. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01361>.
 30. Gilman MSA, Liu C, Fung A, Behera I, Jordan P, Rigaux P, Ysebaert N, Tcherniuk S, Sourimant J, Eleouet JF, Sutto-Ortiz P, Decroly E, Roymans D, Jin Z, McLellan JS. 2019. Structure of the respiratory syncytial virus polymerase complex. *Cell* 179:193–204.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.014>.
 31. Fearn R, Deval J. 2016. New antiviral approaches for respiratory syncytial virus and other mononegaviruses: inhibiting the RNA polymerase. *Antiviral Res* 134:63–76. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.08.006>.
 32. Cox R, Plemper RK. 2016. Structure-guided design of small-molecule therapeutics against RSV disease. *Expert Opin Drug Discov* 11:543–556. <https://doi.org/10.1517/17460441.2016.1174212>.
 33. Porter DP, Guo Y, Perry J, Gossage DL, Watkins TR, Chien JW, Jordan R. 2020. Assessment of drug resistance during phase 2b clinical trials of presatovir in adults naturally infected with respiratory syncytial virus. *Antimicrob Agents Chemother* 64:e02312-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.02312-19>.
 34. Roymans D, Alnajjar SS, Battles MB, Sithicharoenchai P, Furmanova-Hollenstein P, Rigaux P, Berg JVD, Kwanten L, Ginderen MV, Verheyen N, Vranckx L, Jaensch S, Arnoult E, Voorzaat R, Gallup JM, Larios-Mora A, Crabbe M, Huntjens D, Raboisson P, Langedijk JP, Ackermann MR, McLellan JS, Vendeville S, Koul A. 2017. Therapeutic efficacy of a respiratory syncytial virus fusion inhibitor. *Nat Commun* 8:167. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00170-x>.
 35. Stray K, Perron M, Porter DP, Anderson F, Lewis SA, Perry J, Miller M, Cihlar T, DeVincenzo J, Chien JW, Jordan R. 23 January 2020. Drug resistance assessment following administration of RSV fusion inhibitor presatovir to participants experimentally infected with respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa028>.
 36. Yan D, Lee S, Thakkar VD, Luo M, Moore ML, Plemper RK. 2014. Cross-resistance mechanism of respiratory syncytial virus against structurally diverse entry inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E3441–E3449. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405198111>.
 37. Deval J, Fung A, Stevens SK, Jordan PC, Gromova T, Taylor JS, Hong J, Meng J, Wang G, Dyatkina N, Prhavc M, Symons JA, Beigelman L. 2016. Biochemical effect of resistance mutations against synergistic inhibitors of RSV RNA polymerase. *PLoS One* 11:e0154097. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154097>.
 38. Chapman J, Abbott E, Alber DG, Baxter RC, Bithell SK, Henderson EA, Carter MC, Chambers P, Chubb A, Cockerill GS, Collins PL, Dowdell VC, Keegan SJ, Kelsey RD, Lockyer MJ, Luongo C, Najarro P, Pickles RJ, Simmonds M, Taylor D, Tyms S, Wilson LJ, Powell KL. 2007. RSV604, a novel inhibitor of respiratory syncytial virus replication. *Antimicrob Agents Chemother* 51:3346–3353. <https://doi.org/10.1128/AAC.00211-07>.
 39. Challa S, Scott AD, Yuzhakov O, Zhou Y, Tiong-Yip CL, Gao N, Thresher J, Yu Q. 2015. Mechanism of action for respiratory syncytial virus inhibitor RSV604. *Antimicrob Agents Chemother* 59:1080–1087. <https://doi.org/10.1128/AAC.04119-14>.
 40. Hara K, Yaita K, Khamrin P, Kumthip K, Kashiwagi T, Eleouet JF, Rameix-Welti MA, Watanabe H. 2020. A small fragmented P protein of respiratory syncytial virus inhibits virus infection by targeting P protein. *J Gen Virol* 101:21–32. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001350>.
 41. Harrison RS, Shepherd NE, Hoang HN, Ruiz-Gómez G, Hill TA, Driver RW, Desai VS, Young PR, Abbenante G, Fairlie DP. 2010. Downsizing human, bacterial, and viral proteins to short water-stable alpha helices that maintain biological potency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:11686–11691. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002498107>.
 42. Shepherd NE, Hoang HN, Desai VS, Letouze E, Young PR, Fairlie DP. 2006. Modular alpha-helical mimetics with antiviral activity against respiratory syncytial virus. *J Am Chem Soc* 128:13284–13289. <https://doi.org/10.1021/ja064058a>.
 43. Kadam RU, Juraszek J, Brandenburg B, Buyck C, Schepens WBG, Kesteleyn B, Stoops B, Vreeken RJ, Vermond J, Goutier W, Tang C, Vogels R, Friesen RHE,

- Goudsmit J, van Dongen MJP, Wilson IA. 2017. Potent peptidic fusion inhibitors of influenza virus. *Science* 358:496–502. <https://doi.org/10.1126/science.aan0516>.
44. Bird GH, Boyapalle S, Wong T, Opoku-Nsiah K, Bedi R, Crannell WC, Perry AF, Nguyen H, Sampayo V, Devareddy A, Mohapatra S, Mohapatra SS, Walensky LD. 2014. Mucosal delivery of a double-stapled RSV peptide prevents nasopulmonary infection. *J Clin Invest* 124:2113–2124. <https://doi.org/10.1172/JCI71856>.
45. Bird GH, Irimia A, Ofek G, Kwong PD, Wilson IA, Walensky LD. 2014. Stapled HIV-1 peptides recapitulate antigenic structures and engage broadly neutralizing antibodies. *Nat Struct Mol Biol* 21:1058–1067. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2922>.
46. Pessi A, Bixler SL, Soloveva V, Radoshitzky S, Retterer C, Kenny T, Zamani R, Gomba G, Gharabeh D, Wells J, Wetzel KS, Warren TK, Donnelly G, Van Tongeren SA, Steffens J, Duplantier AJ, Kane CD, Vicat P, Couturier V, Kester KE, Shiver J, Carter K, Bavari S. 2019. Cholesterol-conjugated stapled peptides inhibit Ebola and Marburg viruses in vitro and in vivo. *Antiviral Res* 171:104592. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104592>.
47. Buchholz UJ, Finke S, Conzelmann KK. 1999. Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol* 73:251–259. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.1.251-259.1999>.

Non-Toxic Virucidal Macromolecules Show High Efficacy Against Influenza Virus Ex Vivo and In Vivo

Ozgun Kocabiyik, Valeria Cagno, Paulo Jacob Silva, Yong Zhu, Laura Sedano, Yoshita Bhide, Joelle Mettier, Chiara Medaglia, Bruno Da Costa, Samuel Constant, Song Huang, Laurent Kaiser, Wouter L. J. Hinrichs, Anke Huckriede, Ronan Le Goffic, Caroline Tapparel,* and Francesco Stellacci*

Influenza is one of the most widespread viral infections worldwide and represents a major public health problem. The risk that one of the next pandemics is caused by an influenza strain is high. It is important to develop broad-spectrum influenza antivirals to be ready for any possible vaccine shortcomings. Anti-influenza drugs are available but they are far from ideal. Arguably, an ideal antiviral should target conserved viral domains and be virucidal, that is, irreversibly inhibit viral infectivity. Here, a new class of broad-spectrum anti-influenza macromolecules is described that meets these criteria and display exceedingly low toxicity. These compounds are based on a cyclodextrin core modified on its primary face with long hydrophobic linkers terminated either in 6'-sialyl-*N*-acetylactosamine (6'SLN) or in 3'SLN. SLN enables nanomolar inhibition of the viruses while the hydrophobic linkers confer irreversibility to the inhibition. The combination of these two properties allows for efficacy in vitro against several human or avian influenza strains, as well as against a 2009 pandemic influenza strain ex vivo. Importantly, it is shown that, in mice, one of the compounds provides therapeutic efficacy when administered 24 h post-infection allowing 90% survival as opposed to no survival for the placebo and oseltamivir.

Influenza viruses are among the most infective viruses.^[1,2] Every year, different influenza strains infect a large fraction of both the animal and human population^[3] endangering infants, the elderly, and immunocompromised people, which are at high risk of hospitalization and death, due to influenza-related complications.^[4-8] As a result, seasonal influenza has yearly a remarkable socio-economic impact. Respiratory diseases can cost a significant fraction of the total health expenditures in developed and mainly in developing countries.^[9,10] Because influenza mutates so rapidly, the development of a lifelong vaccine is still a major challenge.^[11-13] Vaccine development would pose even higher challenges when we focus on the occasional pandemics instead of yearly outbreaks. In such a case, the development time of a new vaccine would represent a serious risk. Furthermore, even in the presence of a vaccine, reaching reasonable vaccination coverage is

Dr. O. Kocabiyik, Dr. V. Cagno, Dr. P. J. Silva, Y. Zhu, Prof. F. Stellacci
Institute of Materials
École Polytechnique Fédérale de Lausanne
Station 12, Lausanne 1015, Switzerland
E-mail: francesco.stellacci@epfl.ch

Dr. V. Cagno, Dr. C. Medaglia, Prof. C. Tapparel
Department of Microbiology and Molecular Medicine
University of Geneva
Rue Michel Servet 1, Geneva 1205, Switzerland
E-mail: valeria.cagno@unige.ch

L. Sedano, J. Mettier, B. Da Costa, R. Le Goffic
Virologie et Immunologie Moléculaire
Institut National Recherche Agronomique
Université Paris-Saclay
Jouy en Josas 78350, France

 The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/advs.202001012>

© 2020 The Authors. *Advanced Science* published by Wiley-VCH GmbH. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

DOI: 10.1002/advs.202001012

Dr. Y. Bhide, W. L. J. Hinrichs
Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy
University of Groningen
Groningen 9713GZ, The Netherlands
E-mail: y.c.bhide@umcg.nl

Dr. Y. Bhide, Prof. A. Huckriede
University Medical Center Groningen
Department of Medical Microbiology and Infection Prevention (internal
postcode EB88)
University of Groningen
Hanzeplein 1, Groningen 9713GZ, The Netherlands
E-mail: a.l.w.huckriede@umcg.nl

S. Constant, S. Huang
Epithelix Sas
Chemin des Aulx 18, Geneva 1228, Switzerland

Dr. L. Kaiser
Hopital Universitaire de Genève
Rue Gabrielle Perret Gentil 4, Geneva 1205, Switzerland

Prof. F. Stellacci
Bioengineering Institute
Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne
Station 12, Lausanne 1015, Switzerland

far from a foregone conclusion. As a consequence, the risk of a new pandemic, such as the Spanish-flu, is still present and recognized as one of the top threats to global health.^[14–16]

Naturally, the second line of defense after vaccines, are antiviral drugs. A number of anti-influenza drugs are currently approved: neuraminidase inhibitors such as zanamivir and oseltamivir, ion channel inhibitors such as amantadine, fusion inhibitors such as umifenovir (only in Russia and China) and polymerase inhibitor such as baloxavir marboxil, which was recently approved in the US and Japan. Yet, it is recognized that the efficacy of current drugs is far from ideal. Concerns about these drugs range from significant side effects to the appearance of drug-resistant viruses after a short period of use.^[17] Given the importance of this issue, a number of other antivirals are in clinical trials.^[18–25] The majority of these drugs are monoclonal antibodies^[26,27] that inhibit the fusion of the virus to the host cell. They are promising, but it is likely that they will be costly due to their manufacturing processes. Furthermore, monoclonal antibodies are expected to be good prophylactic drugs, but their efficacy in therapeutic administration (i.e., post infection) is a matter of intense research.

An ideal anti-influenza drug should be broad-spectrum, by targeting a highly conserved part of the virus and, in order to avoid loss of efficacy due to the dilution in body fluids, has an irreversible effect, that is, be virucidal. Obviously, this drug needs to be truly non-toxic. There are quite a few research lines on the development of molecules that target conserved parts of the virus.^[28–41] Peptide-based compounds have shown convincing in vivo results in therapeutic settings.^[41] The situation is different for compounds that are fully chemical (and hence inexpensive to manufacture). These compounds employ elegant multivalent strategy and reach very low inhibitory concentrations;^[33–38] but, to the best of our knowledge, these compounds are all reversible in their action and hence could face hurdles when translating into drugs. Indeed, to date, no multivalent compound with broad-spectrum anti-influenza efficacy has shown convincing post-infection results in vivo of the type that we present here.

The search for virucidal (i.e., irreversible) drugs with limited toxicity has been very challenging. Polymers bearing hydrophobic groups have previously been reported to show virucidal activity or enhanced antiviral activity.^[42,43] We have also shown that gold nanoparticles^[44] and β -cyclodextrins^[45] (β -CDs) modified with 11-undecane sulfonic acid display a virucidal mechanism against a wide range of heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) binding viruses, with no cellular toxicity. These compounds were capable of exerting forces that ultimately deform the virus particle. The chemical structure of the ligand was shown to be essential in order to achieve such irreversible inhibition.

Here, we adopted a similar strategy in order to target human influenza viruses and avian influenza viruses. 6' sialyl-N-acetylglucosamine (6'SLN) and 3' sialyl-N-acetylglucosamine (3'SLN), that specifically binds to hemagglutinin (HA) trimers of influenza strains,^[46] were grafted onto the primary face of β -CDs through a series of different linkers. The structure of all modified cyclodextrins discussed in this work is shown in **Figure 1**. Of note, since each HA trimer has three sialic acid binding pockets, we aimed to modify the β -CDs with three trisaccharides. Therefore, the cyclodextrins are not fully modified but they all bear, on average, a comparable number of trisaccharides (Figures S1 and

S2, Supporting Information), determined using ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR). In vitro dose–response assays against influenza A/Netherlands/602/2009 (H1N1) strain (A/NL/09), were conducted to compare the inhibitory activity of these molecules (Figure 1 and Figure S3, Supporting Information). The infection was quantified with immunocytochemical assays at 24 h post-infection (hpi). β -CDs bearing a sufficiently long, hydrophobic linker and 6'SLN end-group (**C6-6'**, **C11-6'**, and **C14-6'**) showed strong inhibitory activity against infection with influenza A/NL/09, having EC₅₀ values in the nanomolar range. On the other hand, the β -CD with a shorter linker, **C1-6'**, poorly protects from the infection. Introducing a sufficiently long linker clearly enhanced the end-group flexibility; hence the inhibitory concentrations decreased. The EC₅₀ was comparable (yet slightly higher) when the hydrophobic linker was replaced with a hydrophilic poly(ethylene glycol) (8) (PEG8) linker (**P8-6'**).

In order to demonstrate viral inhibition is due to trisaccharide group but not due to β -CD or the linker bearing carboxylic acid end group, we also tested β -CD solely modified with PEG8 linker (**P8**). P8 did not inhibit influenza A/NL/09, even at very high material concentrations.

C11-6', the molecule that showed the best inhibitory activity against A/NL/09, displayed strong antiviral activity against human influenza strains from both the A (H1N1 and H3N2) and the B type (**Table 1** and Figure S4, Supporting Information). Importantly, it inhibited very recent A (H1N1) and B clinical strains (from the 2017/2018 influenza season), isolated from patients in the University Hospital of Geneva and passaged only once in Madin-Darby Canine kidney (MDCK) cells. **C11-6'** did not show any antiviral activity against herpes simplex virus 2 (HSV-2), an HSPG-binding virus, indicating the specificity of the compound for sialic acid dependent viruses.

6'SLN is known to be specific to human influenza strains, whereas 3'SLN is preferred by avian influenza strains as a primary attachment point.^[47] To prove the generality of our approach, especially against influenza strains that are known to have the ability to cross the species barrier, we synthesized and tested **C11-3'** (Figure 1) against avian influenza strains. We show that **C11-3'** inhibits both H5N1 and H7N1 avian strains, at 4.1 and 8.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentrations respectively (see Table 1). De facto, these results confirm the antiviral strategy adopted against human strains. We additionally tested whether **C11-3'** could inhibit the human strain A/NL/09 and whether **C11-6'** would also be active against the avian strain, H5N1. **C11-3'** displayed good inhibitory activity against A/NL/09 (Figure 1 and Table 1), whereas **C11-6'** did not show any activity against H5N1 (Table 1 and Figure S5, Supporting Information). These results are in line with previous literature comparing the binding affinities of avian and human strains to the different types of sialic acids.^[47,48] Avian influenza strains (particularly H5N1 strains) preferentially bind to alpha -2,3 linked sialic acid, which has a thin and straight trans conformation. On the other hand, the wider sialic acid binding site of human strains can accommodate both the bulky cis conformation of alpha -2,6 linked sialic acid and the narrower -2,3 linked sialic acid.^[47,48]

The synthesis of similar compounds sharing the β -cyclodextrin core and the 6'SLN moiety but different linkers allowed us to highlight a structural feature conferring irreversible inhibitory activity, that is, virucidal action (**Figure 2** and

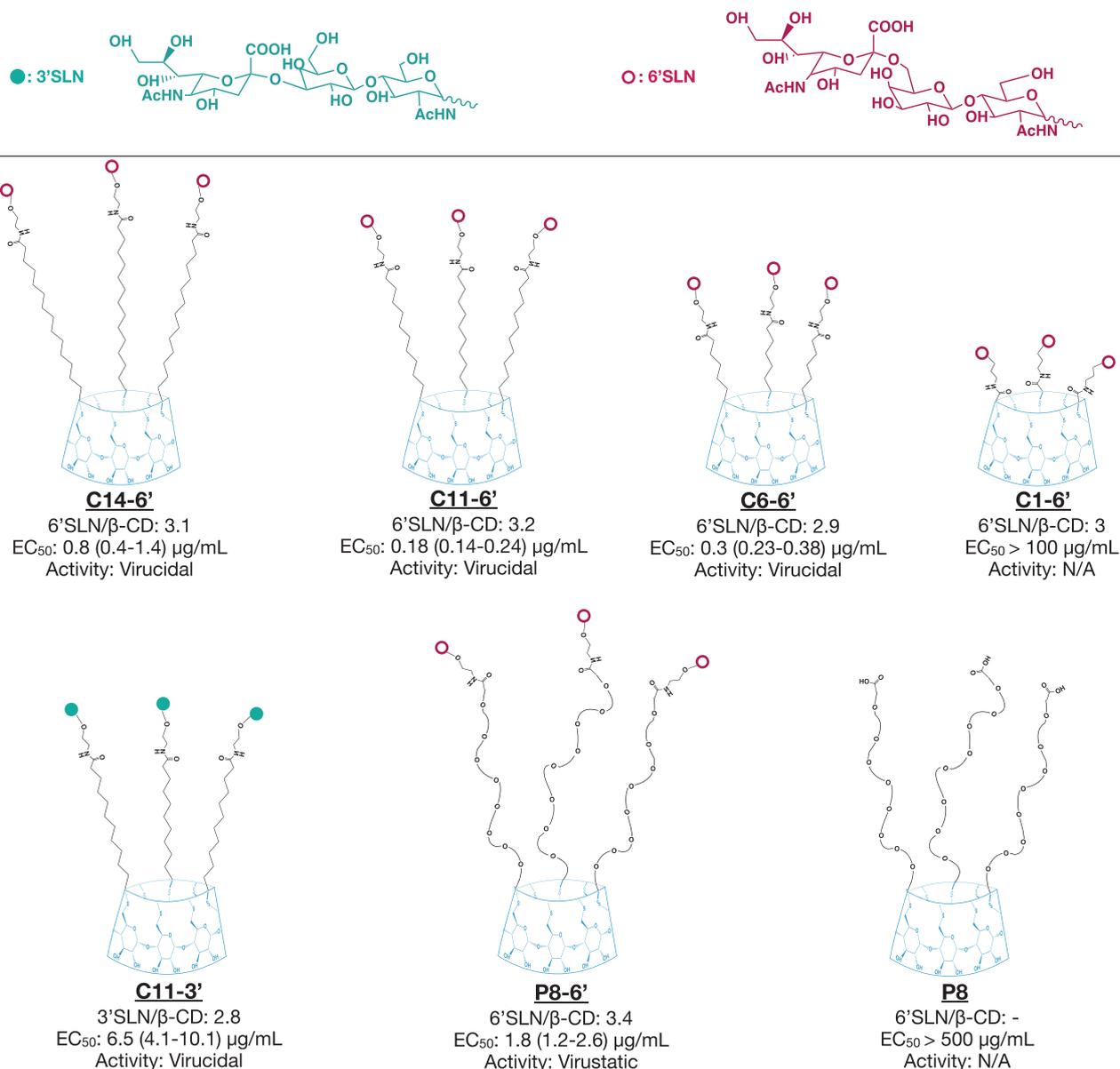


Figure 1. Summary of the modified cyclodextrins. The average number of 6'SLN or 3'SLN per β -CD was calculated by ¹H NMR. The representative chemical structures of modified cyclodextrins were constructed based on NMR results. EC₅₀ represents the half-effective concentrations on MDCK cells at 24 hpi against A/NL/09 with the respective 95% confidence interval (CI) (Figure S3, Supporting Information). N/A: not assessable.

Figure S6, Supporting Information). This feature differs from the one described in our previous work where only the length of the linkers was compared.^[44] Here, we hypothesized that one of the key components of an irreversible viral inhibition is that the binding moiety (here 6'SLN) is borne by a sufficiently long hydrophobic linker. A hydrophilic linker such as PEG should not be capable of generating forces that permanently inactivate the virus. To test this hypothesis, we compared **C11-6'** and **P8-6'**. These two compounds differ solely in the hydrophobicity of the linker and show comparable inhibitory activity against A/NL/09, as shown on the left in Figure 2a,b. Virucidal assays were conducted as previously described^[44] to compare the mechanism of inhibition of these compounds, that is, virucidal (irreversible)

or virustatic (reversible). Briefly, amounts of the compounds that provide complete protection (10 μ g of **C11-6'** and 50 μ g of **P8-6'**) were incubated with the virus for 1 h. Serial dilutions of the inocula were conducted followed by an evaluation of the infectivity. In the case of **P8-6'**, the right graph in Figure 2a shows that while at the initial concentration complete protection was present, upon dilution the difference with the infectivity of the control sample (virus alone) was lost, that is, the inhibitory effect was found to be reversible (virustatic). In the case of **C11-6'** the right graph in Figure 2b shows that complete protection was kept upon dilution and the graphs in Figure 2c show that this property was conserved against a number of different strains.

Table 1. Inhibitory activity of C11-6' and C11-3' against different influenza strains.

	Compound	CC ₅₀ [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	EC ₅₀ [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	EC ₅₀ ^{a)} [nM]
A/Netherlands/602/2009 (H1N1)	C11-6'	>100	0.18 (0.14 – 0.24)	42
	C11-3'	>100	6.5 (4.1-10.1)	>1000
A/Switzerland/8337/2018-MDCK1 (H1N1)	C11-6'	>100	0.5 (0.4 – 0.67)	125
A/Singapore/37/2004 (H3N2)	C11-6'	>100	0.23 (0.16 – 0.34)	56.5
B/Wisconsin/01/2010 ^{b)}	C11-6'	>100	2.2 (1.49 – 3.42)	500
B/Switzerland/3849/2018-MDCK1 ^{b)}	C11-6'	>100	20 (10.5 – 28.7)	>1000
A/turkey/Turkey/2005 (H5N1)	C11-3'	>100	4.1 (2.55-6.7)	931
	C11-6	>100	N/A	N/A
A/turkey/Italy/1999 (H7N1)	C11-3'	>100	8.8 (3.2-26)	>1000
HSV-2 (Control)	C11-6'	>100	N/A	N/A

^{a)} Molar concentrations were determined based on the modified cyclodextrins ^{b)} B Yamagata lineage CC₅₀: Half-cytotoxic concentration. EC₅₀: Half-effective concentration with 95% CI in brackets. N/A: not assessable

To further compare **C11-6'** and **P8-6'**, we performed ex vivo experiments in MucilAir, a 3D model of human airway reconstituted epithelia. These air-liquid interface cultures perfectly mimic both the pseudostratified architecture (basal, ciliated, and goblet cells) and the barrier defense mechanism (i.e., the mucociliary clearance and epithelial cell immunity) of the human upper respiratory epithelium, the main site of influenza virus replication in humans. Ex vivo experiments were conducted with clinical H1N1 pandemic 09 strain (A/Switzerland/3076/16) that has not been passaged in cells to exclude any adaptation bias. **C11-6'** or **P8-6'** (50 $\mu\text{g}/\text{tissue}$) and the virus (10^4 RNA copies/tissue) were first added simultaneously on the apical surface of the tissues, without prior incubation. After four hours, the inocula were removed, the tissues were washed and the progress of the infection was monitored on daily basis with quantitative polymerase chain reaction (qPCR) performed on viruses isolated from the apical washes of the tissue, without any re-addition of the molecule. **C11-6'** completely prevented virus replication throughout the entire course of the experiment, while **P8-6'** slightly reduced viral replication the first two days post-infection (dpi) but not thereafter (Figure 3a).

Moreover, in the tissues treated with **C11-6'**, the inhibition of viral replication was also reflected by the absence of infected cells and the undisturbed morphology of the treated tissues, strikingly different from the untreated or **P8-6'**-treated tissues (Figure 3b). Immunofluorescence images and the lack of lactate dehydrogenase release in the apical washes demonstrated that the ciliated cell layer as well as the physiological cilia beating and tissue integrity were preserved (Figure 3b and Figure S7, Supporting Information). In stark contrast, the untreated tissue or the **P8-6'**-treated controls, presented reduced thickness due to alteration of the ciliated cell layer, and the presence of infected cells (Figure 3b). To exclude that the residual viral level detected by qPCR in the treated tissues was related to active replication, we kept the tissues in culture for 23 days but never observed an increase in viral titer over time, while the untreated tissues were persistently shedding virus as previously reported^[49] (Figure S8, Supporting Information). Importantly, ex vivo experiments were conducted also in more stringent post-treatment conditions in which **C11-6'** (30 $\mu\text{g}/\text{tissue}$) was administrated every 24 h and for 4 days,

starting at 1 dpi to mimic a therapeutic administration. Also in these conditions, the compound showed a remarkable inhibitory activity, proving its potential as a therapeutic agent (Figure 3c). In the same ex vivo model, we also evaluated the biocompatibility of high doses of **C11-6'**, administered daily. **C11-6'** did neither show any cytotoxic nor pro-inflammatory activity in the above described conditions (Figure S9, Supporting Information).

Lastly, in vivo experiments were conducted with BALB/c mice administered first with **C11-6'** (1.25 or 3.75 mg kg^{-1}) and immediately after with A/California/09 via the intranasal route and subsequently treated daily for 5 days. The weights of the mice were measured daily in order to estimate the impact of **C11-6'** administration on the infected animal's physiological condition (weight loss variation is shown in Figure S11, Supporting Information). A significant increase in survival was observed in presence of **C11-6'** 3.75 mg kg^{-1} (9/12 mice) and the oseltamivir 30 $\text{mg kg}^{-1}/\text{day}$ (10/10 mice) if compared to placebo control (3/12 mice). Additional experiments were carried out with the administration of 1.25 mg kg^{-1} of **C11-6'** at the time of infection by measuring the viral load in the lungs and the viral titer in the broncho-alveolar lavages at 2dpi (Figure S11, Supporting Information). The significative reduction in presence of 1.25 mg kg^{-1} of **C11-6'** demonstrates that a single administration before the infection is able to significantly decrease the infectious titer of the virus. Subsequently, we performed a post-treatment experiment, in which mice were treated at 8 (Figure S12, Supporting Information) or 24 hpi (Figure 3d) with **C11-6'** (3.75 mg kg^{-1} or 7.5 mg kg^{-1}) or oseltamivir (30 $\text{mg kg}^{-1}/\text{day}$). In presence of **C11-6'** with the start of treatment at 24hpi 9 out of 10 mice survived to the viral challenge in the 7.5 mg kg^{-1} group and 4 in the 3.75 mg kg^{-1} group, in contrast with oseltamivir in which group 0 out of 10 survived. Collectively, these results suggest a potent prophylactic and therapeutic capacity of the **C11-6'** compound in vivo.

In summary, we present here a new design rule to produce effective, non-toxic, and virucidal compounds against influenza virus. To dissect the relationship between the antiviral mechanism of action and the structure of our newly designed virucidal we compare, for the first time, its efficacy with that of a highly similar compound displaying a virustatic activity. We show that if

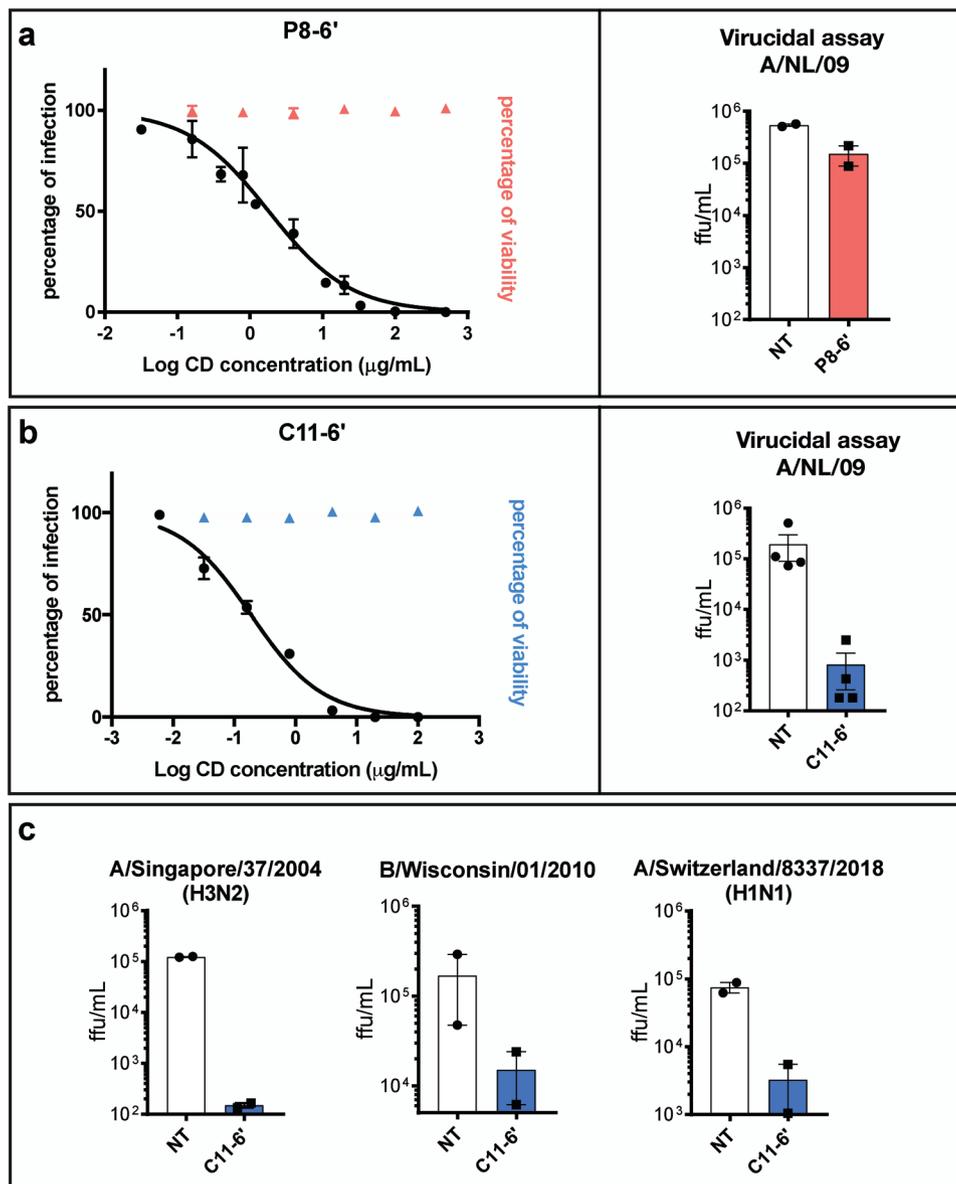


Figure 2. Antiviral activity comparison of C11-6' and P8-6' in vitro. a,b) These panels show on the graphs on the left the inhibitory activity of each compound against A/NL/09, superimposed with the results of the cell viability assays. Both of the compounds inhibit the virus in the dose–response assay. In the virucidal assays on the right, **C11-6'** reduced the virus titer by 1000 times, whereas the infection was fully recovered in the case of **P8-6'**. Hence **C11-6'** has an irreversible inhibitory effect on the virus while the effect of **P8-6'** is reversible. c) Virucidal activity of **C11-6'** against other influenza strains was further investigated confirming its irreversible activity independently of the strain. Note that in the figure's axes **ffu** stands for focus forming units and **NT** for non-treated. In Figure 2c the following viral strains were tested: A/Singapore/37/2004 (H3N2), B/Wisconsin/01/2010 and A/Switzerland/8337/2018-MDCK1 (H1N1) Figure 2c. Results are mean and SEM of 2 independent experiments performed in duplicate.

the inhibitory effect is reversible, that is, virustatic, the antiviral efficacy is lost when moving from in vitro to ex vivo. On the other hand, the virucidal counterpart of the same molecule keeps its efficacy is maintained from in vitro all the way to in vivo. Importantly, we show in vivo results with remarkable effect on mice survival for a pandemic strain of H1N1 with the compound given intranasally 24h post-infection. Therefore, we believe that our approach to design non-toxic virucidal macromolecules has out-

standing potential for the prevention and the treatment of not only human, but also avian influenza infections.

Experimental Section

Detailed information on the experimental procedures can be found in the Supporting Information.

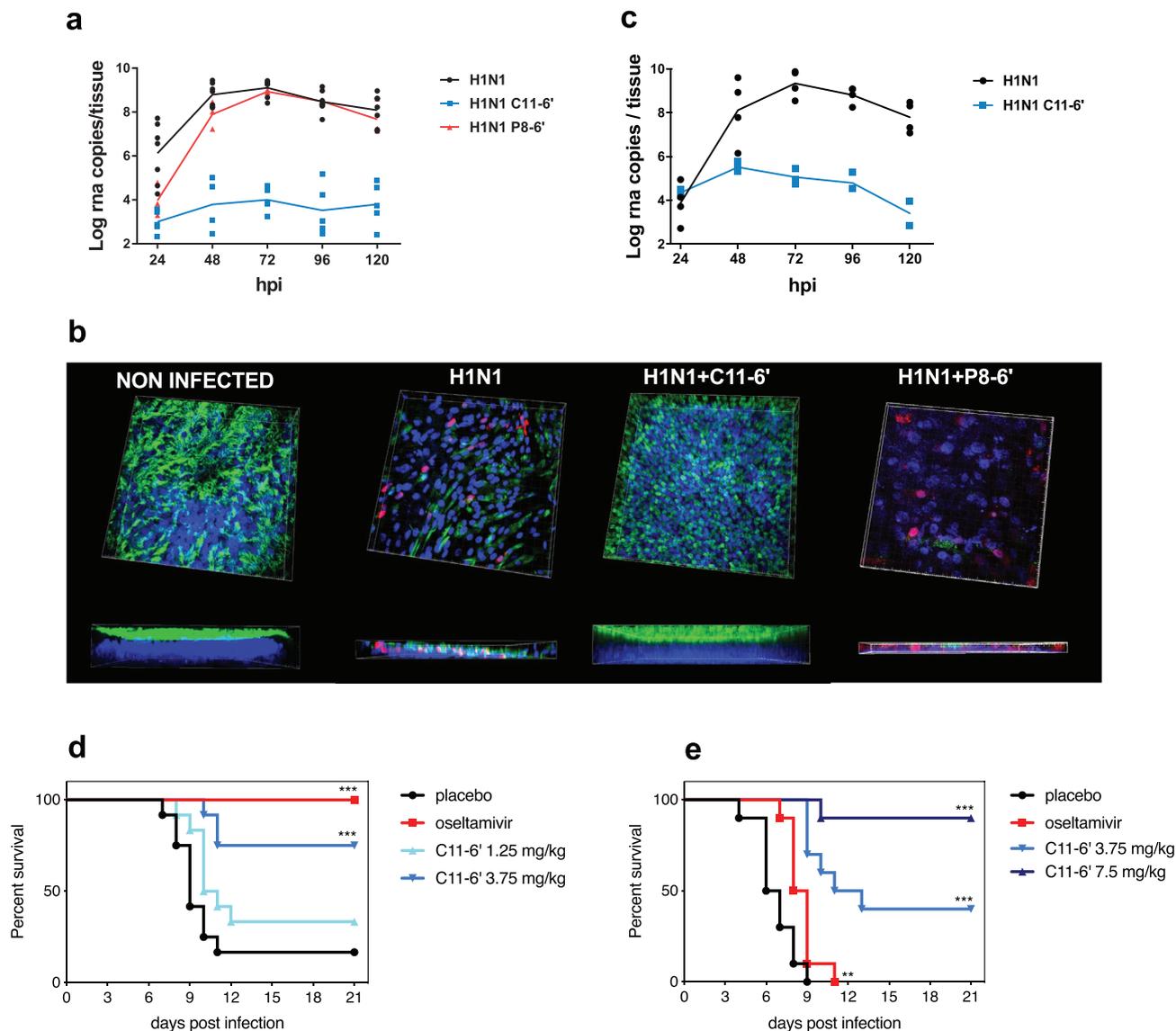


Figure 3. Ex vivo (a to c) and in vivo (d to e) inhibitory activity of C11-6'. a) Ex vivo, C11-6' provided full protection against clinical H1N1 pandemic 09 strain in co-treatment condition, whereas P8-6' only provided minor protection at the beginning of the infection. b) Immunofluorescence at 7 days post-infection (co-treatment condition) confirms the protection provided by C11-6'. Red: monoclonal antibody influenza A, blue: DAPI, green: β -IV-tubulin (marker of ciliated cells). The thickness of each tissue is shown at the bottom of the corresponding image. c) C11-6' also showed high efficacy in post-treatment condition. Results of (a) and (c) are mean and SEM of 2 to 4 independent experiments with intra-experimental duplicates. Images of (b) are representative of 10 images taken for each condition. In vivo, mice (12/group) were intra-nasally treated with PBS or C11-6' or by oral gavage with oseltamivir and infected with A/California/09. d) Subsequent treatments were administered daily for the following 5 days, image shows the survival curve. e) Mice were infected and treated with C11-6' or oseltamivir at 24 hpi and daily for the 4 following days, images show the survival curves *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

The work was supported by the Leenaards Foundation (grant 4390 to L.K., C.T., and F.S.), the Swiss National Science Foundation (Sinergia grant CRSII5_180323 to F.S. and C.T.), and the Werner Siemens-Stiftung. The mouse model work was done at the Institute for Antiviral Research at Utah

State University. Funding was provided by the National Institute of Health contract number HHSN2722017000411, Task Order A30, from the Respiratory Diseases Branch, Division of Microbiology and Infectious Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, USA.

Conflict of Interest

O.K., V.C., C.T., and F.S. are inventors on patent number EP18192559.5. All the other authors declare no conflict of interest.

Author Contributions

O.K., V.C., C.T., and F.S. contributed equally to this work. Conceptualization, O.K., V.C., C.T., and F.S.; Methodology, O.K., V.C., and R.L.G. Investigation, O.K. and Y.Z. synthesized the cyclodextrins; O.K., V.C., J.B., J.M., and C.M. performed the in vitro experiments; V.C. performed the ex vivo experiments; L.S., B.D.C., and R.L.G. performed the in vivo experiments. Writing – Original Draft, O.K., V.C., C.T., and F.S. Writing – Review & Editing, all authors. Funding Acquisition, C.T., L.K., and F.S.; Resources, S.H. and S.C. Supervision, W.L.J.H., A.H., R.L.G., C.T., and F.S.

Keywords

3'SLN, 6'SLN, antivirals, Influenza, virucidal

Received: March 18, 2020

Revised: September 7, 2020

Published online:

- [1] J. K. Taubenberger, D. M. Morens, *Annu. Rev. Pathol.* **2008**, *3*, 499.
- [2] D. Almond, *J. Polit. Econ.* **2006**, *114*, 672.
- [3] P. Palese, *Nat. Med.* **2004**, *10*, S82.
- [4] J. Bustamante, I. Calzado, T. Sainz, C. Calvo, T. Del Rosal, A. Méndez-Echevarría, *Eur. J. Pediatr.* **2017**, *176*, 1425.
- [5] C. Cohen, L. Simonsen, J.-W. Kang, M. Miller, J. McAnerney, L. Blumberg, B. Schoub, S. A. Madhi, C. Viboud, *Clin. Infect. Dis.* **2010**, *51*, 1362.
- [6] Y. Ren, Y. Yin, W. Li, Y. Lin, T. Liu, S. Wang, S. Zhang, Z. Li, X. Wang, Z. Bi, *Viol. J.* **2013**, *10*, 149.
- [7] L. Simonsen, M. J. Clarke, L. B. Schonberger, N. H. Arden, N. J. Cox, K. Fukuda, *J. Infect. Dis.* **1998**, *178*, 53.
- [8] R. A. Weinstein, C. B. Bridges, M. J. Kuehnert, C. B. Hall, *Clin. Infect. Dis.* **2003**, *37*, 1094.
- [9] M. U. Bhuiyan, S. P. Luby, N. I. Alamgir, N. Homaira, A. A. Mamun, J. A. M. Khan, J. Abedin, K. Sturm-Ramirez, E. S. Gurley, R. U. Zaman, A. S. M. Alamgir, M. Rahman, M.-A. Widdowson, E. Azziz-Baumgartner, *Influenza Other Respir. Viruses* **2014**, *8*, 406.
- [10] W. C. W. S. Putri, D. J. Muscatello, M. S. Stockwell, A. T. Newall, *Vaccine* **2018**, *36*, 3960.
- [11] R. R. Regoes, S. Bonhoeffer, *Science* **2006**, *312*, 389.
- [12] F. Carrat, A. Flahault, *Vaccine* **2007**, *25*, 6852.
- [13] N. Pica, P. Palese, *Annu. Rev. Med.* **2013**, *64*, 189.
- [14] S. C. Trock, S. A. Burke, N. J. Cox, *Emerging Infect. Dis.* **2015**, *21*, 1372.
- [15] S. Mounier-Jack, R. J. Coker, *Lancet* **2006**, *367*, 1405.
- [16] Ten threats to global health in 2019, <https://www.who.int/emergencies/ten-threats-to-global-health-in-2019> (accessed: February 2019).
- [17] M. Imai, M. Yamashita, Y. Sakai-Tagawa, K. Iwatsuki-Horimoto, M. Kiso, J. Murakami, A. Yasuhara, K. Takada, M. Ito, N. Nakajima, K. Takahashi, T. J. S. Lopes, J. Dutta, Z. Khan, D. Kriti, H. van Bakel, A. Tokita, H. Hagiwara, N. Izumida, H. Kuroki, T. Nishino, N. Wada, M. Koga, E. Adachi, D. Jubishi, H. Hasegawa, Y. Kawaoka, *Nat. Microbiol.* **2020**, *5*, 27.
- [18] N. C. Wu, I. A. Wilson, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2018**, *25*, 115.
- [19] G. B. Triana-Baltzer, M. Babizki, M. C. W. Chan, A. C. N. Wong, L. M. Aschenbrenner, E. R. Campbell, Q.-X. Li, R. W. Y. Chan, J. S. M. Peiris, J. M. Nicholls, F. Fang, *J. Antimicrob. Chemother.* **2010**, *65*, 275.
- [20] K. Sleeman, V. P. Mishin, V. M. Deyde, Y. Furuta, A. I. Klimov, L. V. Gubareva, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 2517.
- [21] G. Belardo, O. Cenciarelli, S. L. Frazia, J. F. Rossignol, M. G. Santoro, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 1061.
- [22] P. Gupta, A. V. Kamath, S. Park, H. Chiu, J. Lutman, M. Maia, M.-W. Tan, M. Xu, L. Swem, R. Deng, *mAbs* **2016**, *8*, 991.
- [23] D. C. Ekiert, R. H. E. Friesen, G. Bhabha, T. Kwaks, M. Jongeneelen, W. Yu, C. Ophorst, F. Cox, H. J. W. M. Korse, B. Brandenburg, R. Vogels, J. P. J. Brakenhoff, R. Kompier, M. H. Koldijk, L. A. H. M. Cornelissen, L. L. M. Poon, M. Peiris, W. Koudstaal, I. A. Wilson, J. Goudsmit, *Science* **2011**, *333*, 843.
- [24] N. Chai, L. R. Swem, S. Park, G. Nakamura, N. Chiang, A. Estevez, R. Fong, L. Kamen, E. Kho, M. Reichelt, Z. Lin, H. Chiu, E. Skippington, Z. Modrusan, J. Stinson, M. Xu, P. Lupardus, C. Ciferri, M.-W. Tan, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14234.
- [25] N. L. Kallewaard, D. Corti, P. J. Collins, U. Neu, J. M. McAuliffe, E. Benjamin, L. Wachter-Rosati, F. J. Palmer-Hill, A. Q. Yuan, P. A. Walker, M. K. Vorlaender, S. Bianchi, B. Guarino, A. De Marco, F. Vanzetta, G. Agatic, M. Foglierini, D. Pinna, B. Fernandez-Rodriguez, A. Fruehwirth, C. Silacci, R. W. Ogrodowicz, S. R. Martin, F. Sallusto, J. A. Suzich, A. Lanzavecchia, Q. Zhu, S. J. Gamblin, J. J. Skehel, *Cell* **2016**, *166*, 596.
- [26] P. Koszalka, D. Tilmanis, A. C. Hurt, *Influenza Other Respir. Viruses* **2017**, *11*, 240.
- [27] S. Bangaru, S. Lang, M. Schotsaert, H. A. Vanderven, X. Zhu, N. Kose, R. Bombardi, J. A. Finn, S. J. Kent, P. Gilchuk, I. Gilchuk, H. L. Turner, A. García-Sastre, S. Li, A. B. Ward, I. A. Wilson, J. E. Crowe, *Cell* **2019**, *177*, 1136.
- [28] E.-M. Strauch, S. M. Bernard, D. La, A. J. Bohn, P. S. Lee, C. E. Anderson, T. Nieuwsma, C. A. Holstein, N. K. Garcia, K. A. Hooper, R. Ravichandran, J. W. Nelson, W. Sheffler, J. D. Bloom, K. K. Lee, A. B. Ward, P. Yager, D. H. Fuller, I. A. Wilson, D. Baker, *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 667.
- [29] D. Lauster, M. Glanz, M. Bardua, K. Ludwig, M. Hellmund, U. Hoffmann, A. Hamann, C. Böttcher, R. Haag, C. P. R. Hackenberger, A. Herrmann, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56*, 5931.
- [30] A. Antanasijevic, H. Cheng, D. J. Wardrop, L. Rong, M. Caffrey, *PLoS One* **2013**, *8*, e76363.
- [31] A. Basu, A. Antanasijevic, M. Wang, B. Li, D. M. Mills, J. A. Ames, P. J. Nash, J. D. Williams, N. P. Peet, D. T. Moir, M. N. Prichard, K. A. Keith, D. L. Barnard, M. Caffrey, L. Rong, T. L. Bowlin, *J. Virol.* **2014**, *88*, 1447.
- [32] J. D. Reuter, A. Myc, M. M. Hayes, Z. Gan, R. Roy, D. Qin, R. Yin, L. T. Piehler, R. Esfand, D. A. Tomalia, J. R. Baker, *Bioconjug. Chem.* **1999**, *10*, 271.
- [33] S. Bhatia, D. Lauster, M. Bardua, K. Ludwig, S. Angioletti-Uberti, N. Popp, U. Hoffmann, F. Paulus, M. Budt, M. Stadtmüller, T. Wolff, A. Hamann, C. Böttcher, A. Herrmann, R. Haag, *Biomaterials* **2017**, *138*, 22.
- [34] I. Papp, C. Sieben, A. L. Sisson, J. Kostka, C. Böttcher, K. Ludwig, A. Herrmann, R. Haag, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 887.
- [35] S. Tang, W. B. Puryear, B. M. Seifried, X. Dong, J. A. Runstadler, K. Ribbeck, B. D. Olsen, *ACS Macro Lett.* **2016**, *5*, 413.
- [36] S.-J. Kwon, D. H. Na, J. H. Kwak, M. Douaisi, F. Zhang, E. J. Park, J.-H. Park, H. Youn, C.-S. Song, R. S. Kane, J. S. Dordick, K. B. Lee, R. J. Linhardt, *Nat. Nanotechnol.* **2017**, *12*, 48.
- [37] S. Liang, M. Li, X. Yu, H. Jin, Y. Zhang, L. Zhang, D. Zhou, S. Xiao, *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *166*, 328.
- [38] S. Xiao, L. Si, Z. Tian, P. Jiao, Z. Fan, K. Meng, X. Zhou, H. Wang, R. Xu, X. Han, G. Fu, Y. Zhang, L. Zhang, D. Zhou, *Biomaterials* **2016**, *78*, 74.
- [39] D. J. Holthausen, S. H. Lee, V. T. Kumar, N. M. Bouvier, F. Krammer, A. H. Ellebedy, J. Wrammert, A. C. Lowen, S. George, M. R. Pillai, J. Jacob, *Immunity* **2017**, *46*, 587.
- [40] M. J. P. van Dongen, R. U. Kadam, J. Juraszek, E. Lawson, B. Brandenburg, F. Schmitz, W. B. G. Schepens, B. Stoops, H. A. van Diepen, M. Jongeneelen, C. Tang, J. Vermond, A. van Eijgen-Obregoso Real, S. Blokland, D. Garg, W. Yu, W. Goutier, E. Lanckacker, J. M. Klap, D. C. G. Peeters, J. Wu, C. Buyck, T. H. M. Jonckers, D. Roymans, P. Roeffens, R. Vogels, W. Koudstaal, R. H. E. Friesen, P. Raboisson, D. Dhanak, J. Goudsmit, I. A. Wilson, *Science* **2019**, *363*, eaar6221.

- [41] M. T. Koday, J. Nelson, A. Chevalier, M. Koday, H. Kalinoski, L. Stewart, L. Carter, T. Nieusma, P. S. Lee, A. B. Ward, I. A. Wilson, A. Dagley, D. F. Smee, D. Baker, D. H. Fuller, *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, e1005409.
- [42] J. Haldar, D. An, L. Á. de Cienfuegos, J. Chen, A. M. Klivanov, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 17667.
- [43] M. Tengdelius, K. Y. Cheung, M. Griffith, P. Pålsson, P. Konradsson, *Eur. Polym. J.* **2018**, *98*, 285.
- [44] V. Cagno, P. Andreozzi, M. D'Alicarnasso, P. J. Silva, M. Mueller, M. Galloux, R. L. Goffic, S. T. Jones, M. Vallino, J. Hodek, J. Weber, S. Sen, E.-R. Janeček, A. Bekdemir, B. Sanavio, C. Martinelli, M. Donalizio, M.-A. R. Welti, J.-F. Eleouet, Y. Han, L. Kaiser, L. Vukovic, C. Tapparel, P. Král, S. Krol, D. Lembo, F. Stellacci, *Nat. Mater.* **2018**, *17*, 195.
- [45] S. T. Jones, V. Cagno, M. Janeček, D. Ortiz, N. Gasilova, J. Piret, M. Gasbarri, D. A. Constant, Y. Han, L. Vuković, P. Král, L. Kaiser, S. Huang, S. Constant, K. Kirkegaard, G. Boivin, F. Stellacci, C. Tapparel, *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaax9318.
- [46] Primary Screen GlycanScreen primscreen_3818, http://www.functionalglycomics.org/glycomics/HServlet?operation=view&sideMenu=no&psId=primscreen_3818 (accessed: February 2019).
- [47] J. E. Stencel-Baerenwald, K. Reiss, D. M. Reiter, T. Stehle, T. S. Dermody, *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12*, 739.
- [48] J. S. Long, B. Mistry, S. M. Haslam, W. S. Barclay, *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 67.
- [49] M. Essaidi-Laziosi, F. Brito, S. Benaoudia, L. Royston, V. Cagno, M. Fernandes-Rocha, I. Piuze, E. Zdobnov, S. Huang, S. Constant, M.-O. Boldi, L. Kaiser, C. Tapparel, *J. Allergy Clin. Immunol.* **2018**, *141*, 2074.



Study of the host specificity of PB1-F2-associated virulence

Joëlle Mettier, Daniel Marc, Laura Sedano, Bruno Da Costa, Christophe Chevalier & Ronan Le Goffic

To cite this article: Joëlle Mettier, Daniel Marc, Laura Sedano, Bruno Da Costa, Christophe Chevalier & Ronan Le Goffic (2021) Study of the host specificity of PB1-F2-associated virulence, *Virulence*, 12:1, 1647-1660, DOI: [10.1080/21505594.2021.1933848](https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1933848)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1933848>



© 2021 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



[View supplementary material](#)



Published online: 14 Jun 2021.



[Submit your article to this journal](#)



[View related articles](#)



[View Crossmark data](#)

RESEARCH PAPER

 OPEN ACCESS 

Study of the host specificity of PB1-F2-associated virulence

Joëlle Mettier^a, Daniel Marc , Laura Sedano^a, Bruno Da Costa^a, Christophe Chevalier ,
and Ronan Le Goffic 

^aUniversité Paris-Saclay, INRAE, UVSQ, UMR892 VIM, Jouy-en-Josas, France; ^bUMR1282 Infectiologie Et Santé Publique, INRAE, Nouzilly, France

ABSTRACT

Influenza A viruses cause important diseases in both human and animal. The PB1-F2 protein is a virulence factor expressed by some influenza viruses. Its deleterious action for the infected host is mostly described in mammals, while the available information is scarce in avian hosts. In this work, we compared the effects of PB1-F2 in avian and mammalian hosts by taking advantage of the zoonotic capabilities of an avian H7N1 virus. In vitro, the H7N1 virus did not behave differently when PB1-F2 was deficient while a H3N2 virus devoid of PB1-F2 was clearly less inflammatory. Likewise, when performing in vivo challenges of either chickens or embryonated eggs, with the wild-type or the PB1-F2 deficient virus, no difference could be observed in terms of mortality, host response or tropism. PB1-F2 therefore does not appear to play a major role as a virulence factor in the avian host. However, when infecting NF- κ B-luciferase reporter mice with the H7N1 viruses, a massive PB1-F2-dependent inflammation was quantified, highlighting the host specificity of PB1-F2 virulence. Surprisingly, a chimeric 7:1 H3N2 virus harboring an H7N1-origin segment 2 (i.e. expressing the avian PB1-F2) induced a milder inflammatory response than its PB1-F2-deficient counterpart. This result shows that the pro-inflammatory activity of PB1-F2 is governed by complex mechanisms involving components from both the virus and its infected host. Thus, a mere exchange of segment 2 between strains is not sufficient to transmit the deleterious character of PB1-F2.

ARTICLE HISTORY

Received 10 February 2021
Revised 26 April 2021
Accepted 14 May 2021

KEYWORDS

Influenza virus; PB1-F2;
Species barrier; zoonotic
viruses; reassortment; H7N1;
H3N2; mouse model;
intravital imaging; chicken
infection

Introduction

Influenza A viruses (IAV) are significant pathogens of humans and animals. They pose continuous health threat in the human population due to the rapid and constant evolution of seasonal strains [1]. In addition, animal strains of IAV have potential zoonotic capacities, which increase the risk of disease caused by these types of viruses. Thus, in recent years, a significant increase in human cases of H5 and H7 viruses of avian origin has been observed [2]. For example, an outbreak due to a highly pathogenic avian H7 virus observed in the Netherlands in 2003 caused conjunctivitis and influenza-like illness in 453 people [3]. Like H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses (HPAIV), low pathogenic avian influenza viruses (LPAIV) such as H7N9 viruses can cause severe human cases and can be lethal for humans, which underlines the zoonotic capacity of LPAIV [4]. Moreover, the absence of clinical signs in infected poultry prevents the development of an efficient surveillance and allows the circulation of LPAIV strains [5]. Such sudden eruptions perfectly exemplifies the

capacities of IAV to move from wild bird reservoir to humans and adapt to their new opportunistic host [2].

IAVs belong to the *Orthomyxoviridae* family, their genome is composed of eight single-stranded RNAs of negative polarity, encoding 11 to 17 proteins. Due to their segmented genome, IAVs are able to swap gene segments through reassortment [6], and the emergence of novel subtypes affecting human population generally results from one or several successive events of reassortment [7,8]. Since influenza A viruses have eight genome segments, there is theoretically a total of 254 reassortant combinations possible during cellular co-infection by 2 viruses, in addition to the two parental viruses ($2^8 = 256$). However, most of these combinations are not observed due to sub-optimal compatibility between the segment-vRNA packaging signals [9]. In addition, incompatibility between viral components will exclude certain combinations (due to functional mismatch), while the fitness of the reassortant virus will also be crucial: if it is lower than that of the parental viruses, its chances to emerge are clearly reduced [10]. Interestingly, the « Asian flu » (H2N2/1957) and the « Honk Kong flu » (H3N2/1968) pandemic influenza viruses emerged via the exchange of genomic RNA segments between human and

CONTACT Ronan Le Goffic  ronan.le-goffic@inrae.fr; Christophe Chevalier  christophe.chevalier@inrae.fr

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2021 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

avian viruses. Both viruses received the PB1 segment from the avian parent [11], which highlights the structural and functional compatibility of this segment between strains. This segment #2 reassortment seems to have contributed to the H3N2/1968 replication and transmissibility properties [12]. Moreover, the acquisition of segment 2 from the 1918 pandemic virus by a contemporary virus has been shown to provide both a replication advantage and an increased virulence to the chimeric virus (1918 PB1: Tx/91 (1:7)) [13]. By contrast, the 2009 pandemic virus, which was a triple reassortant, had acquired its #2 segment from an H3N2 strain. Remarkably, despite its high transmissibility, this virus proved to be relatively mildly virulent [14]. Segment 2, therefore, carries virulence determinants and can be exchanged by reassortment. This segment encodes three proteins: (i) PB1, the catalytic subunit of the viral polymerase, (ii) PB1-N40 an N-terminally truncated version of this protein, and (iii) PB1-F2, a small protein with well-described apoptotic and pro-inflammatory capabilities. It, therefore, seems likely that this segment can confer a better replicative potential via PB1 and an increased virulence via PB1-F2.

Beyond highly pathogenic viruses, the genetic reassortment of avian low pathogenic viruses is also a concern. Indeed, even low pathogenic IAVs appear to be able to transmit elements that contribute to virulence by reassortment with other strains. According to the literature, the H3 subtype could be the most appropriate sub-type to support such reassortment. As a matter of fact, H3 is the most ubiquitous subtype and has a wide range of hosts, including humans, pigs, horses, dogs, cats, seals, poultry and wild waterfowl [15]. H3, together with H1 subtypes, also causes the seasonal influenza that is widely found in humans. Recently, H3N2 isolates from live poultry markets and poultry slaughterhouses in Shanghai were reported to be reassorted with H5 and H7 subtypes, within domestic ducks and wild birds [16]. The acquisition, by a human seasonal influenza virus, of segment 2 from a low pathogenicity avian virus therefore appears to be a possible event. However, the likelihood of a gain in fitness and virulence remains uncertain.

PB1-F2 is considered to be a virulence factor in mammals hosts. This protein is able to induce cell death [17] and to exacerbates the inflammation generated by viral replication [18–20]. Yet, the action of PB1-F2 on the host response is different depending on the target cell type. Indeed, its induction of cell death is mainly observed on macrophages [21,22], while the pro-inflammatory effects seem to be mainly exerted on epithelial cells [23]. However, its impact on the infected cell is subject to debate and several functions, antinomic or not, have been described. Further, it has been shown that the activities of PB1-F2 vary depending on the strain and even the host [24]. Some PB1-F2 have a more

or less marked mitochondrial tropism while others are expressed in different cell compartments [25]. These differences in cellular compartmentalization could explain the opposite effects observed. Accordingly, the pro-apoptotic effects exerted by PB1-F2 on macrophages has recently been called into question [26]. Similarly, the pro-inflammatory activity of PB1-F2 is highly questioned, as it has also been described that PB1-F2 is able to inhibit the host response, especially through its inhibitory action on MAVS [27,28]. Surprisingly, these virulence functions are not observed in chickens, suggesting a specific function in the mammalian host that is absent in fowl [29; 30]. Remarkably, the deletion of PB1-F2 on a highly pathogenic H5N1 avian virus makes the virus more virulent in chickens [29]. This gain in virulence associated with a loss of expression of PB1-F2 had also been described during infection of chickens with low pathogenic H9N2 virus and is associated with a prolonged infectious shedding period [30]. All these elements show the important variability in PB1-F2 functions and underline the need to improve the characterization of this protein while distinguishing avian and human strains. In addition, the impact on host response of the introduction of an avian PB1-F2 in a human-adapted strain through a reassortment involving the segment #2 is of concern.

In this paper, we studied the functions of PB1-F2 in the context of a reassortment between a human H3N2 virus and a low pathogenic avian strain of subtype H7N1, in order to gain knowledge on the virulence capabilities of these reassortant viruses. Our data show that avian-origin segment 2 is fully functional in an H3N2 context. Furthermore, while H7N1 PB1-F2 does not cause any particular pathology in chickens, its expression in the context of infection in a mammalian model strongly exacerbates the inflammatory response. Another point identified in this work is that the transmission of PB1-F2 virulence features is not systematic and seems to be governed by other mechanisms than simple strain-to-strain transmission of viral genes.

Methods

Cell culture and viral infection

Chicken Lung Epithelial Cells (CLEC213) were isolated from lungs of White Leghorns chickens as described in reference [31]. Human bronchial epithelial cell-line BEAS-2B was obtained from the American Type Cell Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Both cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM F/12) medium supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS), 2 mM L-Glutamine and 100 UI/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin.

Avian and human cells were maintained in a 5% CO₂ incubator at 41 and 37°C respectively. For infection, cells were washed with FCS-free medium and incubated with virus at the indicated multiplicity of infection (MOI) for 2 h at 37°C or 41°C according to the cell line. Following this, the infection mixture (FCS-free medium with excess virus) was replaced by new FCS-free medium and the cells were maintained at 37 or 41°C. Besides, in the case of kinetic experiments, TPCK-treated trypsin (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA) was added to the new FCS-free medium (20 ng/ml and 0,25 µg/ml for the CLEC213 and BEAS-2B cell line respectively). Avian influenza A/Turkey/Italy/977/1999 [H7N1] and human influenza A/Scotland/20/1974 [H3N2] were used in this study. The H7N1 virus was obtained using the reverse genetic system as previously described [32,33]. H3N2 reverse genetic system was developed by viral genome extraction from BEAS-2B-infected cells by using the QIAamp viral RNA minikit (Qiagen, Venlo, Netherlands) according to the manufacturer's protocol. Each viral segment was cloned into vector pRF483 as described previously [34,35]. Quick-change mutagenesis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used to generate a recombinant virus containing a truncated form of Polymerase Basic protein 1-Frame 2 (PB1-F2), referred to as ΔF2. Briefly, a silent mutation in PB1 resulted in the introduction of a stop codon at the twelfth amino acid of PB1-F2 in order to abort its translation without affecting the other proteins of segment #2 [33]. Introduced mutation was confirmed by plasmid and vRNA sequencing.

IFN-β activity measurement

Twenty-four hours before transfection, 8.10⁴ BEAS-2B cells were seeded in 24-wells plates in complete DME F/12 medium. The cells were transiently transfected using FuGENE HD (Promega, Madison, WI, USA). Transfection complex was obtained by mixing 0,5 µg DNA with 2 µL FuGENE HD in 25 µL OptiMEM medium. The cells were co-transfected with 0,3 µg of a human IFN-β luciferase-reporter plasmid [36] and 0,2 µg of a pmCherry-N1 plasmid (Takara Bio, Mountain View, CA, USA) to normalize the luciferase activity. Twenty-four hours post transfection, cells were infected (MOI = 1) and lysed at 16 hours post infection with 100 µL of passive lysis buffer (30 mM Tris pH 7.9, 10 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 18,75% glycerol, and 1 mM dithiothreitol). Both fluorescent and luminescent reporter signals were measured in 25 µL cell lysates and using a Tecan infinite M200 PRO plate reader. For luminescence, 50 µL of lysis buffer supplemented with 1 mM ATP, 1 mM dithiothreitol and 1 µM D-luciferin (Synchem Inc, Aurora, OH, USA) were added. Each point was performed in quadruplicate and

results are expressed as normalized luciferase activity relative to control.

Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from cell lysates using the RNeasy Plus kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol and reverse-transcribed [25] with iScriptTM Reverse Transcription Supermix (Biorad, Hercules, CA, USA) using random hexamer primers. The expression levels of target genes and M1 were measured using the CFX Connect qPCR platform (BioRad) and iTaqTM Universal SYBR[®] Green Supermix (BioRad). The qPCR thermal cycle was as follows: initial denaturation 3 min at 95°C, followed by 40 cycles including 10 s at 95°C and 30 s at 60°C. Each point was performed in triplicate. To make sure that the primers produced a single and specific PCR amplification product, a dissociation curve was carried out at the end of the PCR cycle. Host genes were quantified using the comparative ΔΔCt method. The mean ΔCt obtained in mock-infected cells for each gene was used as calibrator, after normalization to endogenous HPRT, GAPDH and β-tubulin housekeeping genes. Details of the primers are provided in supplemental materials. Chicken RNA samples were processed as previously described for host response [32] and viral RNA quantifying [37].

Ethical statements

This study was carried out in accordance with INRAE guidelines in compliance with European animal welfare regulation. The protocols were approved by the Animal Care and Use Committee at "Centre de Recherche de Jouyen-Josas" (COMETHEA) and "Centre de Recherche de Nouzilly" (Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale, Région Val de Loire) under relevant institutional authorization ("Ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche"). Authorization number: mice experiments 2015100910396112v1 (APAFIS#1487), chickens' experiments: approval number 2010/7. All experimental procedures were performed in a biosafety level 2 (mice) or biosafety level 3 (chickens) facilities.

Animals and eggs

Female BALB/c mice were purchased from the "Centre d'Élevage R. Janvier" (Le Genest Saint-Isle, France) and were used at 8 weeks of age. NF-κB-Luciferase transgenic Balb/C mice were obtained by backcrossing NF-κB-Luciferase Transgenic B10.A (kind gift of Pr Richard Flavell, Howard Hughes Medical Institute) with Balb/c mice to ensure the production of transgenic mice with

white fur and hence avoid the light absorption due to the dark one of B10 mice. Mice were housed in negative pressure isolators in a containment level 2 facility. Food and water were available ad libitum. Mice were lightly anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine (60 mg/kg and 12 mg/kg, respectively) and inoculated intranasally with the indicated dose of virus in 50 μ L PBS. The conditions of the mice were monitored daily. Humane endpoint was used during survival study: mice were euthanized via cervical dislocation when body weights were reduced to 75% of the starting weights or when the rectal temperature was inferior to 32°C. Four-week-old specific-pathogen-free (SPF) histocompatible B13/B13 White Leghorn chickens were housed in biosafety level 3 cabinets under negative pressure with HEPA-filtered air. Briefly, three groups of 23 (WT H7N1), 26 (Δ F2 H7N1) and 10 (mock) birds were inoculated intra-tracheally with 5×10^5 EID50 (0.1 ml) of each virus, along with 10^6 EID50 (0.2 ml) in the choanal cleft, while in the mock group the virus suspension was replaced by PBS. Birds were carefully monitored daily during the course of the trial (one week). Four birds at days 1, 2, 3 and 4 post-inoculation (p.i.) and 1–3 birds at day 7 p.i. for each virus-inoculated group were euthanized and necropsied, along with two mock-inoculated birds at each of the indicated times. Swabs and tissue samples from lung, kidney, and brain were collected from each animal and frozen at -80°C until use for further downstream analyses (viral and host RNA quantification). SPF fertilized chicken eggs (PA12 White Leghorn strain) were purchased from the “Plate-forme d’Infectiologie Expérimentale – Centre INRAE Val de Loire” (Nouzilly, France). Upon arrival, the eggs were placed in an incubator and then infected at day 11 of embryonic development with 50 PFU of WT or Δ F2 H7N1 Nluc or mock-infected. Viruses were diluted in PBS containing 100 UI/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin. Inocula were injected into the allantoic cavity (0.1 ml per egg). Eggs were processed for IVIS imaging at 24 h and 48 hours pi.

IVIS monitoring

Bioluminescence quantifications of the firefly luciferase (NF- κ B-Luciferase transgenic mice) and the nanoluciferase (recombinant viruses) were achieved using the IVIS 200 imaging system (Perkin Elmer). Mice were anaesthetized and luminescence was measured 1 min after intra-nasal injection of 50 μ l of PBS containing D-luciferin (7 mg. kg^{-1} , Synchem) or 50 μ l of PBS containing furimazine (1:50 dilution of the Promega NanoGlo Luciferase Assay Substrate). For chicken embryos imaging, 300 μ l of furimazine (1:20 dilution in PBS of Promega substrate) was injected into allantoic cavity of living eggs. Five minutes post-injection, the embryos were extracted and washed

several times in PBS to remove allantoic fluid. Embryos were then imaged using the IVIS device. Living Image software (version 4.0, PerkinElmer) was used to measure the luciferase activities. A digital false-color photon emission image of the mouse was generated, and photons were counted within the whole-body area (firefly), airway area (nanoluc) or the embryo surface (eggs). Photon emission was measured as radiance in $\text{p.s}^{-1}.\text{cm}^{-2}.\text{Sr}^{-1}$.

Results

In vitro virus characterization

To facilitate the analysis of the replication of the H7N1 and H3N2 viruses under study, we inserted a nanoluciferase (Nluc) cassette into the segment 2 of these viruses. The two Nluc-tagged viruses were designed using the strategy described by Tran and collaborators [38]. Sequences of the two engineered segments are available in supplemental material. We have also produced mutant viruses unable to express PB1-F2 (Δ F2) in each strain, through introduction of a stop codon at position 12 of segment #2-frame #2. These mutations do not alter the coding sequence of PB1.

As shown in Figure 1, WT and Δ F2 viruses replicate similarly in both avian and mammal hosts. In the avian CLEC213 cells, the replication of the Δ F2 H7N1 virus perfectly mirrors that of the parental WT virus, reaching the peak of virus production in the supernatant at 24 hours (Figure 1A), while the maximum of luminescence emitted by the infected cells was observed at 16 hours (Figure 1B). In the H3N2 virus-infected human BEAS-2B cells, the virus titer in the supernatant reached a plateau at 24 hours (Figure 1C) while the luminescence emitted by the infected cells also peaked at 16 hours (Figure 1D). The decrease of the viral titer after 24 hours in the supernatant of the CLEC213 cells (Figure 1A) probably reflects a lower stability of the H7N1 viral particles in the warm cell culture medium (41°C), as compared to that of the H3N2 virus in the supernatant of the BEAS-2B cells (Figure 1C). Thus, the deletion of PB1-F2, whether in the avian H7N1 or in the human H3N2 virus, does not impair the virus growth in the cognate system of cultured cells. Interestingly, the peak of luminescence, which precedes by about eight hours the peak or the plateau of the viral titer in the supernatant, probably reflects the maximum activity of virus replication inside the infected cells. Thereby, we chose to rely on the kinetics of Nluc luminescence to monitor the viral replication in next experiments. We first compared the replication of the WT and Δ F2 H7N1 avian viruses in human BEAS-2B cells. As shown in Figure 1E, the peak of luminescence is considerably delayed as compared to that observed in avian cells with the same viruses (Figures 1B, 48 hours vs. 16 hours), probably reflecting the sub-optimality of the

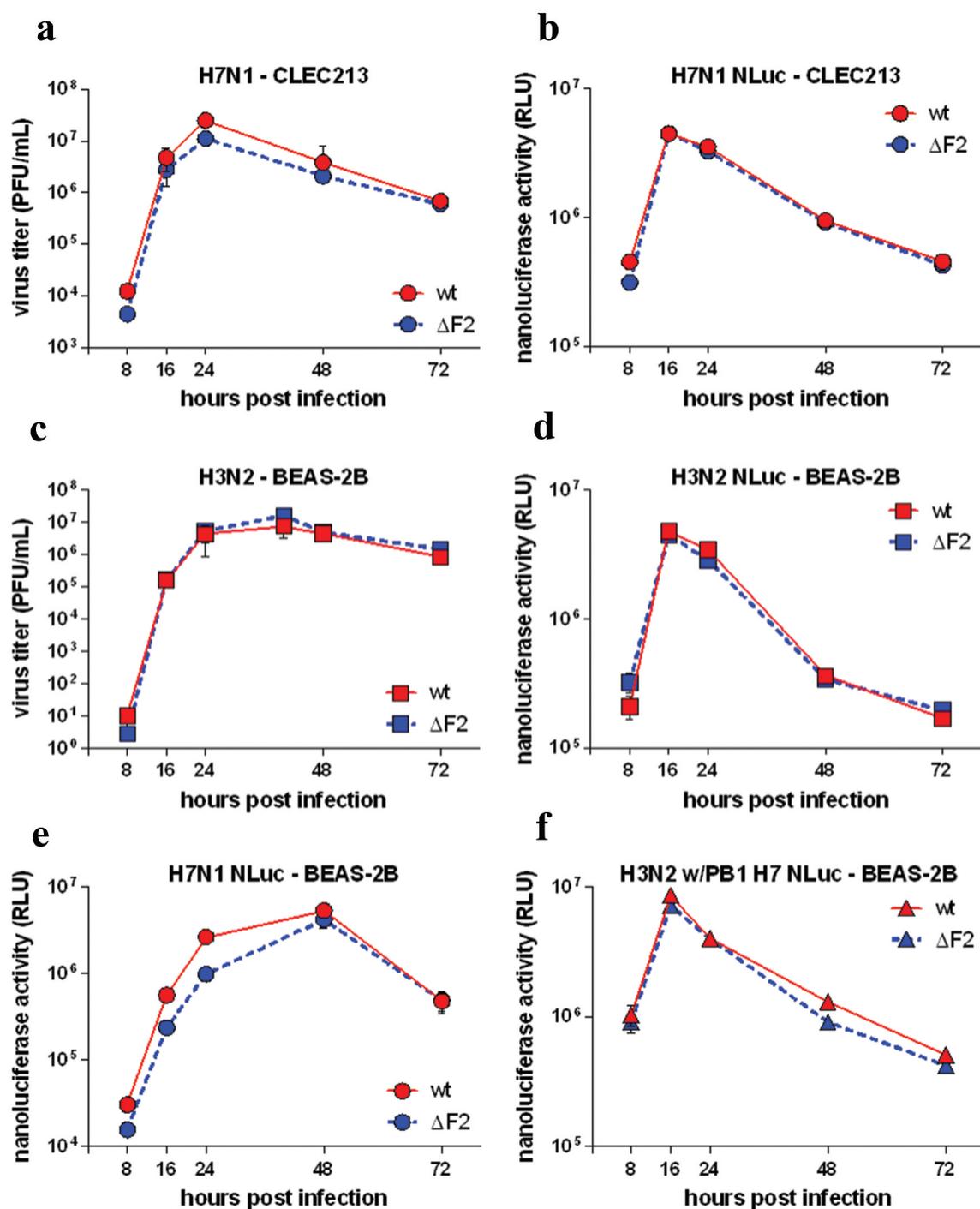


Figure 1. In vitro replication kinetics comparisons. Monolayers of CLEC213 and BEAS-2B cells were infected for 72 hours at MOI 0.01 with conventional H7N1 (A), NLuc H7N1 (B), conventional H3N2 (C), NLuc H3N2 (D). BEAS-2B cells were infected with NLuc H7N1 or the reassortant NLuc H3N2 virus expressing PB1 segment from H7N1 (E and F). PFU production (A and C) and NLuc activity in cell lysates (B, D, E and F) were quantified over time. Results represent the mean \pm SEM of triplicate wells of a representative experiment.

human cell context for the avian virus. It should be noted that in this configuration, the deletion of PB1-F2 in the avian virus causes a slight decrease, both of the luminescence signal before the peak (Figure 1E) and of the virus titer in the supernatant (not shown). Finally, in order to examine the outcome of a plausible viral reassortment, we assessed the compatibility of avian virus segment #2 in the

background of a mammalian virus by producing a pair of chimeric viruses by reverse genetics: NLuc H3N2 w/PB1 H7 and NLuc H3N2 w/PB1 Δ F2 H7. The profile of the viral growth curve, as monitored by the NLuc activity (Figure 1F), is very close to that of the H3N2 virus (Figure 1D), and here again, the deletion of PB1-F2 has no impact on viral replication. The H7N1 virus is therefore capable of

replicating abundantly within mammalian cells and its segment #2 is compatible with the backbone of a human H3N2 virus. The absence of PB1-F2 expression has little or no effect on in vitro replication.

Host response analysis in vitro

We then aimed to characterize the effects of H7N1- and H3N2-origin PB1-F2s on host response. We infected BEAS-2B cells with the three virus pairs described above. We used high MOI in this case to synchronize the infection of the cell layer. We evaluated the response of the infected cells, as assessed by the qRT-PCR-measured expression of 13 cellular genes, along with the quantification of the viral M gene. Cellular genes were selected on the basis of their antiviral (MxA, IFN- β , IFITM3), inflammatory (CCL5, IL8, IL6, IL1 β), immune (IL18) functions, or for their role in cell integrity (Cx43, ITG β 6, HIF1- α , Creb3). Mitochondrial gene ND1 was also included because of its involvement in the H7N1 infectious process [33]. Surprisingly, this expression analysis, which was carried out in parallel for all six viruses, revealed that the viruses were grouped into two distinct clusters: the H3N2 virus and the two chimeric viruses, on the one hand, and the two H7N1 viruses and the H3N2 Δ F2 virus, on the other hand (Figure 2A and B). We performed principal component analysis (PCA) in order to highlight the differences between the studied viruses according to functional gene groups (Figure 2B and C). In Figure 2B, each sample has been plotted in a two-dimensional system whose axes are defined as a linear combination of our original variables. The variable factors plot in Figure 2C show which variables contribute to define the axes. The dimensions determined by the PCA explain 73% of the intergroup variability (58% explained by the first dimension PC1 and 15% by the second one PC2). The dimension 1 is defined by both inflammatory and antiviral factors (Figure 2C). Thus, samples positioned to the right-most side of the x-axis in Figure 2B (i.e. WT H3N2 and the two chimeric viruses) indicated a strongest inflammatory and antiviral response. It can therefore be seen that the two H7N1 viruses are grouped together, indicating that their PB1-F2 is neither involved in the inflammatory nor antiviral response in BEAS-2B cells. On the contrary, the two H3N2 viruses are dissociated by the abscissa axis, the virus expressing PB1-F2 being moderately more inflammatory. Finally, for the chimeric virus, the deletion of PB1-F2 exacerbates the inflammatory response, which seems at first instance counter-intuitive given the results obtained for the other two viruses. The function of PB1-F2 is therefore highly dependent on the host/virus environment in which it is expressed.

The qRT-PCR data obtained with IFN- β gene are detailed in Figure 2D. In order to validate this gene

expression information in functional terms, we used a reporter plasmid of type 1 IFN activity transfected into BEAS-2B cells (Figure 2E). Functional IFN activity was measured after 16 h pi (instead of 8h pi for mRNAs) to allow accumulation of the reporter gene within the infected cells. We observed that the IFN activity correlated with the level of IFN- β gene expression: the activity is reduced for the Δ F2 H3N2 virus compared to the WT virus while it is increased in the case of infection by the chimeric virus lacking PB1-F2 compared to the chimeric WT virus. Of note, as replication kinetics are slightly different between H7N1 and H3N2 viruses in BEAS-2B cells, comparisons between H7N1 and H3N2 viruses can be hazardous, so only comparisons between WT and Δ F2 viruses should be considered here. In conclusion, the H7N1 virus, despite its replication ability in BEAS-2B cells, is relatively non-inflammatory and the expression of PB1-F2 does not influence the inflammatory response unlike what is observed with the H3N2 virus. In addition, and unexpectedly, when cells were infected with the H3N2 w/PB1 H7 virus, PB1-F2 expression reduced the inflammatory response.

PB1-F2 expression does not modulate H7N1 virulence during chicken infection

We next assessed the contribution of PB1-F2 to the viral pathogenicity in the more realistic situation of an experimental infection of chickens with the avian H7N1 virus. 25-day-old specific-pathogen-free (SPF) White Leghorn chickens were inoculated with 5×10^5 EID₅₀ through intra-tracheal route combined with 10^6 EID₅₀ through oral route (choanal cleft). 23 chickens were infected with the WT H7N1, 26 chickens with the Δ F2 H7N1 and 10 chickens were mock-infected. As shown in Figures 3A, 40 to 50% of the virus-infected chickens died between 24- and 72-h post-infection, with no obvious effect of PB1-F2 deletion on the survival curve when compared to the WT virus. This type of result has already been described when inoculating chickens with a low dose of low pathogenic H9N2 virus [30]. In both oropharyngeal swab (Figure 3B) and lungs (Figure 3C), the maximum viral load was observed on days 2 and 3 pi, as previously observed in the same model [32,37]. We notice that this peak of viral load coincides with the peak of disease and death in the chickens. A high viral load was observed in the kidney (Figure 3D), reflecting virus transport by the blood. Overall, we observed no noticeable difference between the two viruses as regards the viral loads (Figure 3B–D). Finally, the intensity of the host response was studied by quantifying the expression of a pro-inflammatory mediator (IL1 β), and an anti-viral mediator (IFN- α). Here again, few biologically relevant differences are noteworthy (Figure 3E and F), suggesting that the function of PB1-F2 is neither involved in viral

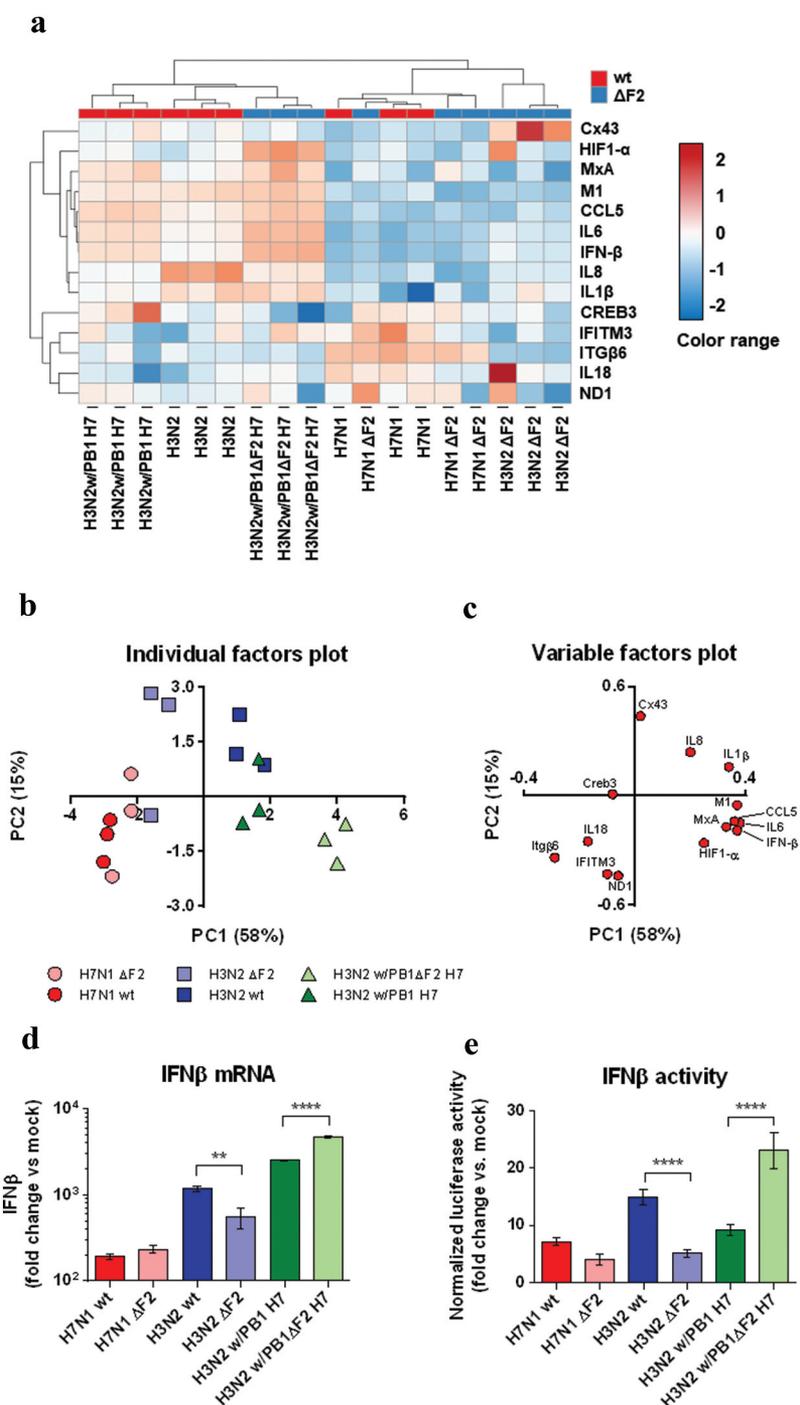


Figure 2. BEAS-2B host response characterization. BEAS-2B cells were infected with H7N1, H3N2, reassortant virus H3N2w/PB1 H7 and their respective PB1-F2 deficient mutants (Δ F2) for 8h at MOI 3. After RNA samples processing, qRT-PCR were performed to quantify expression of 14 transcript: MxA, IFN- β , IFITM3, CCL5, IL8, IL6, IL1 β , IL18, Cx43, ITG β 6, HIF1- α , Creb3, ND1 and M1. Heat map was created by using the ClustVis tool [57]. Both rows and columns are clustered using correlation distance and average linkage. We used mRNA quantifications (as fold change vs control) to plot the heat map by using ClustVis tool. Coefficients were applied to fold changes so that values are centered and range from -2 to $+2$ as extreme values. (A). Principal component analysis was performed using ClustVist, individual factors plot (B) and variable factor plot (C) are represented. IFN- β mRNA relative quantification by qRT-PCR. (D). BEAS-2B cells were transfected with IFN- β -luciferase reporter and then infected for 16 h at MOI 1 with the different viruses (E). Histograms are the means \pm SEM of 3 (qRT-PCR) or 4 independent samples (IFN- β activity). Data represented are representative of at least three independent experiments. **: p-value = 0.0055; ****: p-value < 0.0001 (ANOVA).

replication nor in modulation of the host response in chickens. Due to biosafety considerations, we were unable

to perform intravital imaging on chickens. We therefore tested the replication of WT and Δ F2 H7N1 viruses in

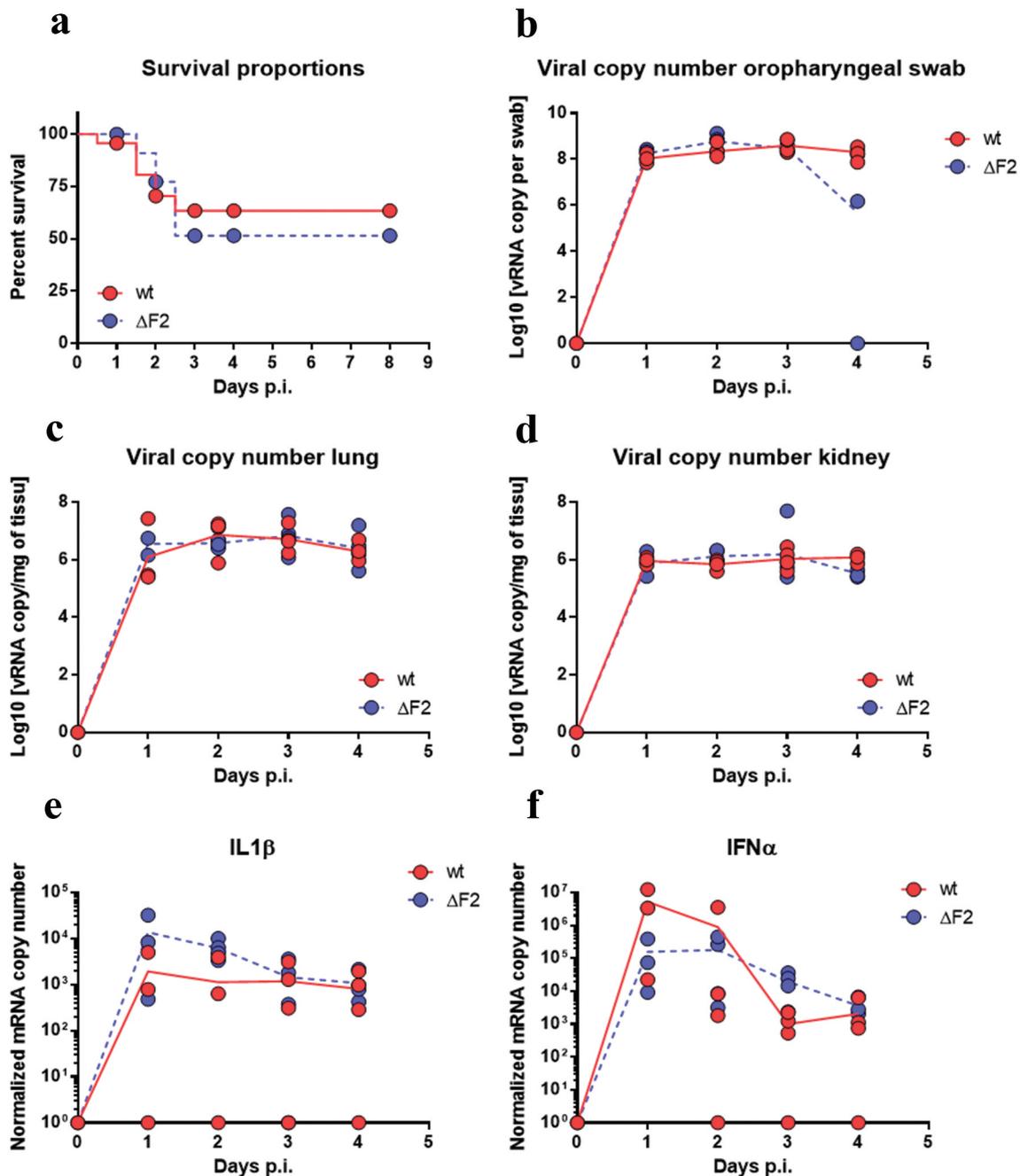


Figure 3. Time-course of dynamic parameters in chickens infected by WT- or Δ F2-H7N1. (A) Chickens survival curves (wt $n = 23$; Δ F2 $n = 26$). (B, C and D) qRT-PCR viral quantification in oropharyngeal swabs, lungs and kidneys. (E and F) qRT-PCR quantification of IL1- β and IFN- α inductions in lungs of infected chickens. Curves represented are the mean values obtained from four animals.

embryonated eggs. The different experiments conducted did not allow us to identify differential tropism between viruses expressing or not PB1-F2. As shown in Figure 4A, viral replication is observed throughout the whole embryo with particularly intense signals in the brain and gut. However, the same replication pattern is observed for both viruses. Moreover, we found no difference in the egg-based replication of the 2 viruses, whether as assessed by the luciferase activity (Figure 4B) or by the hemagglutinin activity measured in the allantoic fluids that were collected

at four days p.i. (not shown). In addition to the measurements made on embryos, analysis of luciferase signals from whole eggs as well as allantoic fluids also did not identify any differences in replication between the two viruses (data not shown).

Altogether, our avian in vivo data, both in the chicken model and in the embryonated egg, indicate that PB1-F2 from a H7N1 LPAIV has no impact on virus replication, biodispersion and shedding, and does not alter host response.

Replication of H7N1 in mice

H7N1 viruses are not widely described for their zoonotic capabilities. However, evidence of anti-H7 antibodies has been observed in serum samples collected from poultry workers. In addition human cases of infection with H7N9 viruses indicate that H7 viruses can, although rarely, infect humans [39,40]. Moreover, H7N1 subtypes isolated from ostrich and chicken were able to induce mortality and morbidity in mouse and ferret models without any prior adaptation, supporting a minimal level of zoonotic potential of H7N1 viruses [41–44]. To study further the effect of PB1-F2 in a potential species barrier crossing, we infected mice with various doses of our WT NLuc H7N1 strain. The lethal dose 50% was estimated to be 7×10^3 PFU per mouse. Then, we used transgenic NF- κ B-luciferase mice to study the host response through inflammatory induction [18]. The WT H7N1 and the Δ F2 H7N1 displayed comparable tropisms and kinetics of replication in mice airways (Figure 5A–left panels). However, it should be mentioned that the Δ F2 virus replicated to slightly lower levels than the WT virus (1.7 to 2.5 times less, although not statistically significant; Figure 5B upper panel). The inflammatory signal was also monitored during the infection with both viruses. Yet, this signal does not evolve in the same way as that of

replication since the inflammatory process is clearly more pronounced in mice infected with the WT virus than in mice infected with Δ F2 (Figure 5A–right panels). Indeed, mice infected with the PB1-F2-expressing virus show a continuous increase in inflammatory activity over time (Figure 5B–lower panel) while mice infected with Δ F2 developed only moderate inflammation. The avian PB1-F2 of the H7N1 virus therefore contributed to induce or to increase the inflammation developed during viral infection of a mammalian organism, even though it had no effect *in vivo* in chicken nor in an *in vitro* model of mammalian epithelial cells. These data highlight the host specificity of PB1-F2 as well as its need to be expressed within a complex tissue rather than in simple cell culture to reveal its virulence functions.

Pathogenesis of a chimeric H3N2 harboring an avian segment #2

To further investigate our data obtained on PB1-F2 with the H7N1 virus, we evaluated the effect of H3N2 viruses (WT vs. Δ F2) on NF- κ B Luc mice. Based on the measured NF- κ B Luc activity, the kinetics of inflammation was different from that observed in H7N1-infected mice, being apparent only from the 4th day pi and

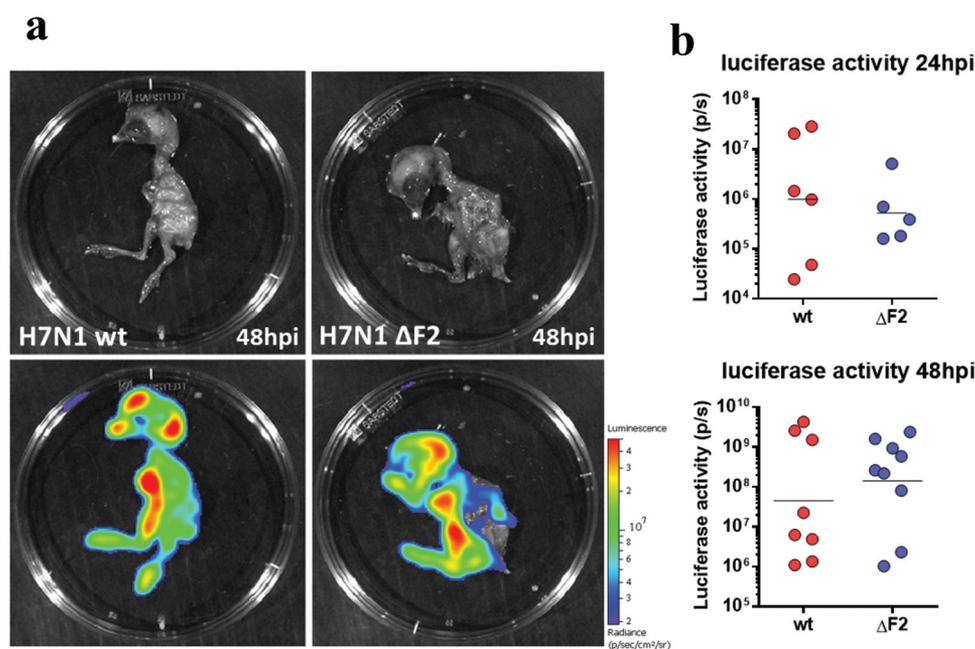


Figure 4. Infection of embryonated eggs with WT and Δ F2 NLuc H7N1 viruses. Fertilized chicken eggs were infected at day 11 of embryonic development with 50 PFU of WT or Δ F2 NLuc H7N1 viruses. Eggs were processed for IVIS imaging at 24 and 48 h pi. Bioluminescence was acquired 5 min after injection of furimazine in the allantoic cavity (A) Embryos picture (top panel) and overlay of the NLuc signal (bottom panel) at 48 h pi. The scale on the right indicates the average radiance (sum of the photons per second from each pixel inside the ROI/number of pixels) p/sec/cm²/sr, number of photons per second per square centimeter per steradian. (B) Quantification of the NLuc signals at 24 and 48 h pi. Data are represented as the total flux in each pixel (p/s) integrated over the whole surface of the embryos. Between 5 and 10 eggs were monitored for each condition. Bars represent the geometric mean of a representative experiment performed twice.

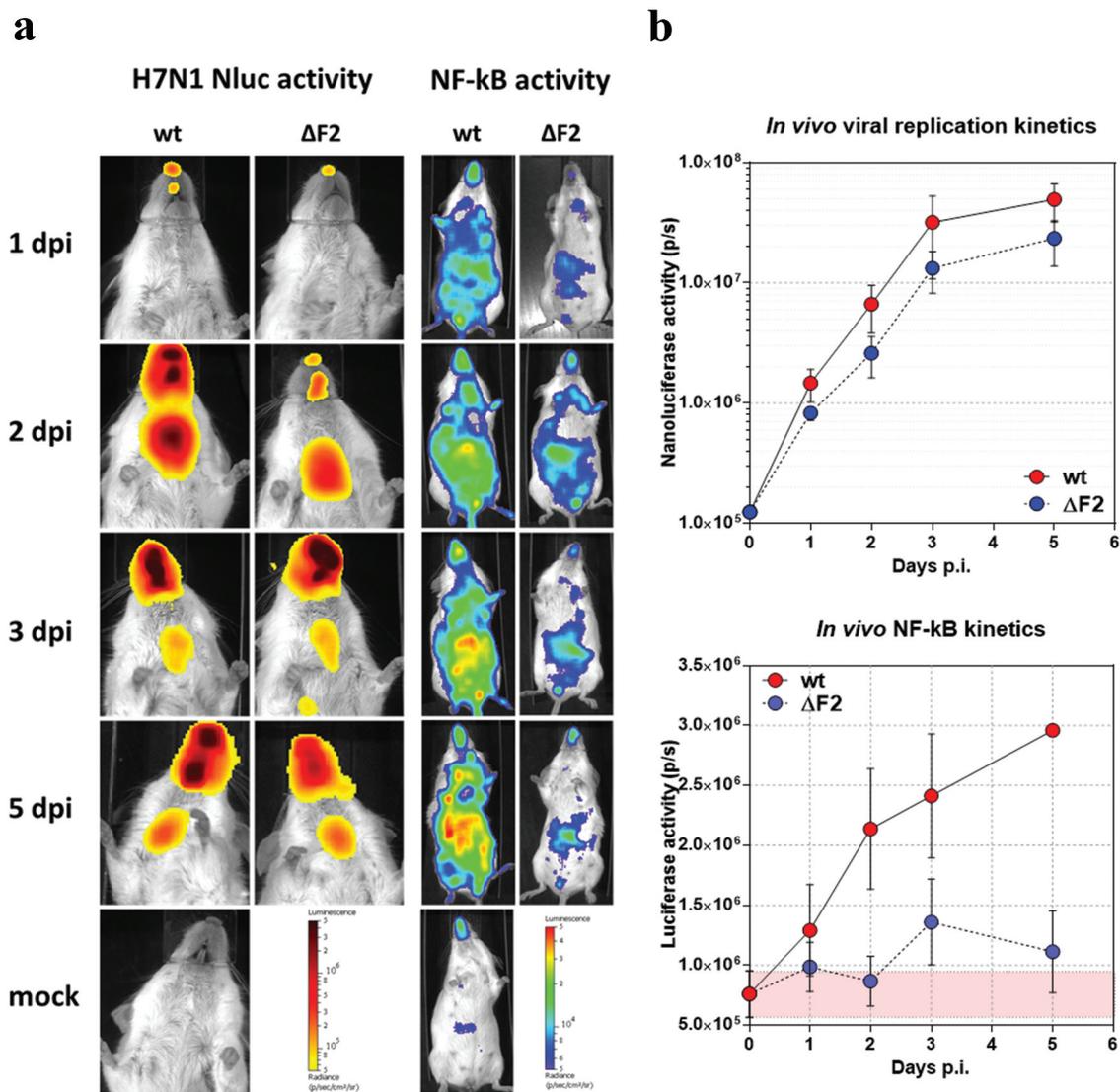


Figure 5. Kinetics of viral replication and induced inflammation in NF-κB-luciferase mice infected with WT or ΔF2 Nluc H7N1 viruses. NF-κB luciferase mice were infected with 10^5 PFU of WT or ΔF2 Nluc H7N1 intranasally. (A) Bioluminescence was measured by intranasal inoculation of furimazine or D-luciferin and using an IVIS system. Nluc signals (viral replication) were only observed in the nose and chest (left panels). Firefly luciferase (NF-κB activity) was monitored in the whole body (right panels). The color scales indicate the average radiance (sum of the photons per second from each pixel inside the ROI/number of pixels) p/sec/cm²/sr, number of photons per second per square centimeter per steradian. (B) Time course of Nluc activity is represented in the upper panel, time course of firefly activity is shown in the lower panel. Bioluminescence activities were quantified using Living Image software. Data are represented as the total flux in each pixel (p/s) integrated over the whole surface of the respiratory tract (Nluc) or the mouse (firefly). Curves are the mean \pm SEM values obtained from five animals and are representative of at least three independent experiments.

rapidly becoming very intense (Figure 6A). At day 6 pi, the inflammatory levels reach those observed for the H7N1 virus. Contrary to what we observed with the H7N1 virus, the inflammation kinetics of the two viruses were very similar, except for a slight augmentation observed at day 4 pi with the WT virus (Figure 6A and B). This type of effect associated with PB1-F2 has already been observed for other viral strains, such as H1N1 [20]. We then chose to focus on this time point to compare the effects of PB1-F2 in H3N2 viruses and

H3N2 w/PB1 H7 chimeric virus. We confirmed the marked differences between the WT and ΔF2 H3N2 viruses (Figure 6C) since the level of inflammation was two times more pronounced in WT-infected mice (Figure 6D). Surprisingly, while it allows the expression of the avian PB1-F2 with a strong pro-inflammatory capacity, the chimeric virus expressing the H7N1 segment #2 was less inflammatory than the WT H3N2 virus. Importantly, there is no bias related to viral replication since all viruses used in this experiment

replicated to equivalent levels (sup Figure 1). Finally, the chimeric virus devoid of PB1-F2 induced a higher inflammatory response than the non-mutated chimeric virus. Though unexpected and counter-intuitive given our previous results, this increased inflammatory response corroborates the data obtained *in vitro*, especially with regard to the IFN activity (Figure 2D and E).

These results suggest that the pro-inflammatory responses induced by PB1-F2 are governed by complex mechanisms in which other viral proteins or strain-specific mechanisms are clearly involved. Thus, and contrary to our initial hypothesis, the transmission of the

inflammatory and host deleterious character of PB1-F2 proves to be much more complex than a mere segment exchange.

Discussion

In this work, we used a low pathogenicity avian influenza virus of H7N1 subtype. This virus is considered as one of the precursors to the HPAI strains that caused a major epizootic in Italy in the 2000s [32,45]. It appears that this virus is naturally well adapted to replication in mice and ferrets, since without prior adaptation, it can kill animals at

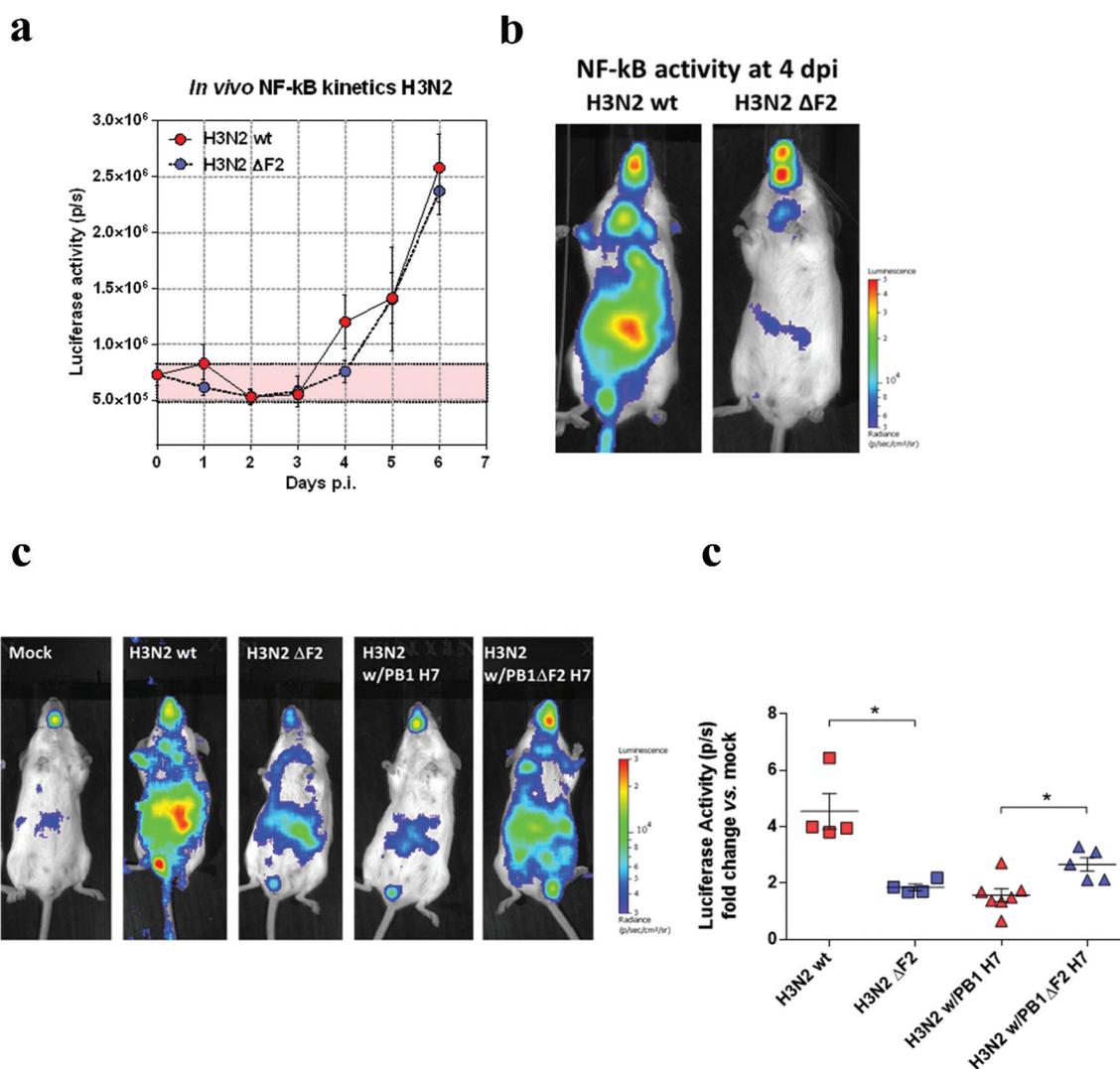


Figure 6. NF- κ B activity of mice infected with H3N2-NLuc or reassortant. Bioluminescence was measured by intranasal inoculation of D-luciferin and using an IVIS system. Scales on representative pictures indicate the average radiance (the sum of the photons per second from each pixel inside the ROI/number of pixels) p/sec/cm²/sr, number of photons per second per square centimeter per steradian. Bioluminescence activities were quantified using Living Image software. Data are represented as the total flux in each pixel (p/s) integrated over the whole surface of the mouse. (A) Time course of the inflammation induced after infection of NF- κ B-luciferase mice with 30 PFU of H3N2 WT or Δ F2 (n = 6). (B) Representative pictures of H3N2 WT or Δ F2-infected NF- κ B-luciferase mice at day 4 pi. (C) Representative pictures of the inflammation induced after infection of NF- κ B-luciferase mice with 30 PFU of H3N2 or H3N2 w/PB1 H7 and their Δ F2 counterparts (n = 5). (D) NF- κ B-luciferase activity quantification of infected NF- κ B-luciferase mice. *: p-value < 5% (Mann-Whitney test).

relatively low doses. Indeed, mice are not naturally infected with influenza viruses and most strains require prior experimental adaptation to mice through successive passages from lung to lung [46]. However, several viruses of the H7 subtype have been shown to replicate efficiently in the mouse model without any prior adaptation [42–44,47]. Such a strain able to infect both birds and mammals is therefore ideal to study and better understand the host specificities related to PB1-F2.

The primary objective of our study was to investigate the virulence of PB1-F2 in relation to strain and host specificities. Our data confirm that the functions of PB1-F2 are different between avian and mammalian hosts. It had already been shown that PB1-F2 expression in chickens tends to reduce the virulence of strains [29,30]. In our work, we observed no difference between WT and Δ F2 H7N1 infected chickens in terms of mortality, viral loads, host response, and tissue tropism. While no effect could be seen in the avian host, infection of mice revealed a clear implication of PB1-F2 from the H7N1 virus in the host inflammatory response as previously published with H1N1 and H5N1 strains [18–20,48,49]. These differences were not observed *in vitro* since infection of human cells with either WT or Δ F2 H7N1 viruses induced responses of comparable magnitudes. The virulence property of the H7N1 PB1-F2 therefore seems to be effective only within a complex tissue such as the lungs.

It is interesting to note that a viral protein that does not develop any apparent signs of pathology in its original host can behave as a virulence factor after crossing the species barrier. It can be assumed that its functionality could not be exercised in its new host due to the absence of an essential element, such as host interactors. PB1-F2 has been described for its ability to polymerize into fibrillar structures in the vicinity of membranes [50,51], thereby acquiring membrane-lytic activities [52]. As a result, the absence of natural interactors could promote the accumulation of these fibrillar structures in infected cells, inducing membrane disruptions that in turn promote inflammation. However, the situation in the H3N2 context is obviously more complex since the expression of avian PB1-F2 (infection with the chimeric H3N2w/PB1 H7 virus) does not confer the virulence function carried by the avian PB1-F2. These results may appear contradictory at first sight, but could actually reflect a functional dependence of PB1-F2 on a viral component that is present only in its original virus. Alternatively, PB1-F2 could also exert an effect dependent upon a host factor specifically triggered by a virus. A consequence of these findings is that the virulence determinants of PB1-F2 are probably not only carried by its protein sequence but seem to rely on other factors depending on the viral strain and the nature of the host. As a result, reassortment leading to the integration of an avian segment

#2 into an H3N2 background may not be sufficient to confer the whole virulence potential associated with PB1-F2 and the #2 segment.

Recently, HAX-1 was described by two different groups to interact with PB1-F2 [53,54]. HAX-1 is an enigmatic protein which has been described to bind to the nuclear localization signal domain of PA, thereby preventing its nuclear localization and reducing the replication of the virus [55]. While some PA of mammal-adapted viruses are resistant to the restriction effect of HAX-1, zoonotic viruses of avian origin remain sensitive to it [54]. However, through competitive interaction with HAX-1, PB1-F2 of zoonotic viruses can counteract HAX-1's restriction effect exerted on PA [54]. This specificity therefore contributes to the species barrier and it would be interesting to verify whether the PB1-F2s of the H7N1 and H3N2 viruses studied in our work are capable of binding to HAX-1. Such a mechanism is unlikely to explain our results, given the similar replication abilities of the two viruses. However, it cannot be completely excluded, as an interaction of PB1-F2 with HAX-1 could mobilize other mechanisms associated with HAX-1 such as its recently described links with the NF- κ B transduction pathway [56]. We are currently characterizing the interactomes of these two PB1-F2 in order to better understand their respective mechanisms of action. We believe that the key to the puzzles associated with PB1-F2 lies in its own interactome within the infected cell. Its ability to self-assemble in a hydrophobic environment and to destabilize membrane structures also seems to us an essential element in the biology of PB1-F2, since this event could potentially be favored by the lack of its adequate interactors.

Acknowledgments

Parts of this work were supported by grants from “Institut Carnot Santé Animale” (Influenza-2011 and FlumLi, to D. M.), “Fond de Recherche Influenza Aviaire” (FRIA2019, PREDYT, to R.L.G.) and “Agence Nationale de la Recherche” (grant ANR-17-CE35-0007, REACTIV, to C.C.). JM was supported by a FCPR grant (“formation complémentaire par la recherche”) awarded by the French ministry of agriculture. We thank Marlène Hery, Kathleen Auger, Roxane Trepier, Mathilde Bauducel, André Tiffoche and Jérôme Pottier (IERP-UE907, Jouy-en-Josas Research Center, France DOI: 10.15454/1.5572427140471238E12) for technical assistance in animal experiments. IERP Facility belongs to the National Distributed Research Infrastructure for the Control of Animal and Zoonotic Emerging Infectious Diseases through *In Vivo* Investigation (EMERG'IN DOI: 10.15454/1.5572352821559333E12). We thank the Emerg'in platform for access to IVIS200 that was financed by the Region Ile De France (SESAME and DIM-OneHealth).

Funding

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche [ANR-17-CE35-0007, REACTIV]; Institut Carnot Santé Animale [FlumLi]; Institut Carnot Santé Animale [Influenza-2011]; Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation [formation complémentaire par la recherche]; Délégation Générale de l'Alimentation [FRIA2019, PREDYT].

Data availability statement

The data that support the findings of this study are openly available in figshare at <http://doi.org/10.6084/m9.figshare.13857047>.

Disclosure

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

ORCID

Daniel Marc  <http://orcid.org/0000-0003-3604-1958>
 Christophe Chevalier  <http://orcid.org/0000-0003-3231-9027>
 Ronan Le Goffic  <http://orcid.org/0000-0002-2012-0064>

References

- [1] Sandbulte MR, Westgeest KB, Gao J, et al. Discordant antigenic drift of neuraminidase and hemagglutinin in H1N1 and H3N2 influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:20748–20753.
- [2] Lycett SJ, Duchatel F, Digard P. A brief history of bird flu. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2019;374:20180257.
- [3] Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, et al. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet*. 2004;363:587–593.
- [4] Gao R, Cao B, Hu Y, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *N Engl J Med*. 2013;368:1888–1897.
- [5] Lam TT, Wang J, Shen Y, et al. The genesis and source of the H7N9 influenza viruses causing human infections in China. *Nature*. 2013;502:241–244.
- [6] Steel J, Lowen AC, Wang TT, et al. Influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain. *MBio*. 2010;1. DOI:10.1128/mBio.00018-10
- [7] Lindstrom SE, Cox NJ, Klimov A. Genetic analysis of human H2N2 and early H3N2 influenza viruses, 1957-1972: evidence for genetic divergence and multiple reassortment events. *Virology*. 2004;328:101–119.
- [8] Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*. 2009;459:1122–1125.
- [9] Essere B, Yver M, Gavazzi C, et al. Critical role of segment-specific packaging signals in genetic reassortment of influenza A viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:E3840–8.
- [10] Steel J, Lowen AC. Influenza A virus reassortment. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2014;385:377–401.
- [11] Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol*. 1989;63:4603–4608.
- [12] Wendel I, Rubbenstroth D, Doedt J, et al. The avian-origin PB1 gene segment facilitated replication and transmissibility of the H3N2/1968 pandemic influenza virus. *J Virol*. 2015;89:4170–4179.
- [13] Pappas C, Aguilar PV, Basler CF, et al. Single gene reassortants identify a critical role for PB1, HA, and NA in the high virulence of the 1918 pandemic influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:3064–3069.
- [14] Garten RJ, Davis CT, Russell CA, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 2009;325:197–201.
- [15] Long JS, Mistry B, Haslam SM, et al. Host and viral determinants of influenza A virus species specificity. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17:67–81.
- [16] Yang D, Liu J, Ju H, et al. Genetic analysis of H3N2 avian influenza viruses isolated from live poultry markets and poultry slaughterhouses in Shanghai, China in 2013. *Virus Genes*. 2015;51:25–32.
- [17] Chen W, Calvo PA, Malide D, et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med*. 2001;7:1306–1312.
- [18] Vidy A, Maisonnasse P, Da Costa B, et al. The influenza virus protein PB1-F2 increases viral pathogenesis through neutrophil recruitment and NK cells inhibition. *PLoS One*. 2016;11:e0165361.
- [19] Leymarie O, Jouvion G, Hervé P, et al. Kinetic characterization of PB1-F2-mediated immunopathology during highly pathogenic avian H5N1 influenza virus infection. *PLoS One*. 2013;8:e57894.
- [20] Le Goffic R, Leymarie O, Chevalier C, et al. Transcriptomic analysis of host immune and cell death responses associated with the influenza A virus PB1-F2 protein. *PLoS Pathog*. 2011;7:e1002202.
- [21] Pinar A, Dowling JK, Bitto NJ, et al. PB1-F2 peptide derived from avian influenza A virus H7N9 induces inflammation via activation of the NLRP3 inflammasome. *J Biol Chem*. 2017;292:826–836.
- [22] McAuley JL, Tate MD, MacKenzie-Kludas CJ, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by IAV virulence protein PB1-F2 contributes to severe pathophysiology and disease. *PLoS Pathog*. 2013;9:e1003392.
- [23] Le Goffic R, Bouguyon E, Chevalier C, et al. Influenza A virus protein PB1-F2 exacerbates IFN- β expression of human respiratory epithelial cells. *J Immunol*. 2010;185:4812–4823.
- [24] Kamal RP, Alymova IV, York IA. Evolution and virulence of influenza A virus protein PB1-F2. *Int J Mol Sci*. 2017;19:96.
- [25] Chen CJ, Chen GW, Wang CH, et al. Differential localization and function of PB1-F2 derived from different strains of influenza A virus. *J Virol*. 2010;84:10051–10062.
- [26] Boal-Carvalho I, Mazel-Sanchez B, Silva F, et al. Influenza A viruses limit NLRP3-NEK7-complex formation and pyroptosis in human macrophages. *EMBO Rep*. 2020;e50421.

- [27] Varga ZT, Ramos I, Hai R, et al. The influenza virus protein PB1-F2 inhibits the induction of type I interferon at the level of the MAVS adaptor protein. *PLoS Pathog.* **2011**;7:e1002067.
- [28] Varga ZT, Grant A, Manicassamy B, et al. Influenza virus protein PB1-F2 inhibits the induction of type I interferon by binding to MAVS and decreasing mitochondrial membrane potential. *J Virol.* **2012**;86:8359–8366.
- [29] Leymarie O, Embury-Hyatt C, Chevalier C, et al. PB1-F2 attenuates virulence of highly pathogenic avian H5N1 influenza virus in chickens. *PLoS One.* **2014**;9:e100679.
- [30] James J, Howard W, Iqbal M, et al. Influenza A virus PB1-F2 protein prolongs viral shedding in chickens lengthening the transmission window. *J Gen Virol.* **2016**;97:2516–2527.
- [31] Esnault E, Bonsergent C, Larcher T, et al. A novel chicken lung epithelial cell line: characterization and response to low pathogenicity avian influenza virus. *Virus Res.* **2011**;159:32–42.
- [32] Soubies SM, Hoffmann TW, Croville G, et al. Deletion of the C-terminal ESEV domain of NS1 does not affect the replication of a low-pathogenic avian influenza virus H7N1 in ducks and chickens. *J Gen Virol.* **2013**;94:50–58.
- [33] Meyer L, Leymarie O, Chevalier C, et al. Transcriptomic profiling of a chicken lung epithelial cell line (CLEC213) reveals a mitochondrial respiratory chain activity boost during influenza virus infection. *PLoS One.* **2017**;12:e0176355.
- [34] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol.* **2001**;146:2275–2289.
- [35] Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, et al. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2000**;97:6108–6113.
- [36] Le Goffic R, Pothlichet J, Vitour D, et al. Cutting Edge: influenza A virus activates TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial cells. *J Immunol.* **2007**;178:3368–3372.
- [37] Trapp S, Soubieux D, Lidove A, et al. Major contribution of the RNA-binding domain of NS1 in the pathogenicity and replication potential of an avian H7N1 influenza virus in chickens. *Virol J.* **2018**;15:55.
- [38] Tran V, Moser LA, Poole DS, et al. Highly sensitive real-time in vivo imaging of an influenza reporter virus reveals dynamics of replication and spread. *J Virol.* **2013**;87:13321–13329.
- [39] Puzelli S, Di Trani L, Fabiani C, et al. Serological analysis of serum samples from humans exposed to avian H7 influenza viruses in Italy between 1999 and 2003. *J Infect Dis.* **2005**;192:1318–1322.
- [40] Venter M, Treurnicht FK, Buys A, et al. Risk of human infections with highly pathogenic H5N2 and low pathogenic H7N1 avian influenza strains during outbreaks in ostriches in South Africa. *J Infect Dis.* **2017**;216:S512–S519.
- [41] Rigoni M, Shinya K, Toffan A, et al. Pneumo- and neurotropism of avian origin Italian highly pathogenic avian influenza H7N1 isolates in experimentally infected mice. *Virology.* **2007**;364:28–35.
- [42] Zanin M, Kocer ZA, Poulson RL, et al. Potential for low-pathogenic avian H7 influenza A viruses to replicate and cause disease in a mammalian model. *J Virol.* **2017**;91. DOI:10.1128/JVI.01934-16
- [43] Jin H, Wang D, Sun J, et al. Pathogenesis and phylogenetic analyses of two avian influenza H7N1 viruses isolated from wild birds. *Front Microbiol.* **2016**;7:1066.
- [44] Belser JA, Sun X, Brock N, et al. Mammalian pathogenicity and transmissibility of low pathogenic avian influenza H7N1 and H7N3 viruses isolated from North America in 2018. *Emerg Microbes Infect.* **2020**;9:1037–1045.
- [45] Dundon WG, Milani A, Cattoli G, et al. Progressive truncation of the Non-Structural 1 gene of H7N1 avian influenza viruses following extensive circulation in poultry. *Virus Res.* **2006**;119:171–176.
- [46] Bouvier NM, Lowen AC. Animal models for influenza virus pathogenesis and transmission. *Viruses.* **2010**;2:1530–1563.
- [47] Joseph T, McAuliffe J, Lu B, et al. Evaluation of replication and pathogenicity of avian influenza a H7 subtype viruses in a mouse model. *J Virol.* **2007**;81:10558–10566.
- [48] Zamarin D, Ortigoza MB, Palese P. Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. *J Virol.* **2006**;80:7976–7983.
- [49] Schmolke M, Manicassamy B, Pena L, et al. Differential contribution of PB1-F2 to the virulence of highly pathogenic H5N1 influenza A virus in mammalian and avian species. *PLoS Pathog.* **2011**;7:e1002186.
- [50] Chevalier C, Le Goffic R, Jammé F, et al. Synchrotron infrared and deep UV fluorescent microspectroscopy study of PB1-F2 beta-aggregated structures in influenza A virus-infected cells. *J Biol Chem.* **2016**;291:9060–9072.
- [51] Chevalier C, Al Bazzal A, Vidic J, et al. PB1-F2 influenza A virus protein adopts a beta-sheet conformation and forms amyloid fibers in membrane environments. *J Biol Chem.* **2010**;285:13233–13243.
- [52] Vidic J, Richard CA, Pechoux C, et al. Amyloid assemblies of influenza A virus PB1-F2 protein damage membrane and induce cytotoxicity. *J Biol Chem.* **2016**;291:739–751.
- [53] Li X, Qu B, He G, et al. Critical role of HAX-1 in promoting avian influenza virus replication in lung epithelial cells. *Mediators Inflamm.* **2018**;2018:3586132.
- [54] Mazel-Sanchez B, Boal-Carvalho I, Silva F, et al. H5N1 influenza A virus PB1-F2 relieves HAX-1-mediated restriction of avian virus polymerase PA in human lung cells. *J Virol.* **2018**;92:e00425–18.
- [55] Hsu WB, Shih JL, Shih JR, et al. Cellular protein HAX1 interacts with the influenza A virus PA polymerase subunit and impedes its nuclear translocation. *J Virol.* **2013**;87:110–123.
- [56] Hu YL, Feng Y, Ma P, et al. HAX-1 promotes the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells through the induction of epithelial-mesenchymal transition via the NF-kappaB pathway. *Exp Cell Res.* **2019**;381:66–76.
- [57] Metsalu T, Vilo J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using principal component analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res.* **2015**;43:W566–70.

Titre : Contribution de la protéine PB1-F2 des virus influenza A dans l'adaptation d'une souche virale à son hôte

Mots clés : virus influenza A, PB1-F2, barrière d'espèces, pathogénicité, interactome, réassortiment

Résumé : Les virus influenza A (IAV) sont les agents étiologiques de la peste aviaire et de la grippe chez certains mammifères, dont l'Homme. Ils constituent une importante problématique de santé vétérinaire et humaine. La protéine PB1-F2 est un facteur de virulence des IAV dont les fonctions varient selon l'hôte ainsi que la souche virale considérés. La compréhension des mécanismes d'action de cette protéine est incomplète mais son aptitude à moduler la réponse immunitaire de l'hôte suggère une contribution de PB1-F2 dans l'adaptation d'une souche virale à son hôte. L'objectif de ce travail de thèse a été de caractériser les propriétés de PB1-F2 chez l'hôte aviaire et mammifère. En modèles cellulaires, nous n'avons pas observé de modulation de la réponse de l'hôte par la protéine PB1-F2 d'un virus aviaire H7N1 tandis que la protéine PB1-F2 d'un virus H3N2 humain présente une action pro-inflammatoire. A l'inverse, en modèle murin, la PB1-F2 du virus H7N1 contribue de façon majeure à la pathogénicité en exacerbant la réponse inflammatoire. De façon surprenante, un virus chimérique de fond génétique H3N2 exprimant la protéine PB1-F2 aviaire H7N1 induit une inflammation réduite chez la souris par rapport au virus H3N2 sauvage. Ainsi, les fonctions de PB1-F2 ne sont pas strictement transposables et dépendent fortement du contexte viral dans lequel elle est exprimée. Enfin, les interactomes différentiels des protéines PB1-F2 ont été définis en cellules aviaires et humaines par biotinylation de proximité (BioID2). Nous avons identifié des voies biologiques régulées par les protéines PB1-F2 étudiées et différencié les voies spécifiques des voies communes. Nos travaux apportent des éléments de caractérisation des fonctions de PB1-F2 chez l'hôte aviaire et mammifère mais également dans un contexte de franchissement de la barrière d'espèce ou de virus réassortant exprimant une PB1-F2 d'origine aviaire.

Title: Contribution of viral protein PB1-F2 in the adaptation of influenza A viruses to their hosts

Key words: influenza virus A, PB1-F2, species barrier, pathogenicity, interactome, reassortment

Abstract: Influenza A viruses (IAV) cause flu in birds and some mammals, including humans. They are an important issue for both veterinary and human health. The PB1-F2 protein is an IAV virulence factor whose functions depend on the host as well as the viral strain. The molecular mechanisms associated with PB1-F2 are still enigmatic, but its ability to modulate the host immune response suggests that PB1-F2 contributes to viral fitness. Our work aimed to compare the properties of PB1-F2 in avian and mammalian hosts. In cellular models, an avian H7N1 PB1-F2 had no effect on the host response whereas a human H3N2 PB1-F2 was pro-inflammatory. Conversely, PB1-F2 H7N1 exacerbated the virulence in mice and promoted a strong inflammatory response. Surprisingly, a chimeric H3N2 virus expressing the avian PB1-F2 induced a reduced inflammation in mice compared to H3N2 wild type virus. Thus, the functions of PB1-F2 are not strictly transposable and strongly depend on the viral context in which it is expressed. Finally, we have mapped the interactions between PB1-F2 and host proteins in avian and human cells using the biotin ligase BioID2. We have identified both specific and common PB1-F2 regulated biological pathways. Our work provides elements characterizing the functions of PB1-F2 in avian and mammalian hosts but also in crossing host species barrier or with a reassortant virus expressing an avian PB1-F2.