

CÉLINE DEFFRASNES

**NOUVELLES APPROCHES THÉRAPEUTIQUES
POUR CONTRER LES INFECTIONS CAUSÉES PAR
LE METAPNEUMOVIRUS HUMAIN**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en microbiologie-immunologie
pour l'obtention du grade de *Philosophiæ Doctor* (Ph.D.)

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE MÉDICALE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2009

Résumé

Les infections respiratoires sont une cause importante de morbidité et de mortalité à travers le monde. D'ailleurs, de nouveaux virus respiratoires sont continuellement identifiés, dont le metapneumovirus humain (hMPV) en 2001. Ce virus est maintenant reconnu comme une cause fréquente d'infections respiratoires sévères chez les jeunes enfants, telles que des pneumonies et des bronchiolites. Il se classe d'ailleurs en 2^e ou 3^e position après le virus respiratoire syncytial, en alternance avec les virus influenza. La majorité des infections sévères causées par le hMPV touche les individus dont le système immunitaire est plus faible c'est-à-dire les jeunes enfants, les personnes âgées et les sujets immunosupprimés. Diverses études démontrent qu'une infection respiratoire virale sévère en bas âge peut prédisposer un enfant à développer de l'asthme durant sa vie. Malgré cela, les médecins n'ont toujours aucun vaccin ni traitement à leur disposition. L'analyse du génome et de la fonction des protéines du hMPV nous offre maintenant des pistes prometteuses pour le développement d'antiviraux. De plus, un modèle murin bien établi permet désormais l'étude *in vivo* de ces antiviraux.

Ce projet de doctorat avait donc comme objectif de développer des approches thérapeutiques pour contrer les infections causées par le hMPV. Pour ce faire, deux étapes de l'infection ont été ciblées : l'entrée du virus dans la cellule hôte par fusion, et la réplication du génome viral à l'intérieur de la cellule infectée. La première molécule identifiée avec succès est un inhibiteur de fusion, le peptide HRA2, qui s'est révélé hautement efficace *in vitro* et *in vivo* contre le hMPV. Le deuxième groupe de molécules est formé de petits ARN interférants (siRNAs) dirigés contre des gènes essentiels à la réplication du hMPV. L'interférence à l'ARN est d'ailleurs une discipline en plein essor depuis sa récente identification. Deux siRNAs ciblant la nucléoprotéine et la phosphoprotéine du hMPV se sont avérés extrêmement actifs contre ce virus *in vitro* et des résultats très encourageants ont été obtenus chez la souris.

Abstract

Respiratory infections are a leading cause of morbidity and mortality worldwide. New viruses are constantly discovered and one of them, the human Metapneumovirus (hMPV), was identified in 2001. hMPV causes upper and lower respiratory infections ranging from cold- or flu-like illnesses to more severe and life-threatening infections such as pneumonia and bronchiolitis. hMPV is only second or third to human respiratory syncytial virus in frequency and sometimes as frequent as human influenza viruses in causing respiratory infections. The majority of severe infections caused by hMPV are seen in individuals having the weakest immune system such as young children, elderly and immunocompromised subjects. Many studies tend to demonstrate that severe viral respiratory infection during childhood can lead to asthma development later in life. Unfortunately, physicians have no vaccine or treatment to fight against severe hMPV infections. Genome and protein function analyses are offering promising avenues for the development of effective antivirals. Moreover, hMPV pathogenesis has been described in a murine model which now offers a convenient way to evaluate candidate molecules.

This PhD project main goal was therefore to design new molecules against hMPV infections. For that matter, two steps of hMPV replication cycle were targeted, i.e., virus entry into the host cell which happens by a fusion mechanism, and viral genome replication inside the infected cell. The first molecule successfully identified is a fusion inhibitor, the HRA2 peptide that showed highly potent activity against hMPV *in vitro* but also *in vivo*. The second group of molecules corresponds to small interfering RNAs (siRNAs) targeting genes essential for hMPV replication. RNA interference has been a rapidly growing field since its first description in the 1990's. Here, we identified two highly effective siRNAs against hMPV *in vitro* which target the nucleoprotein and phosphoprotein. Evaluation of these siRNAs in a murine model of hMPV infection also showed great possibilities.

Avant-Propos

Cette thèse de doctorat est le fruit de nombreuses années d'efforts, de réussites parsemées d'embûches mais aussi de nombreux sacrifices. Mes études de doctorat furent une expérience extrêmement enrichissante au niveau académique mais également du point de vue personnel. Je m'apprête à clore une partie importante de ma vie qui me servira maintenant de base pour le reste de ma carrière.

Plusieurs personnes ont joué un rôle marquant dans ma passion pour la science et plus spécialement pour la virologie. C'est mon professeur de biologie à l'école secondaire De Rochebelle, monsieur Roc Châteauvert qui m'a fait découvrir la biologie et je lui en serai toujours très reconnaissante. De même, je tiens à remercier le docteur Denis Leclerc qui m'a offert ma première chance en m'accueillant dans son laboratoire de recherche et qui m'a donné le goût de poursuivre des études supérieures en virologie. Bien sûr, je n'aurais jamais pu me rendre jusqu'ici sans mon directeur de recherche, le Dr. Guy Boivin pour qui j'ai énormément de respect. C'est un chercheur décidé, persévérant, exigeant et passionné. Je le remercie du fond de mon coeur de m'avoir permis de poursuivre des études de doctorat sous sa supervision et de m'avoir transmis sa grande passion et détermination.

Je veux également remercier toute mon équipe de recherche : Yacine Abed, Mariana Baz, Nicolas Boivin, Julie Carbonneau, Stéphanie Côté, Marie-Hélène Cavanagh, Sarah Dambrosi, Constance Gagnon, Christian Gilbert, Nathalie Goyette, Marie-Ève Hamelin, Mélanie Martin, Benjamin Néhmé, Yan Sergerie, Philippe Simon, Véronique St-Onge et Mireille Tremblay puisque sans eux rien n'aurait été pareil. Et je remercie mille fois mes amis, dont Maya Chehaitly, Céline Choueri et Geneviève Pépin, qui ont immensément contribué à faire de moi celle que je suis aujourd'hui et la chercheuse que je veux être.

Finalement, ma famille est la principale raison pour laquelle je suis rendue ici aujourd'hui. Leurs encouragements, leur présence et leur affection me poussent à vouloir aller toujours plus loin. Je veux sincèrement remercier ma mère d'avoir toujours été là pour moi et d'avoir toujours cru en moi. Et mon beau Martin, qui est présent pour moi et qui me supporte et avec qui je veux vivre encore plein d'aventures fabuleuses, merci d'être là, merci d'être toi.

À ma mère qui est ma plus grande source d'inspiration.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Avant-Propos.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xi
Chapitre I. Introduction générale.....	13
1. Découverte du hMPV.....	13
2. Caractéristiques virologiques du hMPV.....	13
2.1 Microscopie électronique.....	13
2.2 Postulats de Koch.....	14
3. Manifestations cliniques.....	15
3.1 Chez l'enfant.....	15
3.2 Chez l'adulte immunocompétent.....	16
3.3 Chez les patients immunosupprimés.....	17
3.4 Chez les personnes âgées.....	17
3.5 Co-infections.....	17
3.6 Exacerbation d'asthme et de maladies obstructives chroniques.....	18
4. Épidémiologie.....	18
4.1 Répartition géographique.....	18
4.2 Pic d'activité.....	18
4.3 Séroprévalence.....	19
4.4 Transmission.....	20
5. Réponse immunitaire induite par le hMPV.....	20
5.1 Cellules cibles.....	20
5.2 Réponse immunitaire.....	21
5.3 Réponse humorale.....	23
5.4 Réinfections.....	25
5.5 L'infection par le hMPV induit une forte inflammation pulmonaire.....	25
5.6 Conséquences à long terme associées à l'infection par le hMPV.....	25
6. Caractéristiques génomiques du hMPV.....	26
6.1 Classification du hMPV.....	26
6.2 Organisation génomique.....	26
6.3 Hétérogénéité des souches de hMPV.....	28
7. Les protéines virales.....	30
7.1 Glycoprotéines de surface.....	32
7.1.1 Protéine de fusion (F).....	32
7.1.2 Glycoprotéine d'attachement (G).....	35
7.1.3 Petite glycoprotéine hydrophobe (SH).....	36
7.2 Protéines structurales.....	37
7.2.1 Protéine de matrice (M).....	37
7.3 Protéines associées à la polymérase virale.....	37
7.3.1 Nucléoprotéine (N).....	37

7.3.2 Phosphoprotéine (P).....	38
7.3.3 Facteur d'élongation de la transcription (M2.1).....	38
7.3.4 Facteur de régulation de la synthèse d'ARN (M2.2).....	38
7.3.5 La sous-unité majeure de la polymérase (L).....	39
8. Le cycle viral.....	39
8.1 Attachement du hMPV à sa cellule cible.....	40
8.2 Fusion.....	40
8.3 Transcription et traduction.....	42
8.4 Réplication.....	43
8.5 Assemblage et bourgeonnement.....	43
9. Diagnostic du hMPV.....	44
9.1 Culture virale.....	44
9.2 Détection et quantification de l'ARN viral par RT-PCR.....	45
9.3 Détection antigénique.....	45
9.4 Sérologie.....	46
10. Pathogenèse et modèles animaux.....	46
10.1 Les petits animaux.....	46
10.2 Les primates non-humains.....	47
11. Vaccins.....	49
11.1 Types de vaccins.....	49
11.1.1 Virus inactivés.....	49
11.1.2 Virus vivants atténués.....	51
11.1.3 Vaccins peptidiques ou sous-unitaires.....	52
11.1.4 Vaccins à ADN.....	53
12. Options thérapeutiques.....	53
12.1 Préparations d'immunoglobulines.....	53
12.2 Ribavirine.....	54
12.3 Héparine et NMSO3.....	55
12.4 Anticorps monoclonal humanisé.....	55
12.5 Alternative thérapeutique à explorer : les inhibiteurs de fusion.....	55
13. Nouvelle avenue thérapeutique : la voie de l'interférence à l'ARN.....	56
13.1 Fonctions associées à l'interférence à l'ARN.....	56
13.2 Principales molécules d'ARN actives.....	57
13.3 Protéines impliquées et maturation.....	57
13.4 La voie des petits ARN interférants (siRNA).....	59
13.5 La voie des microARN (miRNA).....	60
13.6 Les applications liées à l'interférence à l'ARN.....	61
13.7 Exemples probants du potentiel thérapeutique des siRNAs.....	62
13.8 Les problèmes potentiels associés à cette technologie.....	63
13.9 Optimisation.....	63
Chapitre II. Problématique, hypothèses et objectifs de recherche.....	64
1. Problématique.....	64
2. Hypothèses de recherche.....	64
3. Objectifs de recherche détaillés.....	65
1 ^{er} objectif de recherche : Développement d'un peptide pouvant inhiber efficacement la fusion du hMPV aux cellules cibles <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	65

2 ^e objectif de recherche : Démonstration du potentiel thérapeutique des siRNAs dans le traitement d'une infection par le hMPV.	66
Chapitre III. Identification et développement d'un inhibiteur de la fusion du Méta-pneumovirus humain.	68
1. Résumé.....	68
2. Contributions des auteurs.....	69
3. Article	70
Abstract.....	71
Introduction.....	72
Materials and Methods.....	74
Results.....	78
Discussion.....	82
Acknowledgments	86
References.....	87
Figure Legends	94
Chapitre IV. Inhibition de la réplication du Méta-pneumovirus humain par de petits ARN interférants	101
1. Résumé.....	101
2. Contributions des auteurs.....	102
3. Article	103
Abstract.....	104
Introduction.....	105
Materials and Methods.....	107
Results.....	110
Discussion.....	115
Acknowledgments	119
References.....	121
Figure Legends	124
Chapitre V. Évaluation <i>in vivo</i> de l'efficacité de siRNAs modifiés et non modifiés à inhiber la réplication du hMPV	131
1. Résumé.....	131
2. Contributions des auteurs.....	132
3. Mise en contexte	133
4. Matériel et méthode	135
5. Résultats.....	141
6. Discussion et conclusion.....	157
Chapitre VI. Discussion générale	163
1. Cibler la première étape de l'infection par le hMPV par le développement d'un inhibiteur de fusion représente une bonne option prophylactique.	163
2. L'étape de transcription et réplication du virus peut être inhibée <i>in vitro</i> par le mécanisme d'interférence à l'ARN.	168
3. Une optimisation des siRNAs s'avère essentielle à la poursuite de l'étude <i>in vivo</i> de l'inhibition de la réplication du hMPV.	170
Chapitre VII. Conclusions et perspectives.....	173
Bibliographie	175
Annexe. Articles supplémentaires	193

Liste des tableaux

Tableau 1. Identité de séquence des protéines du hMPV NL00-1 (A1) avec d'autres paramyxovirus	31
Tableau 2. Longueur des cadres de lecture ouverts du hMPV A et B comparativement à d'autres paramyxovirus.....	31
Tableau 3. Différents traitements de DsiRNAs administrés aux souris infectées par le hMPV lors de la première expérience.....	140
Tableau 4. Différents traitements de DsiRNAs administrés aux souris infectées par le hMPV lors de la deuxième expérience.	141
Tableau 5. Résultats des essais d'inhibition pour chaque DsiRNA non-modifié et leurs versions modifiées évalués contre hMPV de type A1 et B2.....	144
Tableau 6. Augmentation de l'induction de cytokines par des DsiRNAs à 10 mg/kg sans formulation et à 2 mg/kg avec formulation liposomale MF1312 mesurée dans les lavages bronchoalvéolaires.....	148

Liste des figures

Figure 1. Particules virales observées en microscopie électronique par coloration négative	14
Figure 2. Taux de séropositivité au hMPV selon le groupe d'âge	19
Figure 3. Représentation de l'apparition des anticorps IgM et IgG suivant une infection primaire et/ou une réinfection par le hMPV	24
Figure 4. Classification des virus de la famille des <i>Paramyxoviridae</i> causant des infections chez l'humain	26
Figure 5. Comparaison de l'organisation génomique des virus appartenant au genre <i>Pneumovirus</i> (hRSV) et au genre <i>Metapneumovirus</i> (hMPV et aMPV)	27
Figure 6. Organisation génomique détaillée de deux souches de hMPV représentant les deux génotypes : A (CAN97-83) et B (CAN98-75)	28
Figure 7. Représentation schématique de l'hétérogénéité des souches de hMPV	29
Figure 8. Représentation schématique d'une particule de hMPV	30
Figure 9. Représentation schématique de la protéine de fusion du hMPV	33
Figure 10. Représentation d'une hélice α . (coiled coil)	34
Figure 11. Illustration du mécanisme de fusion possiblement utilisé par le hMPV pour pénétrer dans la cellule hôte	41
Figure 12. Interactions entre les trois HRA et les trois HRB	41
Figure 13. Photographies de cellules LLC-MK2 non-infectées, infectées avec une souche de hMPV ne produisant pas de syncytium et infectées par une souche de hMPV produisant beaucoup de syncytia.	45
Figure 14. Débalancement de la réponse immunitaire vers une réponse de type Th2 suite à l'administration d'un vaccin RSV inactivé	51
Figure 15. Illustration de la structure d'un miRNA et d'un siRNA	57
Figure 16. Illustration de la voie de l'interférence à l'ARN	58
Figure 17. Chemin emprunté par les siRNAs dans la voie de l'interférence à l'ARN	60
Figure 18. Représentation d'un miRNA : du pre-miRNA au brin guide incorporé dans le RISC	61
Figure 19. Illustration de la répression traductionnelle induite par un miRNA	62
Figure 20. Prise en charge des substrats de Dicer (DsiRNAs) par Dicer et entrée dans la voie de l'interférence à l'ARN	134
Figure 21. Séquence des siRNAs analysés par un test de dégradation	142
Figure 22. Modifications chimiques de l'ARN	143
Figure 23. Induction d'IFN α humain par les différents siRNAs non modifiés chez des PBMC évaluée par ELISA	146
Figure 24. Induction d'IFN α par différents DsiRNAs <i>in vivo</i> mesurée dans les lavages broncho-alvéolaires par ELISA 4 h post-traitement	149
Figure 25. Poids (% par rapport au poids initial) des souris recevant différents traitements du jour 2 pré-infection au jour 5 post-infection par le hMPV	151
Figure 26. Poids (% par rapport au poids initial) des souris traitées avec une dose unique de siRNA 10 mg/kg 4 h avant l'administration intranasale de hMPV	152
Figure 27. Poids (% par rapport au poids initial) des souris traitées non-infectées	152
Figure 28. Poids (% par rapport au poids initial) des souris ayant reçu 10 mg/kg de DsiRNAs aux jours -1, 0, 1 et 2 de l'infection par le hMPV	154

Figure 29. Titres viraux pulmonaires évalués par RT-PCR quantitatif (copies d'ARN viral par gramme de poumon) et culture virale (TCID ₅₀ /gramme de poumon) des différents traitements de DsiRNAs administrés aux souris aux jours -1, 0, 1 et 2 de l'infection par le hMPV.....	155
Figure 30. Poids (% par rapport au poids initial) des souris recevant différents DsiRNAs à 25 mg/kg aux jours -1, 0, 1 et 2 de l'infection par le hMPV.	156
Figure 31. Illustration des points de contact importants entre le brin guide et l'ARNm cible	169

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
aMPV	De l'anglais «avian metapneumovirus» pour métapneumovirus aviaire
ARN	Acide ribonucléique, en anglais «ribonucleic acid» (RNA)
ARNm	ARN messenger
CHUL	Centre hospitalier de l'Université Laval
CI ₅₀	Concentration inhibitrice 50%
DsiRNA	De l'anglais «Dicer substrate siRNA» pour siRNA substrat de Dicer
ECP	Effet cytopathique
hMPV	De l'anglais «human metapneumovirus» pour métapneumovirus humain
HR	De l'anglais «heptad repeat» pour répétition de 7 acides aminés
hRSV	De l'anglais «human respiratory syncytial virus» pour virus respiratoire syncytial humain
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobulines
IL	Interleukine
IP-10	De l'anglais «IFN γ inducible protein-10»
IRF	De l'anglais «IFN regulatory factor»
kDa	Kilo Dalton
MCP	De l'anglais «monocyte chemotactic protein»
MDA	De l'anglais «melanoma differentiation-associated gene»
MIP	De l'anglais «macrophage inflammatory protein»
miRNA	De l'anglais «microRNA» pour microARN
MPOC	Maladies pulmonaires obstructives chroniques
NF- κ B	De l'anglais «Nuclear factor κ B»
nM	Nanomolaire
PCR	De l'anglais «polymerase chain reaction» pour réaction de polymérisation en chaîne
PIV	De l'anglais «parainfluenza virus» pour virus parainfluenza

RANTES	De l'anglais «regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted»
RIG	De l'anglais «retinoic acid induced gene»
RNAi	De l'anglais «RNA interference» pour interférence par l'ARN
RT	De l'anglais «reverse-transcriptase» pour transcriptase inverse
siRNA	De l'anglais «small interfering RNA» pour petit ARN interférant
STAT	De l'anglais «signal transducers and activators of transcription»
TCID ₅₀	De l'anglais «Tissue culture infectious dose 50%» pour dose infectant 50% des puits en culture cellulaire
Th	De l'anglais «T-helper cell»
TLR	De l'anglais «Toll-like receptor»
TRBP	De l'anglais «Transactivation response RNA-binding protein»
μM	Micromolaire
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

Chapitre I. Introduction générale

1. Découverte du hMPV

Entre 1993 et 2001, des enfants souffrant d'infections des voies respiratoires se sont présentés au CHUL à Québec sans que l'agent étiologique ne puisse être identifié. L'équipe du Dr. Guy Boivin du Centre de Recherche en Infectiologie du CHUL s'affaira alors à isoler et caractériser le pathogène respiratoire présent dans les échantillons prélevés chez ces enfants malades [28, 197]. Au même moment, en 2001, c'est l'équipe du Dr. Osterhaus, aux Pays-Bas, qui identifia pour la première fois le metapneumovirus humain (hMPV), un nouveau paramyxovirus, à partir d'aspirations nasopharyngées prélevées chez des enfants souffrant d'infections des voies respiratoires [232].

2. Caractéristiques virologiques du hMPV

2.1 Microscopie électronique

Les particules virales observées en microscopie électronique apparaissent pléiomorphes, sphériques et filamenteuses avec un diamètre variant de 150 à 600 nm, pour une moyenne de 209 nm (figure 1). La capsid a un diamètre moyen de 17 nm et une longueur comprise entre <200 et 1000 nm, avec une distance d'espacement (un «pitch spacing») de 7 nm. La longueur des projections visibles à la surface des virus se situe entre 13 et 17 nm. Ces projections semblent correspondre à des glycoprotéines de surface ancrées dans la membrane virale. Toutes ces caractéristiques morphologiques sont d'ailleurs typiques de la famille des *Paramyxoviridae*.

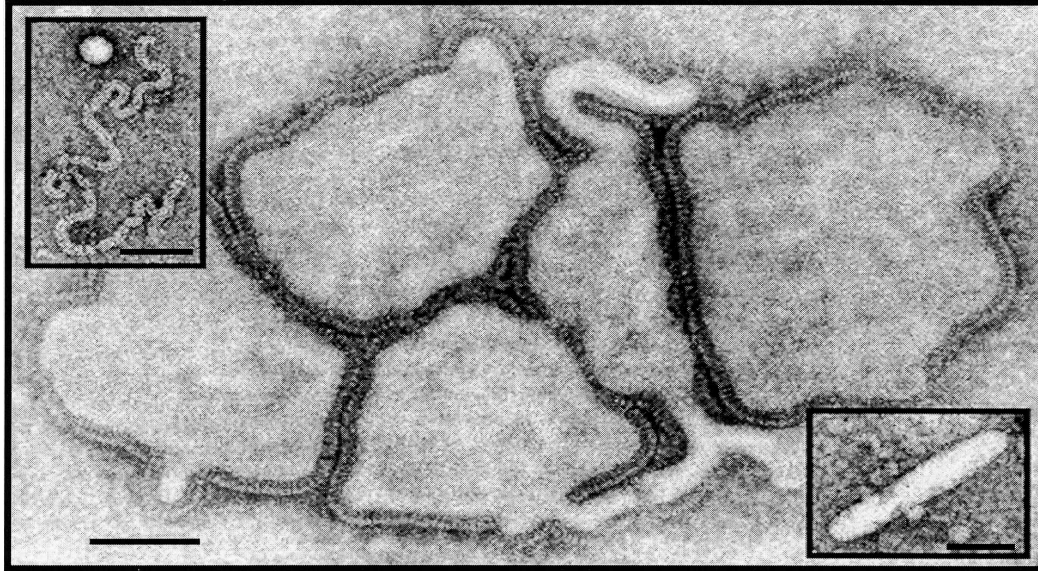


Figure 1. Particules virales observées en microscopie électronique par coloration négative. L'image centrale illustre cinq particules pléiomorphes alors que l'image supérieure gauche représente une nucléocapside et celle de droite, une particule filamenteuse. Les barres de référence correspondent à 100 nm [197].

2.2 Postulats de Koch

C'est en 1884 que les postulats de Koch ont été publiés pour la première fois [10]. Ces critères servaient à établir une relation causale entre un microorganisme et une maladie spécifique. Depuis ce temps, ces postulats ont été modifiés et adaptés aux virus. Appliqués à la virologie, les principaux critères sont maintenant les suivants :

- 1- Le virus doit être présent chez le malade mais absent des individus sains.
- 2- Le virus suspecté doit être isolé et cultivé sur des cellules hôtes.
- 3- La maladie doit se développer lorsque le virus isolé est inoculé à un individu sain de l'espèce hôte ou chez une espèce apparentée. Ce même virus doit de nouveau être isolé de l'hôte infecté expérimentalement.
- 4- Une réponse immunitaire spécifique à ce virus doit être détectée chez l'hôte original ou chez l'animal infecté expérimentalement.

En ce qui concerne le hMPV, l'étude initiale de 2001 [232] a démontré que ce virus respecte les postulats de Koch, du moins en bonne partie.

- 1- Le hMPV a été isolé chez des patients souffrant d'infections des voies respiratoires mais n'est pas retrouvé chez des individus en bonne santé (asymptomatiques).
- 2- Le hMPV produit des effets cytopathiques sur des lignées cellulaires provenant de singes telles que les cellules tMK et LLC-MK2.
- 3- Des macaques cynomolgus peuvent être expérimentalement infectés par le hMPV et présenter des symptômes d'infection respiratoire. Des échantillons prélevés chez les singes malades contenaient de l'ARN viral.
- 4- Les sérums de personnes appartenant à différents groupes d'âges présentaient, à des degrés divers, des anticorps contre le hMPV.

3. Manifestations cliniques

Une infection par le hMPV peut se présenter sous différentes formes selon l'individu infecté, variant d'un rhume ou d'un syndrome d'allure grippale à une pneumonie ou une bronchiolite. Malheureusement, les symptômes associés à une infection par le hMPV sont très similaires à ceux causés par d'autres membres de la famille des *Paramyxoviridae* comme le virus respiratoire syncytial humain (hRSV) et les virus parainfluenza (PIV) de même que les virus influenza qui appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae* [184]. Les infections asymptomatiques par le hMPV semblent rares [235, 250]. Le hMPV infecte plus sévèrement les populations pédiatriques et gériatriques ainsi que les personnes immunosupprimées [28, 70].

3.1 Chez l'enfant

Les jeunes enfants représentent la catégorie la plus susceptible de développer une infection sévère des voies respiratoires inférieures lorsqu'ils contractent le hMPV. C'est généralement avant l'âge de 5 ans, et principalement avant 2 ans, que les enfants présentent leur premier épisode d'infection par le hMPV. Toutefois, le premier épisode d'infection par

le hMPV semble survenir chez des enfants légèrement plus âgés que dans le cas du hRSV [29, 36, 44, 130, 131, 168, 183, 193]. Cela pourrait être dû à la présence prolongée d'anticorps maternels contre le hMPV comparativement au hRSV chez les très jeunes enfants, ce qui leur confère une certaine immunité [151]. Les manifestations cliniques comprennent de la fièvre, des nausées, des vomissements, de la dyspnée, de la toux, une rhinorrhée et un râle bronchique sifflant. Les infections les plus sévères peuvent se présenter sous forme de pneumonies, bronchites ou bronchiolites accompagnées ou non d'otites et mener à l'hospitalisation [28, 130]. De 5 à 10 % des cas d'enfants hospitalisés pour une infection sévère des voies respiratoires sont d'ailleurs attribuables au hMPV. En ce qui concerne le taux de détection, le hMPV se classe tout juste derrière le hRSV en alternance avec les PIV et les virus influenza [3, 28, 160, 164]. De plus, ce virus est responsable de 12 à 20 % des visites en cliniques externes pour une infection des voies respiratoires chez les enfants [70].

Certains facteurs semblent accroître les risques de développer une infection plus sévère : prématurité, maladie sous-jacente telle que leucémie, épilepsie, tumeur aux poumons, lymphome, maladie cardio-vasculaire, maladie pulmonaire chronique, malformation cardiaque [28, 84, 100, 194, 235]. De plus, le hMPV semblerait capable, en de rares occasions, de traverser la barrière hémato-encéphalique puisque de l'ARN viral a été détecté dans des spécimens provenant de poumon et de cerveau de jeunes patients atteints d'encéphalite. Certains cas se sont d'ailleurs révélés fatals [96, 114, 131, 209, 210].

3.2 Chez l'adulte immunocompétent

Chez les adultes en bonne santé, la réinfection par le hMPV entraîne la plupart du temps une maladie peu sévère des voies respiratoires supérieures caractérisée principalement par de la toux, des maux de gorge, de la congestion, une production accrue de mucus et une rhinorrhée [85]. Les symptômes de la maladie se résorbent habituellement en l'espace de 2 à 14 jours [158].

3.3 Chez les patients immunosupprimés

Les individus présentant des maladies sous-jacentes ou dont le système immunitaire est plus faible sont, par contre, plus susceptibles de développer des infections des voies respiratoires inférieures graves et prolongées. Certains patients doivent être admis aux soins intensifs et peuvent nécessiter une ventilation mécanique [28]. Les transplantés de moelle osseuse, de poumon, ou de cellules souches hématopoïétiques sont plus vulnérables aux infections par le hMPV. Des cas de défaillance respiratoire aiguë fatale causée par le hMPV ont été rapportés [82, 130].

3.4 Chez les personnes âgées

Lorsqu'elles entrent en contact avec le hMPV, les personnes âgées sont également plus susceptibles de développer des réinfections sévères des voies respiratoires inférieures associées à une morbidité élevée et à de la mortalité. Il semble toutefois que ce soit les personnes âgées présentant des co-morbidités telles que du diabète, des problèmes neurologiques, des maladies cardiopulmonaires, des accidents vasculaires cérébraux, qui soient les principales victimes d'infections sévères. Les symptômes et manifestations cliniques sont semblables aux infections pédiatriques auxquelles s'ajoutent un souffle court et de la léthargie. Plusieurs cas d'épidémies dans des centres de soin de longue durée ont été rapportés récemment. Le taux d'infection par le hMPV pouvait atteindre 18 à 72 % avec un taux de mortalité de plus de 10 % [30, 158].

3.5 Co-infections

Certains des patients infectés par le hMPV peuvent également être co-infectés par d'autres pathogènes respiratoires, virus ou bactéries. Le co-pathogène le plus fréquemment détecté étant le hRSV [140]. Les cas d'infections mixtes représentent néanmoins généralement <10% des infections associées au hMPV [130, 250]. Il ne semble pas y avoir de consensus quant à une sévérité accrue de la maladie lors de co-infections par rapport à l'infection seule. On peut aussi penser à l'écllosion de cas du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) lors de laquelle de nombreuses personnes étaient également co-infectées par le hMPV sans toutefois qu'un lien clair ne soit établi avec une sévérité accrue de la maladie [45, 150, 201].

3.6 Exacerbation d'asthme et de maladies obstructives chroniques

Les maladies pulmonaires obstructives chroniques (MPOC) sont la 4^e cause de mortalité dans le monde et les infections respiratoires sont responsables de 33 à 50 % des cas d'exacerbation de MPOC. Les infections virales augmentent la sévérité ainsi que la fréquence d'exacerbations des patients avec MPOC et prolongent la durée de convalescence requise [214, 239]. La liste de virus détectés est longue : rhinovirus, influenza, hRSV, coronavirus, PIV, adenovirus et autres. Le hMPV ne semble pas faire exception, puisque des études rapportent son implication dans 5.5 à 12 % des cas d'exacerbation de MPOC [171, 240].

Les infections virales sont également responsables d'une grande proportion (~80 %) des cas d'exacerbation d'asthme chez l'adulte et l'enfant [128, 229] et le hMPV semble aussi y contribuer, bien qu'il y ait encore peu de données sur le sujet [33, 86, 208, 249, 250]. Les taux d'exacerbation d'asthme associés au hMPV serait d'environ 7 % chez l'adulte [249]. Certaines études proposent même que le hMPV serait plus fortement associé aux cas d'exacerbation d'asthme que le hRSV et les virus influenza [193, 250].

4. Épidémiologie

4.1 Répartition géographique

Bien qu'il ait été initialement découvert aux Pays-Bas, le hMPV est aujourd'hui répertorié à travers le monde : Europe [32, 49, 53, 88, 127, 157, 166, 222, 232, 243, 252], Amérique du Nord [83, 186, 197], Amérique du Sud [61, 90, 101, 179], Afrique [163], Asie [44, 50, 193, 227] et Océanie [185]. La prévalence de ce virus demeure relativement constante et similaire d'un pays à l'autre.

4.2 Pic d'activité

Les infections par le hMPV semblent suivre un cycle saisonnier. Dans les régions tempérées, le pic d'activité du hMPV survient durant l'hiver et au printemps c'est-à-dire durant la saison respiratoire typique, et recoupe ainsi celles du hRSV et de l'influenza [3, 84, 131, 166, 184, 251]. Toutefois, beaucoup d'études ont également rapporté une faible

circulation du hMPV durant le reste de l'année [28, 46, 84, 130, 131, 164, 183, 250, 251]. De plus, en 2001-2002 à Hong Kong, l'activité du hMPV aurait plutôt connu son maximum durant la saison printemps-été [193].

4.3 Séroprévalence

Une étude sérologique basée sur l'utilisation de la protéine virale F (fusion) a permis de déterminer les taux de séropositivité au hMPV selon les groupes d'âge (figure 2). Ainsi, nous pouvons constater que les enfants de 0 à 5 mois ont un taux très élevé d'anticorps contre le hMPV. Ces anticorps sont fort probablement d'origine maternelle. Le taux de positivité des enfants baisse entre l'âge de 6 et 48 mois, ce qui correspond à la période où les enfants contractent le hMPV. Par la suite, les pourcentages de séropositivité augmentent pour atteindre plus de 90 % dans le groupe d'âge 11-20 ans [151]. Cela correspond aux données obtenues par d'autres groupes dont les études sérologiques avaient démontré que la majorité des enfants de 5 ans ont été en contact avec le hMPV, et qu'à l'âge de 10 ans, près de 100 % des enfants sont séropositifs pour ce virus [106, 232]. L'étude de Hamelin et al [107] présente des taux de séropositivité d'environ 85% chez une population adulte présentant une pneumonie acquise en communauté ou une exacerbation de MPOC.

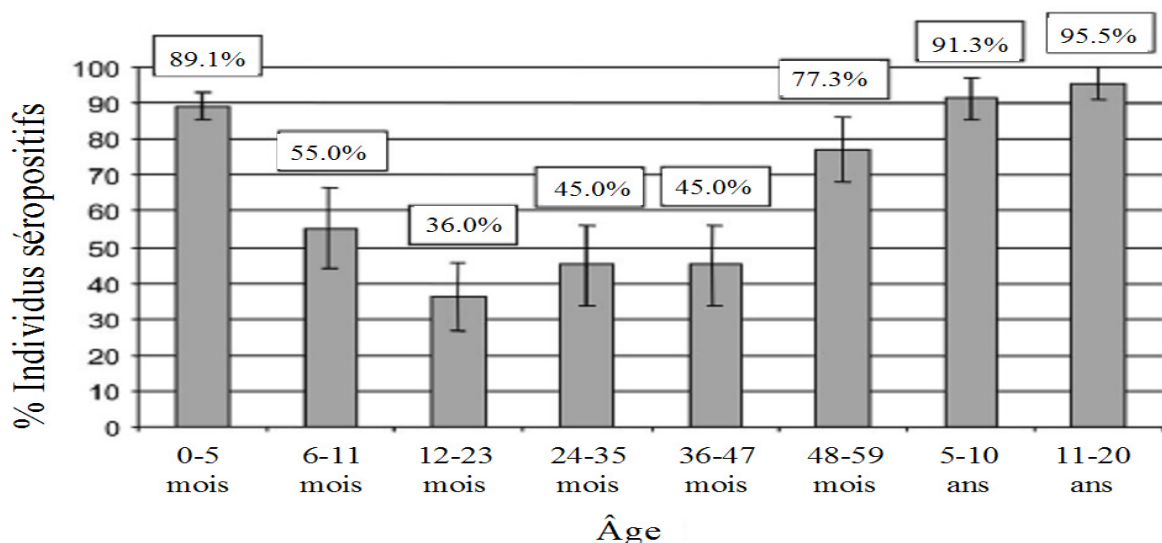


Figure 2. Taux de séropositivité au hMPV selon le groupe d'âge. Les pourcentages de séropositivité sont indiqués au-dessus de chaque groupe d'âge. Adapté de [151].

4.4 Transmission

Les particules virales semblent très stables lorsque préservées dans une solution aqueuse et elles demeurent infectieuses sur de longues périodes c'est-à-dire jusqu'à sept jours à la température de la pièce. Par contre, aucune répllication ne semble possible lorsque les particules virales ont séchées [182]. De ce fait, la principale voie de transmission du virus semble être les contacts directs entre personnes et via les gouttelettes. Les enfants infectés par le hMPV peuvent transmettre le virus à plus de 75 % des membres de leur famille [242]. De plus, la période d'incubation entre le contact initial et le développement des symptômes serait de 4 à 6 jours [79, 193]. L'excrétion du hMPV semble généralement s'étaler sur cinq jours chez l'enfant [242] bien que, dans certains cas, l'excrétion virale puisse se poursuivre jusqu'à une à deux semaines après l'apparition des symptômes [79]. Une jeune patiente sévèrement immunosupprimée a toutefois excrété le virus durant 11 mois [1]. De même, une étude suggère que les enfants co-infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) pourraient excréter le hMPV jusqu'à 163 jours suivant la détection initiale du virus [164]. L'ARN viral est majoritairement détecté dans les spécimens pulmonaires, mais le hMPV peut parfois être retrouvé dans des échantillons de salive et de sueur lorsque le patient est très jeune ou présente une maladie sous-jacente [242].

5. Réponse immunitaire induite par le hMPV

5.1 Cellules cibles

L'épithélium pulmonaire cilié et les cellules alvéolaires semblent les principales cibles du hMPV [223, 238]. L'étude histopathologique du poumon d'une patiente décédée d'une infection par le hMPV a révélé la présence du virus au niveau des cellules épithéliales bronchiolaires [30]. Chez le macaque cynomolgus, le hMPV semble d'ailleurs se répliquer uniquement dans le tractus respiratoire, notamment dans les cellules épithéliales bronchiolaires et alvéolaires de type 2 [144] et une étude chez la souris BALB/c démontre que ce virus n'est détecté dans aucun autre organe [6]. Chez l'humain, de l'ARN viral a été isolé à partir du sang de patients dont l'échantillon nasal était positif pour le hMPV [166].

5.2 Réponse immunitaire

La réponse immunitaire innée représente une composante essentielle du système de défense de l'hôte contre les virus. La réponse innée est initiée par des récepteurs reconnaissant des motifs associés aux pathogènes. Elle est coordonnée au niveau cellulaire par l'activation de facteurs de transcription qui régulent l'expression de molécules antivirales dont certaines cytokines et principalement l'interféron (IFN) de type I [135, 200]. Une réponse immunitaire efficace contre le hMPV implique également la production d'anticorps neutralisants et l'induction d'une immunité cellulaire impliquant les lymphocytes T et les cellules NK [6, 139].

Plusieurs molécules sont donc impliquées dans la réponse antivirale. Les cytokines/chimiokines pro-inflammatoires sont principalement responsables du recrutement vers le site de l'infection et de l'activation des leucocytes [11]. Les membres de la famille de l'IFN ont des propriétés anti-virales, anti-prolifératives et immunomodulatrices essentielles [218]. Les facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation des médiateurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. La transduction de signal est également une composante importante de la réponse antivirale et est engendrée par les TLR, les protéines cytoplasmiques liant l'ARN, les protéines kinases dépendantes de l'ARN induites par l'IFN et les hélicases d'ARN [135].

Plusieurs cytokines et chimiokines sont donc sécrétées suite à une infection par le hMPV pour activer et recruter des leucocytes aux poumons. *In vitro*, l'infection de cellules épithéliales alvéolaires et de cellules dendritiques par le hMPV induit la production de chimiokines de types CXC et CC ainsi que des cytokines pro-inflammatoires. L'interleukine (IL)-8, l'IP (IFN γ inducible protein)-10, MCP (monocyte chemotactic protein)-1, RANTES (regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted), MIP (macrophage inflammatory protein)-1 α/β , l'IL-6 mais aussi l'IFN de type I sont notamment induits [14, 104]. Le hMPV est également un bon inducteur des facteurs de transcription appartenant aux familles NK- κ B (Nuclear factor κ B), IRF (IFN regulatory factor) et STAT (signal transducers and activators of transcription) [14]. De plus, le TLR (Toll-like receptor)-3 et les hélicases d'ARN RIG (retinoic acid induced gene)-1 et MDA (melanoma differentiation-associated gene)-5 qui sont membres de la famille des

récepteurs reconnaissant des motifs spécifiques (PRR pour « pattern-recognition receptors ») semblent impliqués dans la réponse des cellules épithéliales pulmonaires à l'infection par le hMPV *in vitro* [153].

Une étude par puce à ADN des gènes différentiellement exprimés chez les cellules de l'épithélium pulmonaire infectées par le hMPV révèle une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans les réponses immunitaires innée et adaptative, dans la régulation de la transcription et la transduction de signal. Le hMPV aurait aussi une action d'inhibition des voies métaboliques et catalytiques ainsi que du transport et du cycle cellulaire [15]. Cette étude confirme également l'induction de plusieurs cytokines, molécules inflammatoires et facteurs de transcription par le hMPV dont l'IL-8, l'IL-10, RANTES, l'IL-6, l'IFN- β , MCP-1, IP-10, l'IL-32, RIG-1, IRF-1 et NF- κ B entre autres [15]. De plus, le hMPV pourrait activer des cascades de signalisation via des voies dépendantes et indépendantes des TLR dans les cellules épithéliales [15]. Le hMPV serait également en mesure de diminuer la réponse anti-oxydative des cellules infectées créant ainsi un stress oxydatif important notamment chez les cellules épithéliales pulmonaires [15].

Chez la souris BALB/c, les niveaux de cytokines/chimiokines IFN- γ , RANTES, MIP-1 α et IL-4 augmentent avec la réplication virale. De plus, les cytokines/chimiokines MCP-1 et KC (l'homologue murin de l'IL-8) semblent être induites très tôt après l'administration du virus [63, 112].

Jusqu'à présent, encore peu d'études chez l'humain ont été réalisées. L'induction d'IL-8 suite à l'infection par le hMPV semble toutefois confirmée chez l'humain, puisque de hauts niveaux ont été détectés dans les sécrétions respiratoires d'enfants présentant une bronchiolite au hMPV [127, 147]. RANTES semble, par contre, peu induit chez les enfants infectés par le hMPV [147]. Les taux de cytokines détectées chez les enfants hospitalisés sont comparables à ceux retrouvés chez les patients vus en clinique externe, ce qui suggère que la sévérité des symptômes ne serait pas seulement reliée aux taux de cytokines pulmonaires détectés [147].

Le profil d'expression de cytokines induites suite à une infection par le hMPV est quelque peu différent du hRSV. Chez les jeunes enfants, le ratio IFN- γ /IL-4 est inférieur chez les

enfants infectés par le hMPV par rapport au hRSV, ce qui indiquerait une polarisation vers une réponse de type Th2 chez les patients infectés par le hMPV [175]. Les cytokines associées à une réponse de type Th1 sont principalement l'IL-2, l'IL-12, le TNF- β , et l'IFN- γ , alors que les cytokines associées à la réponse Th2 sont l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10 et l'IL-13 [97]. Une autre étude chez l'enfant rapporte une expression plus faible d'IL-12, de TNF- α , d'IL-1 β , d'IL-6 et d'IL-8 chez les enfants infectés par le hMPV comparativement au hRSV, alors que l'expression d'IL-10 est comparable pour les deux virus. Cela indique que le hMPV serait un faible inducteur de cytokines inflammatoires chez l'humain [147].

Chez la souris BALB/c, l'infection par le hMPV induit peu l'expression d'IL-1 α , d'IL-1 β , d'IL-6, de TNF- α , de G-CSF, d'IL-10, d'IL-17 et d'IL-12 p70 comparativement au hRSV. Par contre, le hMPV semble induire davantage l'expression de GM-CSF et d'IFN- α que le hRSV. En début d'infection, le hMPV induit plus faiblement l'IFN- γ , l'IL-12 p40 et l'IL-18 que le hRSV, mais la tendance s'inverse plus tard au cours de l'infection [103]. Les chimiokines CCL5 (RANTES) et CCL3 (MIP-1 α) sont moins fortement induites par le hMPV que par le hRSV. Par contre, la chimiokine KC (IL-8), qui est moins fortement induite par le hMPV que par le hRSV en début d'infection, atteint un niveau plus élevée à partir du jour 3 post-infection chez les sujets infectés par le hMPV comparativement au hRSV [103].

5.3 Réponse humorale

L'infection virale est normalement suivie d'une apparition d'immunoglobuline (Ig) M, IgG, IgE et IgA dans le sérum et au niveau des muqueuses selon un ordre typique. Dans le cas du hRSV, l'infection primaire induit une réponse IgM en 5 à 10 jours selon l'âge du patient. Ces IgM persistent normalement pour 1 à 3 mois. La détection d'IgG atteint un sommet 20 à 30 jours après l'apparition des symptômes. Dans le cas du hRSV, les niveaux d'IgG déclinent rapidement durant l'année suivant l'infection primaire (figure 3). Lors d'une réinfection, de hauts titres d'IgG peuvent être détectables en 5 à 7 jours. En ce qui concerne la réponse IgA dans le sérum, ce type d'immunoglobuline peut apparaître plusieurs jours après la détection d'IgM et d'IgG. Par contre, des IgA anti-hRSV peuvent

être observés dans les sécrétions nasopharyngées en 2 à 5 jours après l'infection, atteignant un maximum en 8 à 13 jours. De plus, ces sécrétions peuvent contenir des IgE spécifiques au hRSV sous forme libre ou associés à des cellules [187]. Les nombreuses caractéristiques communes au hRSV et au hMPV nous portent à croire que l'infection par le hMPV engendre la même séquence d'apparition des immunoglobulines. D'ailleurs, des IgM spécifiques au hMPV sont détectés lors de la phase aiguë de l'infection alors que la détection d'anticorps IgG spécifiques au hMPV est possible quelques semaines après l'infection, c'est-à-dire que l'on note une augmentation des titres d'anticorps (séroconversion) [28, 78, 79]. En ce qui concerne le hMPV, la protéine F, mais également la protéine G, semblent importantes pour l'induction de la réponse immunitaire humorale, puisque des IgG spécifiques aux protéines F et G du hMPV sont détectées [81, 124, 216]. La présence d'IgG spécifiques à la protéine G semble toutefois transitoire [81]. Les protéines N et M semblent également induire la production d'anticorps spécifiques [106, 123]. Chez la souris BALB/c, une séroconversion peut être observée 5 jours post-infection et des IgG1 et IgG2a sont détectées. Par contre, aucune IgA spécifique au hMPV ni aucune IgE n'a été retrouvée dans le sérum de ces souris [63].

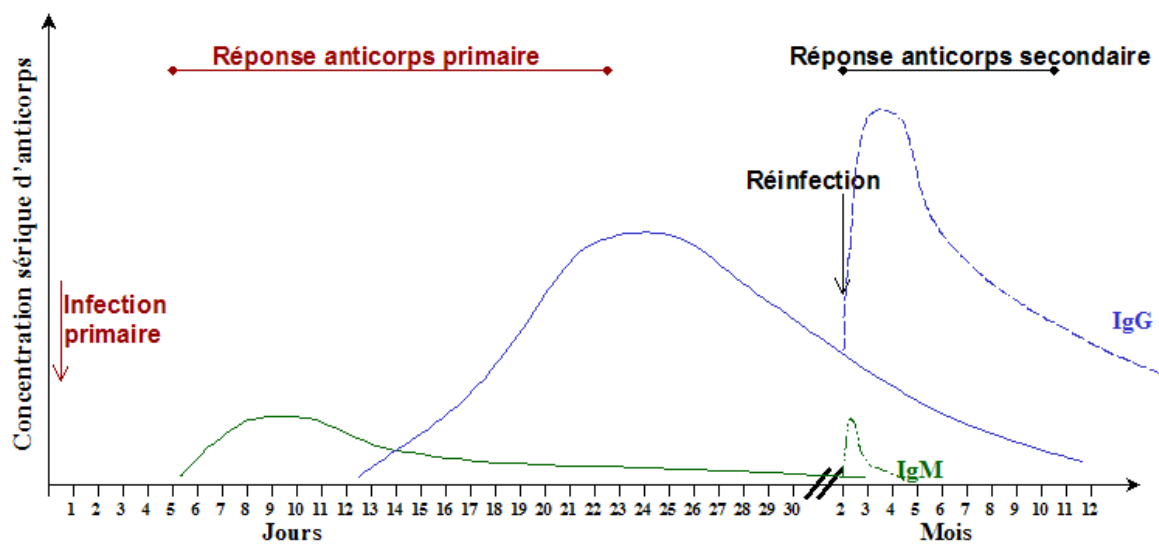


Figure 3. Représentation de l'apparition des anticorps IgM et IgG suivant une infection primaire et/ou une réinfection par le hMPV. Adapté de [40].

5.4 Réinfections

La réponse immunitaire induite par le hMPV et la présence d'anticorps contre ce virus ne semblent toutefois pas suffisantes pour prévenir les réinfections. Les cas de réinfections pourraient être dûs à une immunité incomplète ou à une infection par un autre génotype de hMPV [78, 194, 197, 222]. Il est également possible que l'immunité contre le hMPV ne persiste pas suffisamment longtemps, peut-être même durant moins d'une année [81, 164, 233, 251]. Des études ont rapporté que 4.5 % des infections respiratoires de l'adulte seraient des cas de réinfections par le hMPV [86] et que ce taux représenterait 4.9 % chez les enfants [191].

5.5 L'infection par le hMPV induit une forte inflammation pulmonaire

L'infection des cellules épithéliales pulmonaires résulte en une dégénérescence et une nécrose cellulaire, une augmentation de la production de mucus, suivie d'une inflammation pulmonaire péribronchique, d'un recrutement de neutrophiles et de macrophages dans les alvéoles [30, 238]. Une étude histopathologique chez la souris BALB/c démontre également que les infiltrats inflammatoires pulmonaires observés lors de l'infection par le hMPV sont majoritairement retrouvés autour et à l'intérieur des alvéoles et sont constitués de neutrophiles, de lymphocytes et de cellules mononucléées incluant les macrophages et monocytes et que l'infection par le hMPV n'induit pas d'augmentation du compte d'éosinophiles dans les lavages bronchoalvéolaires [63, 112].

5.6 Conséquences à long terme associées à l'infection par le hMPV

Chez le patient infecté, l'infection virale et le recrutement massif de cellules immunitaires vers les poumons représentent la cause de cette inflammation et des changements histopathologiques qui en résultent. Le hMPV induit donc une forte inflammation pulmonaire qui peut conduire à une obstruction des bronches, à un remodelage des voies respiratoires et au développement d'une hyperréactivité bronchique [58, 63, 111]. De plus, des études chez l'humain et chez l'animal tendent à démontrer que les infections virales sévères survenant en bas âge peuvent prédisposer les enfants à développer de l'asthme plus tard durant leur vie [37, 91, 111, 170].

6. Caractéristiques génomiques du hMPV

6.1 Classification du hMPV

Les virus sont classifiés selon leur morphologie (nucléocapside, enveloppe), leur composition chimique et leur mode de réplication (ADN, ARN, double brin, simple brin, polarité, génome segmenté ou non). Le hMPV, étant un virus enveloppé, non-segmenté, dont le génome est constitué d'un ARN simple brin de polarité négative, appartient donc à la famille des *Paramyxoviridae*. De par ses caractéristiques virologiques, son organisation génomique et aussi son homologie de séquence avec l'autre membre connu du genre *Metapneumovirus* : le metapneumovirus aviaire (aMPV) (figure 4), le hMPV fait partie de la sous-famille des *Pneumovirinae*, genre *Metapneumovirus*.

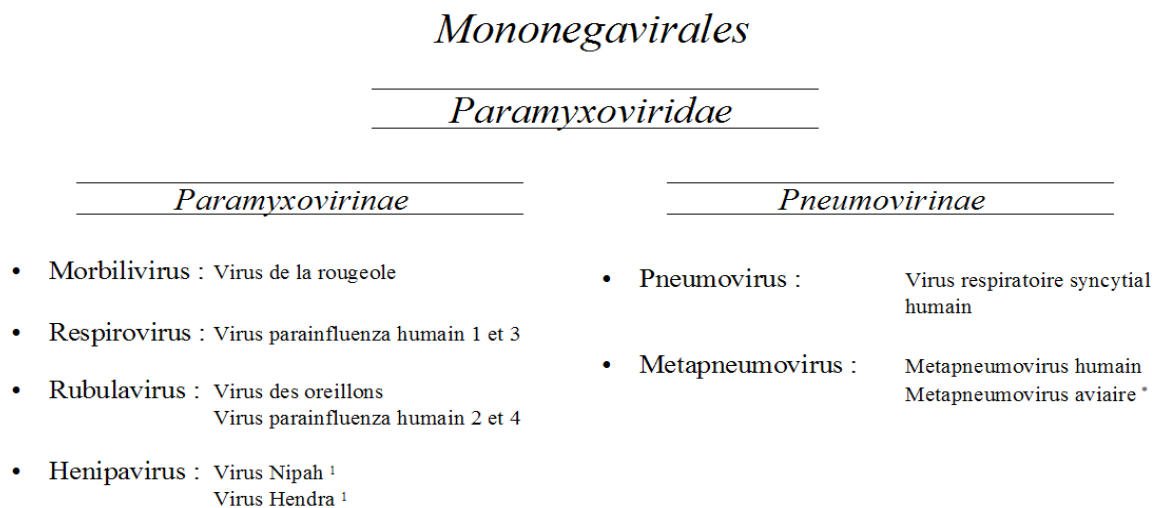


Figure 4. Classification des virus de la famille des *Paramyxoviridae* causant des infections chez l'humain. ¹ Les virus Nipah et Hendra peuvent causer des zoonoses chez l'humain. * Le metapneumovirus aviaire est le seul autre représentant avec le hMPV du genre *Metapneumovirus*.

6.2 Organisation génomique

La séquence complète de plusieurs (7) souches de hMPV sont maintenant disponibles sur le site du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>) dont des souches canadiennes et néerlandaises représentatives des 4 sous-groupes majeurs : (A1) NL00-1 (GenBank AF371337), (A2) CAN97-83 (GenBank AY297749), (B1) NL99-1 (GenBank AY525843)

et (B2) CAN98-75 (GenBankAY297748). Des analyses approfondies de ces séquences ont permis de déterminer l'organisation génomique du hMPV et de confirmer sa classification en tant que membre du genre *Metapneumovirus* de par sa très forte homologie avec le aMPV [231, 232]. Le aMPV est un virus respiratoire infectant principalement les poulets et dindes d'élevage ainsi que certains oiseaux sauvages [77, 197, 231, 232]. Plusieurs sous-types de aMPV ont été décrits (A, B, C et D) et circulent dans différentes régions du monde. Le hMPV est d'ailleurs phylogénétiquement plus rapproché du aMPV de type C qui circule principalement aux États-Unis [36]. Le hMPV diffère du hRSV par l'absence des gènes NS1 et NS2 à l'extrémité 3' du génome et par l'ordre des gènes SH, G, F et M2 (figures 5 et 6). L'absence des gènes NS1 et NS2 dans le génome du hMPV pourrait indiquer que ces virus possèdent des mécanismes différents pour interférer avec la réponse immunitaire innée et acquise, les produits des gènes NS1 et NS2 étant des antagonistes de la réponse induite par l'IFN de type I [77, 141, 220]. De plus, le génome du hRSV contient environ 15 kb contre environ 13,3 kb pour le hMPV et le aMPV [36, 77, 231].

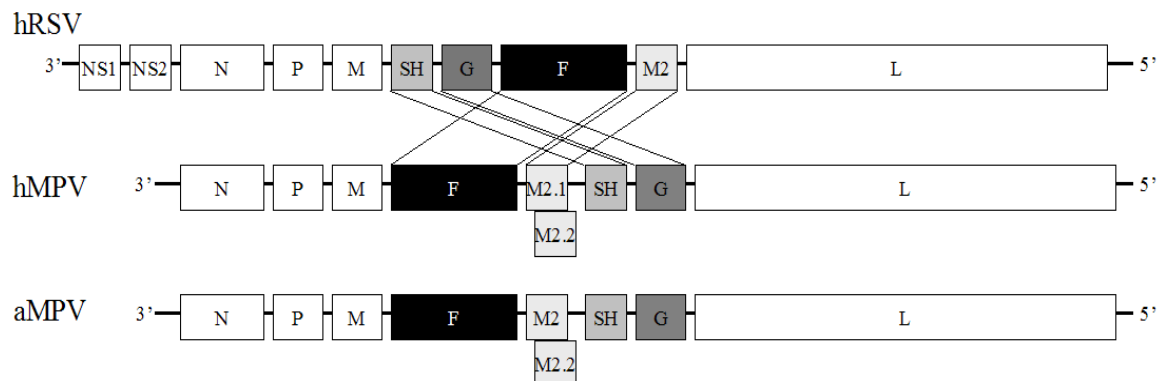


Figure 5. Comparaison de l'organisation génomique des virus appartenant au genre *Pneumovirus* (hRSV) et au genre *Metapneumovirus* (hMPV et aMPV).

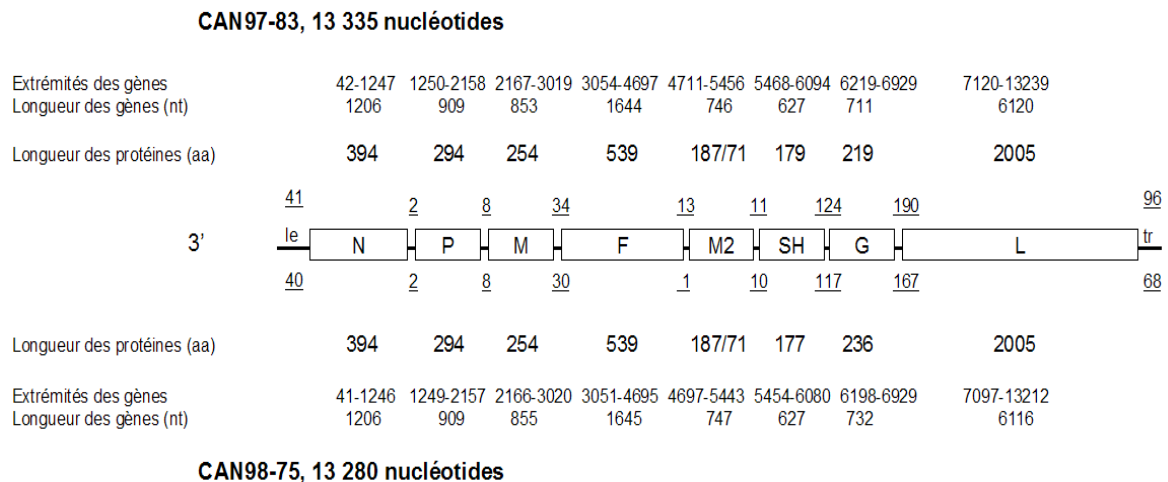


Figure 6. Organisation génomique détaillée de deux souches de hMPV représentant les deux génotypes : A (CAN97-83) et B (CAN98-75). La longueur des gènes suivants est représentée : nucléoprotéine (N), phosphoprotéine (P), protéine de la matrice (M), protéine de fusion (F), les protéines M2, petite protéine hydrophobe (SH), glycoprotéine d'attachement (G) et polymérase (L) [24].

6.3 Hétérogénéité des souches de hMPV

Les souches de hMPV peuvent être classées en deux grands groupes : A et B. Chaque groupe est également sous-divisé en deux groupes : A1, A2, B1 et B2. Cette classification est basée sur l'identité de séquence de plusieurs gènes entre les différentes souches de hMPV. Les gènes principalement utilisés pour cette classification sont les gènes P, F et G. L'identité de séquence entre les groupes A et B est environ de 80% au niveau nucléotidique et 90% au niveau protéique. A l'intérieur d'un sous-groupe, l'identité de séquence (nucléotides) est très forte, généralement de 97 à 100% [19, 24, 31, 161, 197, 234]. Toutefois, de plus en plus d'études proposent une subdivision à l'intérieur du sous-groupe A2 : A2a et A2b, basée sur la séquence des gènes N et F [41, 93, 120, 156] et à l'intérieur du sous-groupe A1 : A1a et A1b, basée sur la séquence du gène G [18]. De même, une équipe proposait récemment une subdivision du sous-groupe B2 en B2a et B2b basé sur le gène F [42]. De plus, une nouvelle souche de hMPV rapportée en 2004 diffère passablement des représentants des sous-groupes décrits actuellement et cette souche serait évolutivement plus près du sous-groupe B1 [208]. La diversité génétique des souches de hMPV implique que le choix des amorces PCR pourrait nuire à la détection de certains sous-groupes dont les séquences sont plus divergentes et biaiser la prévalence d'un sous-

groupe par rapport aux autres. La classification exacte des souches de hMPV semble donc être encore incomplète (figure 7).

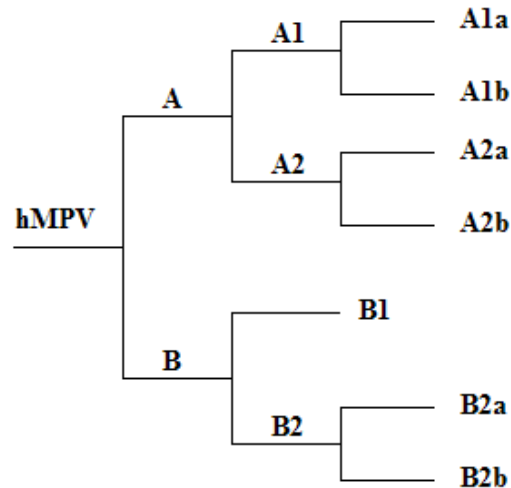


Figure 7. Représentation schématique de l'hétérogénéité des souches de hMPV. Les 2 génotypes (A et B) sont représentés ainsi que les sous-groupes proposés jusqu'à maintenant : A1a, A1b, A2a, A2b, B1, B2a et B2b.

En ce qui concerne un lien entre un génotype donné et un niveau de pathogénicité plus élevé (infections plus sévères), certaines études tendent à démontrer qu'il existe, et que le génotype A serait associé à une plus forte virulence [84, 241], tandis que d'autres équipes suggèrent qu'il n'y aurait aucune différence de sévérité entre les deux génotypes [3]. De plus, il a été proposé que ce serait plutôt une charge virale élevée qui serait associée aux infections des voies respiratoires inférieures [93].

La co-circulation de plusieurs sous-groupes durant une même saison d'activité n'est pas inhabituelle et est fréquemment rapportée [3, 84, 159, 160, 251]. De plus, l'alternance du génotype dominant entre les années pourrait être associée au développement d'une immunité contre le génotype majoritairement détecté durant l'année ou à une immunité pré-existante dans la communauté contre un sous-groupe donné [3, 84, 159, 160].

L'existence de sérotypes associés aux génotypes A et B demeure controversée. Ainsi, des études basées sur l'utilisation d'anticorps contre la protéine F du hMPV présentent des données contradictoires. Certaines équipes démontrent une réactivité différente entre les

deux génotypes, alors que d'autres rapportent une réactivité croisée entre les groupes [94, 191, 216]. De plus, une étude réalisée chez des enfants propose l'existence de quatre sérotypes associés aux sous-groupes A1, A2, B1 et B2 à la suite de l'analyse de séropositivité pour la protéine G du hMPV [81]. Certaines études chez l'animal suggèrent également l'existence de deux sérotypes de hMPV [233, 234], bien que des études de vaccination chez l'animal démontrent une protection croisée [39, 116, 117].

7. Les protéines virales

Le génome d'environ 13,3 kb du hMPV contient huit gènes qui codent pour un minimum de neuf protéines, dont plusieurs sont illustrées à la figure 8. Le tableau 1 présente la similarité de séquence entre les protéines du hMPV et celles d'autres membres de la famille des *Paramyxoviridae*, alors que le tableau 2 présente la longueur des cadres de lecture ouverts du hMPV comparativement à d'autres membres de la famille des *Paramyxoviridae*.

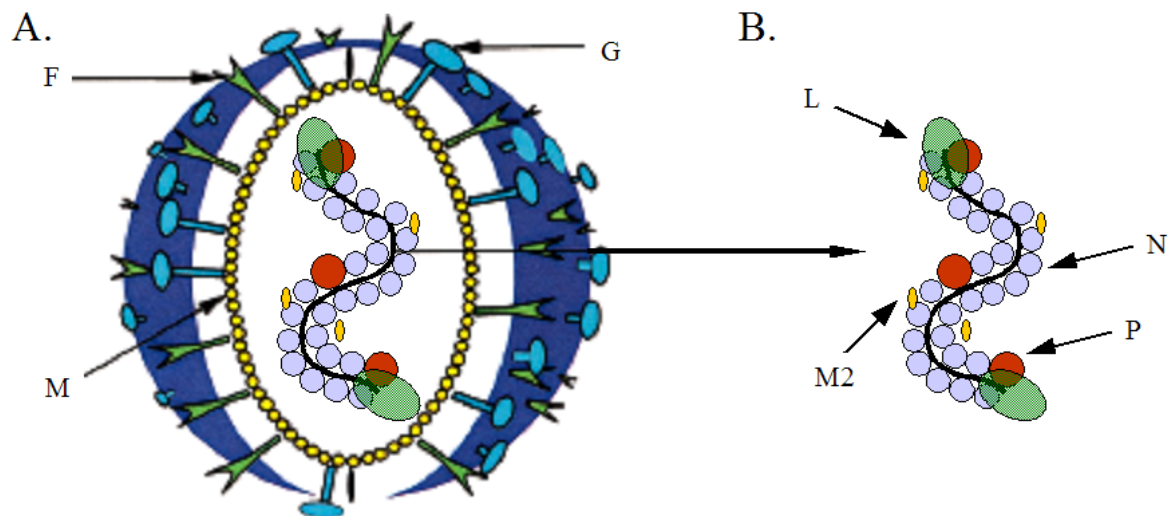


Figure 8. Représentation schématique d'une particule de hMPV. A) L'enveloppe virale constituée d'une membrane lipidique comprend 3 protéines de surface : la glycoprotéine d'attachement (G), la protéine de fusion (F) et la petite protéine hydrophobe (SH) (non illustrée). L'intérieur de l'enveloppe est tapissée de la protéine de matrice (M) et contient le génome viral. B) L'ARN viral (représenté au centre de A. et en B.) est associée à plusieurs protéines virales : la nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P), la polymérase (L) et possiblement les produits du gène M2. Adapté de [77].

Tableau 1. Identité de séquence des protéines du hMPV NL00-1 (A1) avec d'autres paramyxovirus. Metapneumovirus aviaire (aMPV) type A, B et C, Virus respiratoire syncytial (hRSV) A et B, Pneumovirus des souris (PVM). ND : séquence non disponible. Les protéines SH et G n'ont pas pu être alignés dû à trop grande divergence de séquence. Adapté de [231].

	N	P	M	F	M2.1	M2.2	L
aMPV A	69	55	78	67	72	26	64
aMPV B	69	51	76	67	71	27	ND
aMPV C	88	68	87	81	84	56	ND
hRSV A	41	24	38	33	36	18	44
hRSV B	41	23	37	33	35	19	44
PVM	45	22	38	38	34	12	ND

Tableau 2. Longueur des cadres de lecture ouverts du hMPV A et B comparativement à d'autres paramyxovirus : Metapneumovirus aviaire (aMPV) type A, B et C, Virus respiratoire syncytial (hRSV) A et B, Pneumovirus des souris (PVM). ND : séquence non disponible. Adapté de [231] et GenBank AY297748 (hMPV B).

	N	P	M	F	M2.1	M2.2	SH	G	L
hMPV A	394	294	254	539	187	71	183	236	2005
hMPV B	394	294	254	539	187	71	177	236	2005
aMPV A	391	278	254	538	186	73	174	391	2004
aMPV B	392	278	254	538	186	73	ND	414	ND
aMPV C	394	294	254	537	184	71	ND	ND	ND
hRSV A	391	241	256	574	194	90	64	298	2165
hRSV B	391	241	256	574	194	90	65	299	2165
PVM	393	295	257	537	176	98	92	396	ND

7.1 Glycoprotéines de surface

Le hMPV présenterait trois protéines virales transmembranaires à sa surface : la protéine de fusion (F), la glycoprotéine d'attachement (G) et la petite protéine hydrophobe (SH). L'enveloppe du hMPV est constituée d'une double couche lipidique dérivée de la membrane plasmique de l'hôte.

7.1.1 Protéine de fusion (F)

La protéine de fusion du hMPV est la protéine effectrice de l'entrée du virus dans la cellule hôte. L'ARNm contient 1620 nucléotides et la protéine est composée de 539 acides aminés. La protéine de fusion du hMPV est caractéristique des protéines transmembranaires de type I puisque sa portion C-terminale est encreée dans la membrane alors que l'extrémité N-terminale interagit avec l'environnement extracellulaire. La protéine F est initialement produite sous une forme polypeptidique inactive F0 qui doit être clivée en sous-unités F1 et F2 pour être fonctionnelle et induire la fusion. Cette protéine contient une séquence de reconnaissance (résidus RQSR) pour une protéase cellulaire mais, contrairement au hRSV, la protéine de fusion du hMPV ne contient qu'un seul site de clivage, situé tout juste avant le peptide de fusion [231]. L'emplacement de ce site de clivage est toutefois conservé entre les membres de la famille des *Paramyxoviridae*. Lorsque clivés, les deux segments de la protéine de fusion sont maintenus à proximité par la présence de ponts disulfures qui se forment possiblement entre les deux résidus cystéines retrouvés dans la sous-unité F2 et certains des 12 résidus cystéines retrouvés dans la sous-unité F1. La distribution des résidus cystéines de la protéine F du hMPV est d'ailleurs très semblable à celle des autres paramyxovirus. La protéine de fusion du hMPV contiendrait également trois sites potentiels de N-glycosylation. La masse théorique de la protéine F sur un gel SDS-PAGE est de 58.4 kDa. La sous-unité F1 de la protéine de fusion du hMPV comprend la majorité des domaines indispensables à son activité : le peptide de fusion en N-terminal, deux domaines d'acides aminés répétés (HRA et HRB) et le domaine d'encrage dans la membrane suivi par le domaine cytoplasmique en C-terminal. La sous-unité F2 contient le peptide signal en son extrémité N-terminale [231] (figure 9).

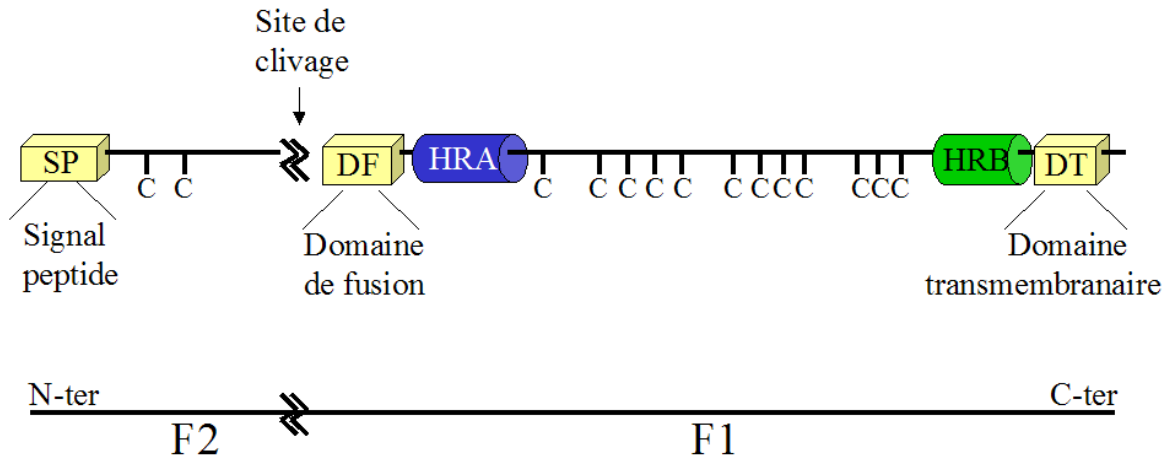


Figure 9. Représentation schématique de la protéine de fusion du hMPV. C : représente les résidus cystéines présents sur les deux sous-unités (F1 et F2) de la protéine de fusion.

Les domaines HRA et HRB de la protéine de fusion ont la propriété de pouvoir former des hélices α (figure 10) puisqu'ils sont constitués d'une répétition de sept acides aminés identifiés *a-b-c-d-e-f-g*, où *a* et *d* sont généralement des acides aminés hydrophobes et *e* et *g* sont généralement des acides aminés chargés et opposés permettant la formation de ponts salins stabilisés par des interactions électrostatiques. Cette nomenclature *a* à *g* correspond à la position des acides aminés dans l'hélice. Lorsque deux hélices α s'enroulent l'une autour de l'autre, cela crée une structure nommée « coiled coil ». Les acides aminés hydrophobes d'une hélice se regroupent ensemble vers l'intérieur de celle-ci, mais interagissent également avec les autres acides aminés *a* et *d* appartenant aux hélices avoisinantes, créant ainsi une structure en superhélice (supercoil) très stable. L'intérieur de cette superhélice contient donc principalement des acides aminés hydrophobes qui stabilisent la structure alors que l'extérieur, qui est exposé au milieu extracellulaire, contient majoritairement les acides aminés polaires (hydrophiles) [34].

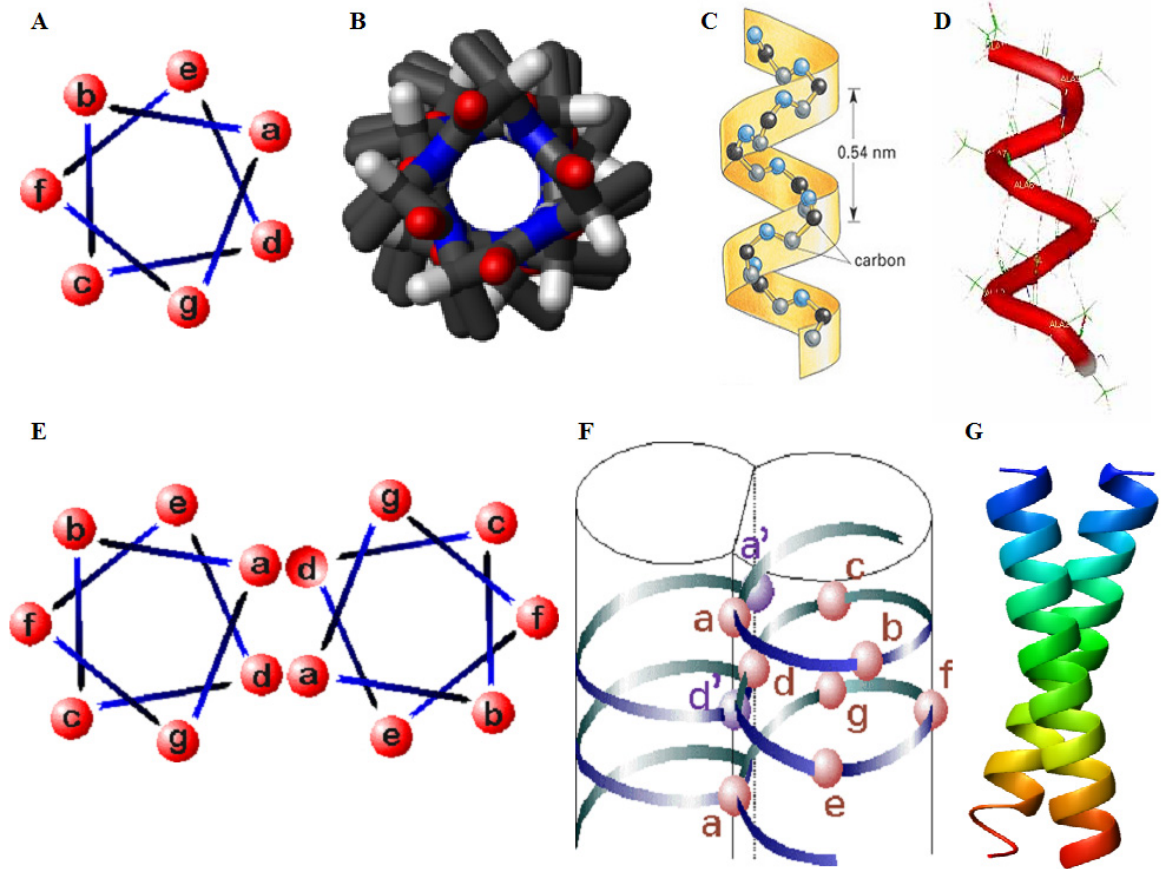


Figure 10. Représentation d'une hélice α . (coiled coil). A) Emplacement des acides aminés dans l'hélice; B) hélice vue du dessus; C) et D) hélice vue de côté avec différentes façons de représenter les acides aminés; E) et F) interaction entre deux hélices au niveau des acides aminés *a* et *d*; G) illustration d'un « coiled coil ». Adapté de [34].

Ces domaines HRA et HRB sont donc essentiels à la fonction de cette protéine de fusion chez le hMPV. À la surface du virion, les protéines de fusion des paramyxovirus se retrouvent normalement sous forme d'homotrimère et la superhélice contient alors trois hélices α [172]. Une superhélice peut également être constituée de six hélices α et elle devient une structure très stable [178]. La structure s'avère plus importante que la séquence exacte pour la fonction des protéines de fusion [34]. La similarité de séquence entre les protéines F des deux génotypes de hMPV est plus grande au niveau des acides aminés comparativement au niveau nucléotidique, ce qui suggère une conservation dans la fonction de cette protéine ou de ses propriétés immunologiques [28]. D'ailleurs, la protéine F serait le déterminant antigénique majeur pour le hMPV [151, 215, 216].

7.1.2 Glycoprotéine d'attachement (G)

La glycoprotéine d'attachement (G) du hMPV est considérablement plus courte (236 acides aminés) que celle du hRSV (298-299 acides aminés) quoique le gène G du hMPV contiendrait d'autres cadres de lecture ouverts potentiellement exprimés [130, 231]. Certaines souches de hMPV présentent également des longueurs variables de protéine G [18, 159, 196]. La séquence de cette protéine chez le hMPV ne présente d'ailleurs pas de similarité avec les protéines G des autres paramyxovirus [231]. Le profil d'hydrophobicité de la protéine G du hMPV révèle toutefois des caractéristiques similaires à celles des autres pneumovirus : l'extrémité N-terminale cytoplasmique est hydrophile et relativement courte, suivie d'un petit domaine hautement hydrophobe (site d'ancrage probable dans la membrane) puis d'une extrémité C-terminale externe généralement hydrophile [26]. Ces caractéristiques laissent présager qu'il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire de type II et suggèrent que la protéine G aurait une structure de type mucine fortement O- et N-glycosylée [26]. Puisque le poids moléculaire prédit de la protéine non-modifiée est de 23.7 kDa et qu'elle migre sur gel SDS-PAGE aux environs de 80 à 100 kDa, cela suggère que cette protéine est effectivement fortement glycosylée, offrant potentiellement au virus une voie de contournement du système immunitaire en recouvrant cette protéine virale de sucre provenant de l'hôte [26, 36, 231].

Cette protéine présente également une très grande variabilité génétique, majoritairement dans son domaine extracellulaire, un indicateur potentiel de la capacité du hMPV à déjouer le système immunitaire [81, 130, 159]. Bien que non-essentielle pour la réplication du hMPV *in vitro*, la protéine G semble jouer un rôle dans la réplication du hMPV *in vivo*, puisque la réplication des virus dépourvus en protéine G est fortement atténuée [13, 22, 26]. Une étude suggère que cette protéine est peu immunogénique puisqu'elle n'induit pas la production d'anticorps neutralisants et ne confère pas de protection aux animaux immunisés [215], alors qu'une autre équipe a, quant à elle, détecté la présence d'anticorps dirigés contre la protéine G dans des sérums de patients et propose même la présence de quatre sérotypes de hMPV [81].

De plus, bien que la fonction de la protéine G semble être l'attachement du virus à la cellule cible, cette fonction ne lui est pas exclusive, puisque qu'un mutant dépourvu de protéine G

peut tout de même s'attacher à la cellule et fusionner en présence de la protéine F [26, 213]. De même, la capacité de réplication altérée d'un virus dépourvu de G pourrait suggérer un autre rôle pour cette protéine : une modulation de la réponse immunitaire innée par l'inhibition de la sécrétion de molécules pro-inflammatoires ou antivirales. D'ailleurs, une étude réalisée dans les cellules A549 démontre que la protéine G joue un rôle dans la régulation de la voie de signalisation de cytokines, chimiokines et d'IFN de type I via une inhibition de RIG-1, un senseur viral cytoplasmique impliqué, entre autres, dans l'activation de NF- κ B [13].

7.1.3 Petite glycoprotéine hydrophobe (SH)

La petite protéine hydrophobe exprimée par le hMPV est une glycoprotéine transmembranaire de type II [231]. Le patron d'expression de cette protéine comprend potentiellement trois formes : une forme non-glycosylée, une forme N-glycosylée et une forme fortement glycosylée avec un poids moléculaire variant de 23 kDa à plus de 220 kDa sur gel SDS-PAGE. [12, 21, 26] La longueur de cette protéine est d'environ 177-183 acides aminés et elle ne présente aucune similarité de séquence avec les protéines des autres paramyxovirus, ce qui n'est pas surprenant puisque la séquence des protéines SH des paramyxovirus est peu conservée [26, 231]. La protéine SH serait potentiellement impliquée dans la modulation de l'activation de NF- κ B et aurait donc un effet inhibiteur sur la transcription des gènes cellulaires dépendant de NF- κ B, dont des cytokines et chimiokines [12]. L'activité inhibitrice de SH se traduit par une diminution de la phosphorylation de la protéine p65, qui doit normalement être phosphorylée pour activer NF- κ B [12]. De plus, la protéine SH est qualifiée de protéine accessoire, puisqu'elle n'est pas essentielle à la réplication du virus *in vitro* et que son absence ne semble pas non plus affecter la capacité répliquative du hMPV *in vivo* [12, 26]. Cette protéine n'aurait donc aucun rôle essentiel à jouer dans l'entrée ou l'attachement du virus à la cellule cible [26].

7.2 Protéines structurales

7.2.1 Protéine de matrice (M)

Le gène de la matrice (M) du hMPV est constitué de 765 nucléotides et code pour une protéine de 254 acides aminés dont la masse moléculaire théorique est de 27.6 kDa [19]. La protéine M du hMPV possède, à son extrémité N-terminale, un domaine conservé chez tous les pneumovirus, alors que son extrémité C-terminale serait hydrophobe [19, 36, 77, 231]. Cette protéine serait localisée du côté intracellulaire de la membrane virale et interagirait potentiellement avec les protéines F et G [77]. Les protéines M des pneumovirus peuvent rendre la nucléoprotéine transcriptionnellement inactive avant l'assemblage viral et favoriser l'association entre le complexe de la nucléocapside et l'enveloppe virale lors du bourgeonnement [36, 77].

7.3 Protéines associées à la polymérase virale

Tel que démontré par les expériences de génétique inverse, les protéines N, P et L sont essentielles à la transcription et la réplication du hMPV alors que la protéine M2.1 n'est pas indispensable, bien qu'elle augmente la production virale [25, 38, 115]. Ces protéines forment le complexe de la polymérase et sont associées à l'ARN viral dans le virion [38, 77].

7.3.1 Nucléoprotéine (N)

Le gène de la nucléoprotéine (N) du hMPV contient 1185 nucléotides et code pour une protéine de 394 acides aminés dont le poids moléculaire est estimé à 43.5 kDa [19, 231]. La protéine N du hMPV contient également des séquences d'homologie avec les protéines N des autres pneumovirus [19, 231]. La nucléoprotéine fait partie intégrante du complexe de la nucléocapside et est aussi une composante essentielle du complexe de la polymérase virale [36, 77]. La protéine N est étroitement liée à l'ARN viral et est indispensable à sa réplication, transcription et encapsidation. Elle est d'ailleurs requise pour la production de particules virales à partir des systèmes de génétique inverse [25, 115]. C'est cette protéine qui confère à l'ARN viral sa structure en hélice. Cette protéine semble également interagir avec la phosphoprotéine (P) [77].

7.3.2 Phosphoprotéine (P)

Le gène de 885 nucléotides correspondant à la phosphoprotéine (P) code pour une protéine de 294 acides aminés dont la masse moléculaire serait de 32.5 kDa [19]. Beaucoup de résidus prolines sont retrouvés dans la moitié N-terminale de la protéine P alors que l'extrémité C-terminale est riche en résidus chargés (dont le glutamate), une caractéristique retrouvée chez tous les pneumovirus [19, 231]. La région comprenant les acides aminés 171-226 représente aussi un domaine fortement conservé parmi les protéines P des pneumovirus. Cette région jouerait un rôle dans le processus de synthèse d'ARN, ou serait responsable du maintien de l'intégrité du complexe de la nucléocapside ou de l'interaction avec la polymérase virale dans le complexe de répllication et transcription [77, 231]. La portion amino-terminale de cette région contient une séquence d'acides aminés répétés qui est fréquemment associé à la formation d'hélices- α et de superhélices [19].

7.3.3 Facteur d'élongation de la transcription (M2.1)

Le gène M2 est unique aux membres de la sous-famille des *Pneumovirinae* et la présence de deux cadres de lecture ouverts (M2.1 et M2.2) est confirmée chez tous les pneumovirus. Le gène M2.1 code pour une protéine de 187 acides aminés potentiellement impliquée dans le complexe de répllication en tant que facteur de processivité de la polymérase virale [231]. La protéine M2.1 du hMPV semble d'ailleurs être incorporée dans le virion. Les protéines M2.1 des pneumovirus contiennent toutes un motif en doigt de zinc Cys/His conservé [38]. La présence de la protéine M2.1 n'est pas essentielle pour la répllication du hMPV *in vitro* alors que l'absence de cette protéine empêche toute répllication virale dans l'animal, ce qui suppose un rôle essentiel de la protéine M2.1 dans une infection *in vivo* [38]. La perte d'expression de la protéine M2.1 ne semble toutefois pas affecter la production d'ARNm complets ni modifier la fréquence de lecture continue [38].

7.3.4 Facteur de régulation de la synthèse d'ARN (M2.2)

La protéine M2.2 du hMPV est constituée de 71 acides aminés [231]. Cette protéine semble établir un équilibre entre la transcription et la répllication du hMPV. La délétion de la protéine M2.2 provoque une augmentation de l'expression et une accumulation de protéines virales *in vitro*. Par contre, l'augmentation de la quantité de transcrits chez un

mutant dépourvu de M2.2 n'est pas accompagné d'une augmentation de la quantité de protéines virales, ni d'ARN génomique, ni d'un plus haut titre viral *in vivo* [38, 206]. En fait, la fonction de la protéine M2.2 n'apparaît pas essentielle pour la réplication du hMPV *in vivo*, bien qu'un mutant ne contenant pas cette protéine soit hautement atténué, suggérant un rôle pour cette protéine dans la réplication virale chez l'animal [22, 38, 206]. En plus de ce rôle de régulation de la transcription, cette protéine influencerait la fidélité de la polymérase durant la réplication virale, puisque l'absence de la protéine M2.2 augmente la survenue de mutations ponctuelles et l'insertion de nucléotides U dans les régions de poly-U au niveau de l'ARN génomique [206]. La protéine M2.2 ne semble pas impliqué dans le développement d'une réponse immunitaire, puisque l'absence de cette protéine n'influence pas l'immunogénicité ni l'effet protecteur du candidat vaccinal mutant [22, 38].

7.3.5 La sous-unité majeure de la polymérase (L)

Le gène de la polymérase (L) du hMPV est le plus long gène de ce virus avec 6018 nucléotides. Ce gène code pour une protéine de 2005 acides aminés qui contient les six domaines conservés chez les virus ARN non-segmentés de polarité négative, dont certains sont associés à l'acquisition d'une conformation active. C'est dans le domaine III que se trouvent normalement les quatre motifs centraux (A, B, C et D) qui semblent essentiels aux fonctions de la polymérase. De plus, la polymérase du hMPV contient une séquence correspondant au motif consensus de liaison à l'ATP [36, 77, 231]. Cette protéine L ainsi que les protéines P, M2.1 et M2.2 font parties du complexe ARN polymérase ARN-dépendante responsable de la transcription et de la réplication du hMPV. La protéine L pourrait également être responsable de la méthylation de l'ARN et de l'ajout de la coiffe aux ARNm [36, 77].

8. Le cycle viral

Toutes les étapes du cycle de réplication du hMPV n'ayant pas encore été étudiées en profondeur, les descriptions suivantes sont principalement basées sur le principe de réplication des virus ARN non-segmentés de polarité négative [77].

8.1 Attachement du hMPV à sa cellule cible

Chez les virus enveloppés, dont font partie les paramyxovirus, l'entrée de la capsid virale se fait via l'attachement du virus à sa cellule hôte, suivi de la fusion de la membrane virale avec la membrane cellulaire. La première étape de l'infection par le hMPV consisterait donc en l'attachement du virus aux cellules cibles du poumon, c'est-à-dire principalement les cellules épithéliales ciliées [144]. Une étude récente suggère que l'intégrine $\alpha\beta 1$ servirait de récepteur pour l'attachement et l'entrée du hMPV dans la cellule cible [59]. La protéine virale responsable de l'attachement au récepteur peut être la même que celle permettant la fusion (protéine F) ou alors être une protéine distincte (glycoprotéine G par exemple). Dans le cas du hRSV, la sous-unité F2 de la protéine de fusion semble responsable du type de cellules ciblées spécifiquement alors que la protéine G faciliterait l'attachement du virus aux cellules de façon non-spécifique, probablement via une interaction avec les glycoaminoglycans retrouvés à la surface des cellules [212]. Ce pourrait être le cas pour le hMPV également puisque ce sont des virus très apparentés et que leurs protéines de fusion ont probablement une structure protéique similaire [231].

8.2 Fusion

Donc, une fois le virus attaché à la cellule cible, la protéine de fusion entre en jeu. Le domaine hydrophobe correspondant au peptide de fusion (extrémité N-terminale de la sous-unité F1) s'insère alors dans la membrane cellulaire (figure 11A). S'en suit une activation de la protéine de fusion et un changement de conformation de celle-ci via l'interaction des domaines HRA et HRB (figure 11B). Ces domaines qui sont sous une forme d'hélices α se regroupent en une superhélice formée de trois HRA au centre et trois HRB en périphérie, les trois HRB étant imbriqués de façon antiparallèle autour des HRA (figures 11C et 12). Cet interaction provoque le repliement de la protéine de fusion de façon à rapprocher la membrane virale suffisamment près de la membrane cellulaire pour permettre la fusion des membranes et la création d'un pore par lequel la nucléocapside qui contient le génome viral peut pénétrer dans la cellule hôte (figure 11D).

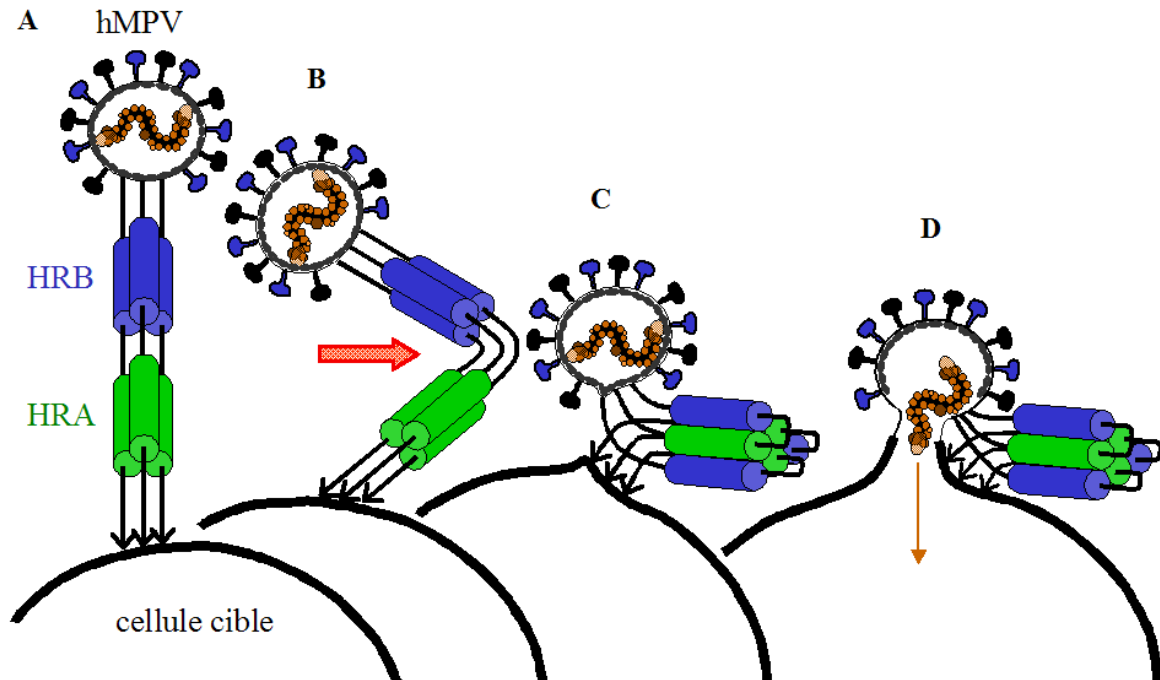


Figure 11. Illustration du mécanisme de fusion possiblement utilisé par le hMPV pour pénétrer dans la cellule hôte. Illustration personnelle adaptée de [54].

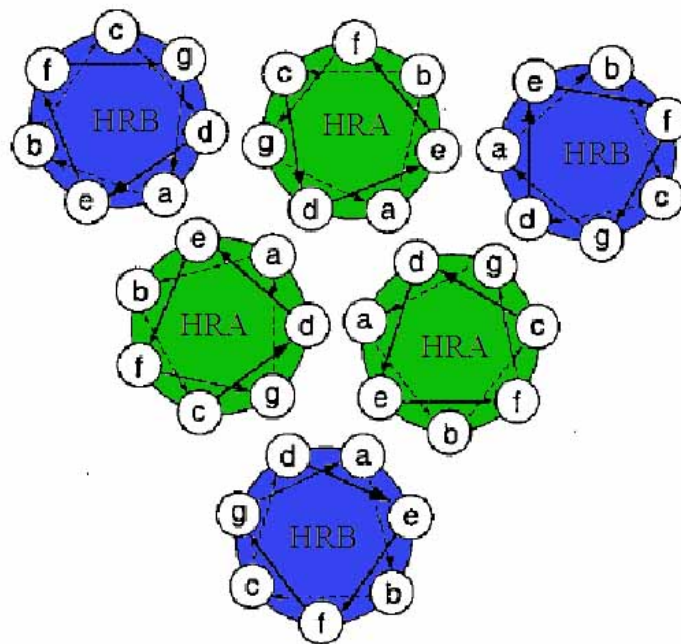


Figure 12. Interactions entre les trois HRA et les trois HRB. Adapté de [169].

8.3 Transcription et traduction

Étant donné que le hMPV ne requiert aucune étape nucléaire, tout le cycle répliatif se déroule dans le cytoplasme. Suivant l'entrée de la capsid virale dans le cytoplasme de la cellule hôte, une étape de décapsidation s'amorce pour permettre la transcription et la réplication du génome. La transcription de l'ARN génomique viral en ARNm requiert l'action des protéines N, P, M2 et L formant le complexe de la polymérase. La transcription du génome se fait à partir de l'extrémité 3' du génome par un processus linéaire, séquentiel et impliquant des événements d'arrêts-recommencements. Cette extrémité contient une séquence régulatrice correspondant au site d'entrée unique de la polymérase virale. La transcription est également guidée par de courts signaux de début et d'arrêt situés de part et d'autre des gènes viraux. Le signal situé en amont du gène dirige l'initiation de la transcription puisqu'il est reconnu par la polymérase virale. Le signal de terminaison de la transcription et de polyadénylation se trouve en aval des gènes viraux et contient une région riche en résidus AU impliquée dans l'ajout de la queue de polyA [77]. Les signaux de début et fin diffèrent entre les gènes et certains signaux de fin sont plus efficaces, induisant moins de transcription en continue. Par exemple, le signal de fin de transcription du gène F serait plus efficace que celui du gène M qui est associé avec de hauts niveaux de lecture continue vers les gènes situés en aval. Il y aurait donc plus d'ARNm correspondant à la protéine F que d'ARNm pour la protéine M [25]. À un certain moment durant le processus de transcription, les ARNm nouvellement synthétisés sont méthylés pour permettre l'ajout de la coiffe, assurant une reconnaissance par les ribosomes cellulaires. Lorsque le processus de transcription est complété, les ARNm sont relâchés puis pris en charge par la machinerie cellulaire pour être traduits. Durant le processus de transcription, seule une portion des polymérases effectue un balayage complet du génome viral, alors que les autres polymérases décrochent et réinitient la transcription au début du génome. Cela crée un gradient de transcription c'est-à-dire que les gènes situés à l'extrémité 3' sont transcrits de façon plus abondante que les gènes situés près de l'extrémité 5'. Il y a donc plus de protéines N produites que de protéines L par exemple [77].

8.4 Réplication

Le processus de réplication des paramyxovirus implique le complexe de la nucléocapside en tant qu'unité fonctionnelle, mais également l'action des protéines N, P et L. Les promoteurs situés à l'extrémité 3' responsables de la transcription et de la réplication se chevauchent, mais ne sont pas identiques. L'extrémité 5' du génome serait également impliquée dans le processus de réplication, puisque les régions 3' et 5' contiennent des séquences complémentaires permettant une association entre ces deux extrémités. Par contre, les extrémités du hMPV contiennent moins de nucléotides complémentaires que le hRSV ou l'aMPV [115]. En mode réplication, la polymérase lie l'extrémité 3' du génome et initie la synthèse d'ARN de novo produisant ainsi des brins d'ARN positif complets. Contrairement à l'étape de transcription, la polymérase ne décroche pas du génome durant la réplication de l'ARN. Les antigénomes ainsi produits vont servir de patron de réplication pour la synthèse de nouveaux brins d'ARN négatif par le complexe de la polymérase qui reconnaît l'extrémité 3' de cet antigénome et initie un nouveau cycle de synthèse d'ARN. Les facteurs essentiels à la transition entre la transcription et la réplication ne sont pas encore connus. Les protéines N et M2.2 pourraient toutefois avoir un rôle à jouer dans ce processus. Ce pourrait être l'accumulation de nucléoprotéines qui favoriserait le mode réplcatif ou encore l'action directe de la protéine M2.2 [38, 77, 206].

8.5 Assemblage et bourgeonnement

La transcription du génome viral a permis la production de nouvelles protéines virales dont les nucléoprotéines qui participeront à la formation des nouveaux virus. De même, la réplication virale a permis la synthèse de nouveaux brins d'ARN négatif pleine longueur. Les nucléoprotéines peuvent donc s'associer aux génomes viraux pour former des nouvelles nucléocapsides. Ces nucléocapsides, ainsi que les protéines nécessaires à la prochaine ronde de réplication virale, soit les protéines P, M2 et L, seront incorporées dans les virions. L'accumulation des protéines M pourraient être à l'origine du processus de bourgeonnement. Un complexe formé de la nucléocapside et de protéines M pourrait s'associer avec les segments intracellulaires des protéines de surface qui auraient cheminé du Golgi vers la face externe de la membrane lipidique de la cellule infectée. Les nouveaux virions peuvent ainsi bourgeonner et réinfecter d'autres cellules hôtes. Alternativement, la

dissémination de l'infection pourrait également être possible via la formation d'un syncytium, bien que peu données soient disponibles à ce sujet chez l'humain. En effet, une seule étude a rapporté la présence de cellules géantes multinucléées dans le lavage broncho-alvéolaire d'un patient infecté par le hMPV [238].

9. Diagnostic du hMPV

9.1 Culture virale

En 2001, les premières lignées cellulaires utilisées pour amplifier le hMPV *in vitro* ont été des cellules tertiaires de rein de singe (TMK) et des cellules de rein de singe Rhésus (LLC-MK2) [197, 232]. Aujourd'hui, les cellules Vero et Vero E6, des cellules provenant de rein de singe africain vert, sont également employées avec succès pour la plupart des souches [2, 25]. Les cellules BHK (cellules rein de bébé hamster) supportent également la croissance du hMPV ou, permettent du moins, la formation de syncytium suite à une infection; elles sont notamment utilisées dans les modèles de fusion [213]. Une faible réplication du hMPV dans les cellules HEP-2 (cellules humaines de carcinome du larynx) peut être détectée par PCR, malgré l'absence d'effets cytopathiques (ECP) visibles [69]. De plus, la majorité des souches de hMPV requièrent l'ajout de trypsine dans le milieu de culture pour favoriser la réplication virale et atteindre des titres viraux suffisamment élevés pour permettre l'apparition d'ECP [23, 25, 69, 207]. La culture virale à partir d'échantillons cliniques est fastidieuse et peut nécessiter jusqu'à 21 jours pour observer des effets cytopathiques caractéristiques du hMPV (figure 13). Ces effets correspondent généralement à un arrondissement des cellules qui deviennent également plus réfringentes, suivi du décollement du tapis cellulaire infecté. L'apparition d'amas de cellules d'aspect granuleux et de forme irrégulière, qui se détachent très facilement peut également être observé. Certaines souches présentent la particularité d'induire la formation de syncytia (figure 13C). Le syncytium est le résultat d'une fusion cellulaire entre une cellule infectée par le hMPV et des cellules avoisinantes, infectées ou non, ce qui engendre l'apparition de cellules géantes multinucléées. La formation de syncytia offre l'avantage au virus de se propager directement d'une cellule à l'autre sans passer par les étapes du bourgeonnement suivi de l'attachement et de la fusion à la nouvelle cellule cible.

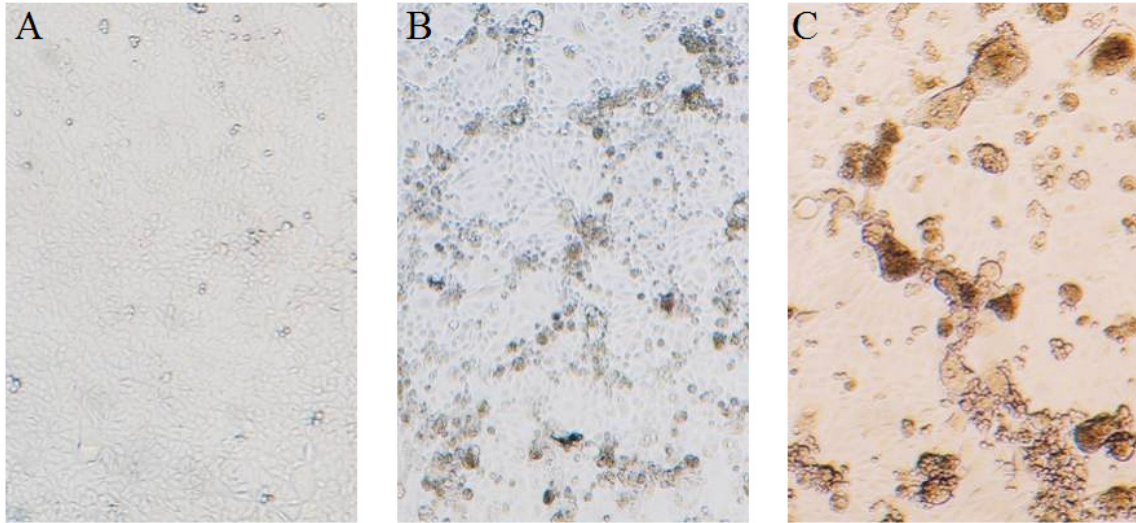


Figure 13. Photographies de A) cellules LLC-MK2 non-infectées, B) cellules LLC-MK2 infectées avec une souche de hMPV ne produisant pas de syncytium, C) cellules LLC-MK2 infectées par une souche de hMPV produisant beaucoup de syncytia.

9.2 Détection et quantification de l'ARN viral par RT-PCR

La détection du hMPV par RT-PCR en temps réel permet de détecter la présence du hMPV même en très faible quantité dans des échantillons respiratoires, tels que des lavages broncho-alvéolaires, des aspirations nasopharyngées et des écouvillons nasaux. C'est une méthode très efficace bien que le choix des amorces PCR soit le facteur limitant puisqu'il existe au minimum quatre sous-groupes de hMPV. Ces amorces doivent être choisies dans des régions conservées parmi tous les groupes, par exemple les gènes N, P, F et L. Les amorces spécifiques pour le gène N du hMPV semblent les plus sensibles et permettent la détection des deux génotypes [57, 165]. De plus, le séquençage des amplicons obtenus permet de discriminer entre les différents génotypes circulant durant l'année. La RT-PCR demeure la technique la plus rapide, spécifique et sensible pour la détection du hMPV [70]. La PCR en temps réel offre également la possibilité de déterminer le nombre de copies de virus dans un échantillon respiratoire [93, 146].

9.3 Détection antigénique

La détection d'échantillons positifs pour le hMPV peut être effectuée rapidement par immunofluorescence à l'aide d'anticorps spécifiques au hMPV. Les antigènes viraux

peuvent également être détectés par la technique ELISA [145] ou par immunoprécipitation [136]. La détection par immunofluorescence directe ou indirecte peut être effectuée à partir d'échantillons respiratoires tels que des aspirations nasopharyngées ou à partir de cultures virales présentant un ECP. Les anticorps utilisés dans ces essais peuvent être polyclonaux ou monoclonaux, et ces derniers ciblent généralement la protéine N ou M du hMPV. Cependant, ces tests sont généralement moins sensibles que la PCR, bien qu'ils soient relativement rapides à exécuter et peu dispendieux [9, 70, 122, 129, 149, 167, 195]. Il est possible de différencier les deux génotypes de hMPV par immunofluorescence à l'aide d'anticorps monoclonaux [94].

9.4 Sérologie

La détection d'anticorps contre le hMPV dans les sérums de patients se fait par immunofluorescence [80, 124, 252], ELISA [106, 151, 154], immunobuvardage [123] ou essais de neutralisation virale [232]. Les tests sérologiques développés pour le hMPV emploient des cellules infectées ou encore des protéines virales recombinantes. Ce type de test n'offre toutefois qu'un diagnostic rétrospectif puisque l'apparition d'anticorps survient plusieurs jours et même des semaines après l'infection initiale [187]. Il faut donc constater une séroconversion ou une montée significative des titres d'anticorps (>4x) à partir de deux sérums prélevés à 2-3 semaines d'intervalle [70].

10. Pathogenèse et modèles animaux

Des modèles d'infection chez les petites animaux (hamster, rat du coton, souris, furet) ainsi que chez les primates (chimpanzés, macaques cynomolgus, singe rhésus, singe africain vert) ont été développés et se révèlent fort utiles pour l'étude de la pathogenèse du virus, mais aussi pour la mise au point de vaccins et de molécules thérapeutiques.

10.1 Les petits animaux

Plusieurs petits animaux ont été évalués pour leur capacité à supporter une infection par le hMPV : le hamster, la souris BALB/c, le rat du coton et le furet, mais des symptômes et signes de la maladie sont apparents seulement chez la souris BALB/c et consistent en un

pelage hérissé, de la léthargie, de la difficulté à respirer et une perte de poids. La réplication du hMPV dans ces modèles animaux atteint un sommet 4 à 5 jours après l'administration intranasale d'une grande quantité (10^5 - 10^6 TCID₅₀) de virus [63, 112]. Ces modèles animaux ont permis de mieux caractériser la pathogenèse du hMPV en décrivant l'induction de cytokines, l'apparition d'anticorps dans le sérum, la présence d'infiltrats cellulaires autour et à l'intérieur des alvéoles, le type d'inflammation associé au hMPV et la présence d'obstruction des voies respiratoires [63, 103, 112]. Ces modèles démontrent également la persistance de l'infection par le hMPV jusqu'à 2-3 semaines suivant l'inoculation du virus par culture et jusqu'à 70 jours au moins par RT-PCR [6, 111, 112]. De plus, ces modèles démontrent la présence d'une hyperréactivité bronchique suivant l'infection par le hMPV et suggère un lien possible entre une primo-infection sévère et le développement d'asthme [111].

L'infection de souris BALB/c par le hMPV induit une forte réplication virale qui atteint un sommet au jour 5. L'analyse histopathologique des poumons de souris démontre une importante inflammation alvéolaire (caractérisée par la présence de cellules inflammatoires dans les alvéoles) et interstitielle (caractérisée par un épaissement de la paroi alvéolaire), accompagnée d'une forte induction de MIP-1 α , d'IL-4, d'IFN- γ et de RANTES au pic de réplication. Les souris infectées présentent également une altération de leur fonction pulmonaire, c'est-à-dire une obstruction importante des voies respiratoires et une hyper-réactivité bronchique, qui persiste jusqu'au jour 70 post-infection [111, 112].

10.2 Les primates non-humains

Les macaques cynomolgus, les chimpanzés, les singes rhesus ainsi que les singes africains verts représentent des modèles d'infection expérimentale par le hMPV très intéressants, puisqu'ils sont évolutivement plus près de l'humain que les petits animaux.

Chez le macaque, la réplication du hMPV a été détectée dans les voies respiratoires supérieures et inférieures avec un pic d'excrétion au jour quatre et l'élimination complète du virus au dixième jour. Les voies respiratoires présentent une perte des cils vibratils, de l'inflammation, une désorganisation de l'épithélium et une accumulation de macrophages et neutrophiles dans les alvéoles et les bronchioles. Le hMPV se retrouverait principalement à

la surface apicale des cellules épithéliales ciliées chez ces macaques. Ce modèle d'infection a aussi permis de démontrer que le hMPV se réplique uniquement au niveau des voies respiratoires et n'est retrouvé dans aucun autre organe [144]. De plus, l'infection avec 10^7 TCID₅₀ de hMPV induit une réplication virale, une séroconversion et une production d'anticorps neutralisants. Suite à cette infection, l'immunité semble plus forte contre une souche de hMPV homologue comparativement à une souche hétérologue. Par contre, l'immunité est transitoire puisqu'elle disparaît rapidement, c'est-à-dire que huit mois suivant l'infection initiale, les niveaux d'anticorps protecteurs sont devenus indétectables [233].

Des chimpanzés testés pour la présence d'anticorps dirigés contre le hMPV ont révélé une séroprévalence de 61 %, ce qui suggère que les chimpanzés puissent être infectés par leurs gardiens humains et/ou qu'il pourrait y avoir transmission d'un animal à l'autre [216]. Cela suggère qu'il n'y aurait pas de barrière d'espèce entre l'humain et le chimpanzé dans le cas du hMPV [211]. Bien que les chimpanzés séronégatifs inoculés avec $10^{5.2}$ TCID₅₀/mL de virus aient démontrés des signes de la maladie c'est-à-dire un rhume léger et de la toux, les titres de hMPV obtenus dans les voies respiratoires se sont avérés faibles. Les chimpanzés infectés ont tout de même développé une réponse immunitaire robuste, ce qui en fait également un bon modèle animal [216].

Les singes rhesus, quant à eux, ne permettent qu'une très faible réplication virale et ne démontrent aucun signe de maladie, mais ils développent tout de même des anticorps neutralisants efficaces contre les deux génotypes de hMPV [162, 216].

Par contre, chez le singe africain vert, la réplication du hMPV dans les voies respiratoires inférieures et supérieures est plus élevée, bien que les signes de la maladie soient absents. De plus, les titres d'anticorps neutralisants obtenus dans le sérum de ces animaux sont élevés. Chez ces singes, la cinétique de réplication du hMPV démontre que l'excrétion du virus dure plus de sept jours et que le pic de réplication se situe entre les jours cinq et sept dans les voies respiratoires inférieures. De même, les singes développent une protection croisée contre les deux génotypes A et B lors d'une immunisation avec le hMPV. Jusqu'à maintenant, le singe africain vert semble être un modèle primate non-

humain très prometteur pour l'évaluation de la réplication du hMPV, de la réponse immunitaire qu'il déclenche et l'évaluation de candidats vaccinaux [162, 216].

11. Vaccins

La vaccination offre la possibilité de prévenir les infections causées par le hMPV et toutes les conséquences à long terme associées à une infection sévère des voies respiratoires. De plus, la population pourrait également tirer profit de la vaccination, puisque le nombre d'hospitalisations pour infections graves et pour exacerbations d'asthme et de MPOC chuterait, les visites chez le médecin et l'administration abusive d'antibiotiques diminueraient également. Idéalement, un vaccin efficace doit induire et maintenir un niveau d'anticorps neutralisants spécifiques dans la circulation sanguine, mais aussi au point d'entrée du virus, de même qu'une immunité cellulaire forte et spécifique. De plus, une voie d'immunisation intranasale serait idéale pour développer une immunité mucoale au niveau des voies respiratoires supérieures [35].

Malheureusement, la vaccination n'est pas sans faille et, dans le cas du hMPV, les groupes d'âge les plus susceptibles aux infections (les très jeunes enfants et les personnes âgées) sont également ceux qui répondent le moins bien à la vaccination [58, 142, 236]. De plus, les vaccins doivent être protecteurs pour tous les sérotypes de hMPV et donc cibler des régions hautement conservées. La vaccination s'accompagne parfois d'effets secondaires et la toxicité des adjuvants pose encore un problème aujourd'hui [4]. Finalement, le calendrier de vaccination et de rappels doit être bien respecté par la population afin d'assurer une efficacité maximale du vaccin. De même, le vaccin ne doit pas être administré trop précocément en raison d'une interférence avec les anticorps maternels transmis au bébé.

11.1 Types de vaccins

11.1.1 Virus inactivés

Relativement faciles à produire puisqu'ils sont stables et offrant l'avantage d'être incapable de se répliquer, les vaccins à base de virus inactivés représentent une option intéressante pour prévenir les infections causées par le hMPV chez les personnes âgées et les patients immunosupprimés puisqu'ils permettraient d'amplifier leur immunité existante sans risquer

de voir le virus se répliquer et causer une infection chez ces individus [118]. Ce type de vaccin ne semble toutefois pas sécuritaire chez les jeunes enfants infectés par un paramyxovirus puisque de graves effets indésirables ont été observés chez des enfants naïfs vaccinés avec un hRSV inactivé à la formaline lors de la campagne de vaccination menée à la fin des années 1960. Lorsque les enfants vaccinés ont contracté l'infection naturelle, ils ont développés une maladie beaucoup plus sévère que les enfants non-vaccinés et des décès ont même été rapportés [47, 89, 133, 138]. Il semble que cette réponse exagérée lors de l'infection naturelle suivant une immunisation avec un paramyxovirus inactivé soit due à une absence de production d'anticorps neutralisants associée à une forte induction d'une réponse immunitaire de type Th2 (figure 14) [66, 126, 188, 245]. Il est donc à craindre que le même phénomène soit observé chez les enfants suite à une immunisation avec un hMPV inactivé. Des études réalisées chez la souris et les primates ont d'ailleurs rapporté une maladie plus grave et de la mortalité chez les animaux vaccinés avec un virus inactivé comparativement aux animaux contrôles [67, 109]. De même, la réponse immunitaire engendrée par ce type d'immunisation semble aberrante et biaisée vers une réponse de type Th2 : présence d'infiltrats d'éosinophiles et augmentation de la production d'IL-4 et d'IL-5 entre autres [109]. Donc, dans le cas du hMPV, ce type de vaccin demeure encore difficilement envisageable pour une population pédiatrique naïve.

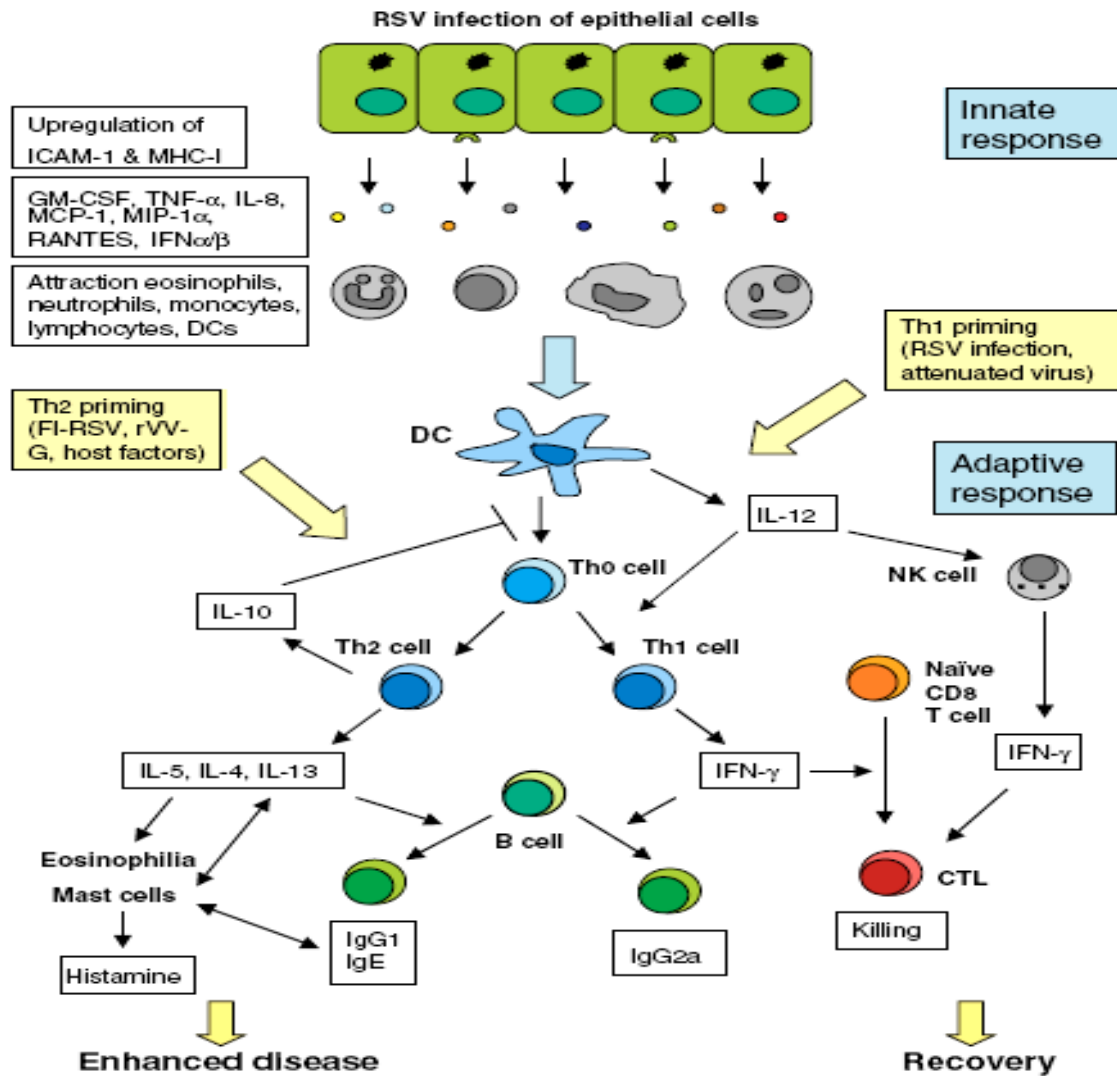


Figure 14. Le déséquilibre de la réponse immunitaire vers une réponse de type Th2 suite à l'administration d'un vaccin RSV inactivé serait responsable de l'aggravation de la maladie lors de l'infection naturelle subséquente [126].

11.1.2 Virus vivants atténués

Ce type de vaccin est basé sur une capacité faible du pathogène mutant à se multiplier chez l'hôte tout en conservant sa capacité d'induire une forte réponse immunitaire humorale et cellulaire protectrice. Le virus vivant atténué vient donc mimer une infection naturelle sans toutefois pouvoir entraîner une maladie. S'il est administré au niveau des voies respiratoires, le vaccin peut induire une production locale d'IgA. Ce sont d'ailleurs des vaccins plus efficaces et durables que les vaccins issus de virus inactivés, puisqu'ils ne sont

pas associés à une aggravation de la maladie lors de l'infection naturelle. Un problème important consiste à obtenir un niveau d'atténuation satisfaisant sans compromettre son immunogénicité [39]. De plus, un risque associé à ce type de vaccin réside en la possibilité de voir le virus atténué recouvrer sa virulence et devenir dangereux pour les personnes immunosupprimées. Actuellement, certains vaccins efficaces contre des paramyxovirus sont constitués de virus vivants atténués, comme pour les oreillons et la rougeole [121, 181]. Plusieurs vaccins de ce type sont actuellement en développement pour combattre le hMPV [118]. Les systèmes de génétique inverse permettent de produire des particules de hMPV dont certains gènes non-essentiels tels que SH, G ou M2 ont été délétés. Ainsi, certains virus conservent une capacité répliquative très élevée *in vitro* mais sont atténués *in vivo* tout en étant très immunogéniques, ce qui en font d'excellents candidats vaccinaux [22, 26, 39]. Des virus chimériques constitués de virus parainfluenza (PIV) bovin et humain exprimant une protéine du hMPV (habituellement la F) induisent la production d'anticorps neutralisants pour le hMPV et le hPIV [225, 226]. Un vaccin efficace doit également conférer une immunité croisée, c'est-à-dire être protecteur contre les souches homologues et hétérologues (virus appartenant aux groupes A et B). De même, une chimère constituée du hMPV mais dont les protéines N et P ont été remplacées par celle du aMPV permet une répllication efficace *in vitro* et est atténuée *in vivo*, ce qui en fait également un candidat vaccinal intéressant [199]. Toutefois, un vaccin constitué de virus vivants atténués s'est avéré inefficace et peu immunogène chez le macaque dû à son niveau d'atténuation trop élevé [119].

11.1.3 Vaccins peptidiques ou sous-unitaires

Une protéine virale ou un fragment de protéine virale peut être suffisant pour induire une réponse immunitaire adéquate tout en évitant les risques associés à l'utilisation de virus complet. De plus, de larges volumes de vaccins peuvent être produits rapidement. Par contre, plusieurs rappels peuvent être nécessaires pour obtenir un bon niveau de protection. Ce vaccin implique aussi que l'épitope ou les protéines responsables de la protection soient déjà connus. Dans le cas du hMPV, la principale protéine immunodominante est la protéine F [215, 216]. Des vaccins composés de la protéine F du hMPV se sont avérés protecteurs chez le hamster et le rat du coton [60, 117]. Cependant, un vaccin peptidique basé sur la

protéine de fusion du hMPV a induit, chez le macaque, la production d'anticorps spécifiques contre la protéine F et d'anticorps neutralisants ainsi qu'une réponse immunitaire cellulaire. La réponse humorale a toutefois rapidement décliné et les animaux n'étaient plus suffisamment protégés lors d'infections subséquentes [119]. Cela confirme que le déclin rapide de l'immunité anti-hMPV représente un problème majeur lors du développement de vaccins.

11.1.4 Vaccins à ADN

Le vaccin à ADN est basé sur l'administration d'un vecteur permettant l'expression de protéines virales qui seront alors exprimées par les cellules humaines, préférablement des cellules épithéliales pulmonaires, et reconnues par le système immunitaire. Les protéines virales sont ainsi exprimées sous leur forme naturelle. L'avantage majeur de ce type de vaccin réside dans la facilité de production à grande échelle et d'entreposage. Par contre, jusqu'à présent, les vaccins à ADN semblent peu immunogéniques chez l'humain [95]. Une seule étude portant sur la mise au point d'un vaccin à ADN pour le hMPV démontre que l'utilisation d'un vecteur exprimant la protéine F procure une faible protection et la production d'anticorps neutralisants n'est que temporaire [60].

12. Options thérapeutiques

Contrairement aux vaccins qui permettent de prévenir l'infection, les antiviraux peuvent traiter une infection virale active. Les molécules antivirales peuvent être à visée thérapeutique et/ou prophylactique. Plusieurs molécules efficaces contre le hRSV ont été évaluées pour leur potentiel antiviral contre le hMPV. Malheureusement, seules quelques molécules se sont avérées inhibitrices pour le hMPV : des préparations d'immunoglobulines, la ribavirine, l'héparine et le NMSO3 [253, 254]. Par contre, un nouvel anticorps monoclonal humanisé a été spécifiquement développé pour le hMPV [230].

12.1 Préparations d'immunoglobulines

Certaines préparations commerciales d'immunoglobulines destinées à une administration intraveineuse présentent un haut taux d'anticorps neutralisants pour le hMPV *in vitro* et

pourraient potentiellement être utilisées pour prévenir une infection par le hMPV chez certains individus, comme dans le cas du hRSV. Il semble toutefois y avoir certains risques liés à l'utilisation de ces immunoglobulines chez les enfants présentant une maladie cardiaque congénitale dû au large volume d'administration [253].

12.2 Ribavirine

La ribavirine est une molécule active contre un très large éventail de virus à ADN et à ARN [98, 190]. Le mode d'action de cette molécule n'est pas unique, c'est-à-dire que plusieurs mécanismes pourraient expliquer l'activité de la ribavirine contre cette multitude de virus. La ribavirine est, entre autres, reconnue comme étant un analogue synthétique des nucléosides (guanosine) sous sa forme triphosphate (GTP); elle pourrait donc interagir avec les polymérase virales en compétitionnant avec les nucléotides naturels. La ribavirine semble aussi pouvoir induire l'incorporation de mutations dans les génomes viraux et créer des erreurs fatales. La ribavirine aurait également des effets immunomodulateurs. Elle pourrait également interférer avec l'ajout de la coiffe aux ARNm. Sous sa forme monophosphate, la ribavirine semble inhiber l'IMP déhydrogénase menant à une diminution de la concentration intracellulaire de GTP et de dGTP. Ces molécules sont essentielles à la transcription, traduction et à la réplication de l'ARN et de l'ADN et donc au cycle de réplication viral [98, 190]. Dans le cas du hRSV, l'activité antivirale serait principalement basée sur ce dernier mécanisme [152]. La ribavirine a démontré une activité similaire contre le hMPV et le hRSV *in vitro* avec des valeurs de CI_{50} (concentration inhibant 50% des virus) de 74 et 88 μM respectivement, sans être associée à de la toxicité cellulaire [253]. De plus, une étude *in vivo* confirme l'effet inhibiteur de la ribavirine sur la réplication du hMPV, puisque des souris BALB/c ayant reçu cette molécule présentaient une perte de poids moins prononcée que les souris non-traitées, des titres viraux pulmonaires moins élevés et une diminution de l'inflammation pulmonaire. De plus, l'ajout de glucocorticoïdes au traitement avec la ribavirine procure un bénéfice additionnel bien que modeste [110]. La ribavirine présente toutefois des inconvénients majeurs dont un potentiel tératogène, des effets secondaires et un prix élevé [205, 253]. La ribavirine est la seule molécule ayant été employée chez l'humain pour une pneumonie associée au hMPV,

et ce, en quelques occasions seulement chez des patients transplantés de cellules hématopoïétiques ou de poumons [132, 203].

12.3 Héparine et NMSO3

L'héparine et le NMSO3 sont des molécules sulfatées qui présentent une activité antivirale contre le hRSV et une étude a démontré leur potentiel inhibiteur contre le hMPV *in vitro* lorsqu'ajoutés précocément lors de l'infection virale. Ces molécules inhiberaient potentiellement les étapes d'attachement et de fusion en empêchant l'interaction entre la protéine responsable de l'attachement et un récepteur cellulaire potentiellement de type glycosaminoglycan via une interférence dans les liens électrostatiques. De plus, le NMSO3 semble également à même d'inhiber la propagation du hMPV de cellule à cellule (par la formation de syncytium), mais cela requiert des concentrations plus importantes de molécules [254].

12.4 Anticorps monoclonal humanisé

L'utilisation d'un anticorps monoclonal humanisé en prophylaxie (palivizumab) chez les jeunes enfants à risques d'infections sévères causées par le hRSV s'est avérée un succès [102]. Des anticorps monoclonaux semblables, dirigés contre la protéine F du hMPV, ont été évalués *in vitro* et *in vivo* (hamster), et ont démontré un pouvoir neutralisant prometteur [230]. De plus, l'évaluation d'un de ces anticorps monoclonaux dans un modèle d'infection chez la souris BALB/c a démontré une réduction des titres viraux pulmonaires et également de l'inflammation engendrée par le hMPV. Une diminution de l'hyperréactivité bronchique qui peut se développer à la suite d'une infection sévère a aussi été notée [108].

12.5 Alternative thérapeutique à explorer : les inhibiteurs de fusion

Une autre classe d'inhibiteurs qui s'est avérée prometteuse pour inhiber l'infection par le hRSV pourrait également être évaluée contre le hMPV; il s'agit des inhibiteurs de fusion. Ceux-ci peuvent être divisés en deux catégories : les molécules synthétiques et les peptides dérivés de la séquence de la protéine de fusion du virus cible. Plusieurs molécules synthétiques présentent une activité contre le hRSV *in vitro* et *in vivo* comme par exemple les composés BMS-433771, RFI-641, VP-14637 et JNJ2408068 [51, 52, 68, 75, 246].

Malheureusement, lorsque certaines de ces molécules ont été évaluées contre le hMPV, elle n'ont démontré aucune efficacité [253]. Par contre, certains peptides inhibiteurs de fusion se sont révélés très efficace contre le hRSV [148, 244], redonnant espoir en la mise au point d'un tel inhibiteur pour le hMPV. Ces peptides représentent des copies de régions essentielles au mécanisme de fusion des paramyxovirus, principalement les domaines d'acides aminés répétés HRA et HRB responsables du repliement de la protéine. Il s'agit du même type de cible que dans le cas de l'enfuvirtide, un inhibiteur de fusion du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) maintenant commercialisé [43, 248]. Ce peptide interagit avec la protéine gp41 et empêche son repliement, la rendant inactive [43, 247].

13. Nouvelle avenue thérapeutique : la voie de l'interférence à l'ARN

L'interférence à l'ARN (RNAi), identifiée comme telle en 1998 par Fire et collaborateurs [87] chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, est un phénomène par lequel un petit fragment d'ARN double brin peut induire de façon spécifique l'inhibition d'un gène. Il s'agit d'un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle. Les principales molécules effectrices sont les microARN (miRNA) et les petits ARN interférants (siRNA). Les composantes essentielles de la machinerie RNAi sont conservées chez la majorité des espèces, du nématode jusqu'à l'humain, en passant par la drosophile et les plantes [189, 202].

13.1 Fonctions associées à l'interférence à l'ARN

L'interférence à l'ARN est impliquée dans plusieurs fonctions biologiques. Par exemple, chez le nématode *C. elegans*, ce mécanisme de régulation est impliqué, entre autres, dans le contrôle du développement au stade larvaire [62]. Chez les plantes, l'interférence à l'ARN confère une immunité antivirale [237]. Aujourd'hui, l'interférence par l'ARN est associée à une activité antivirale mais également anti-cancéreuse chez l'humain [99, 255]. De même, l'interférence à l'ARN exerce un rôle dans de multiples fonctions cellulaires, telles que le développement, la prolifération, l'hématopoïèse et l'apoptose [202].

13.2 Principales molécules d'ARN actives

L'interférence à l'ARN s'effectue à l'aide de molécules d'ARN double brin, non-codants, constituées de 19 à 21 nucléotides et dont les extrémités sont protubérantes. Les microARN (miRNA) sont composés de brins partiellement complémentaires alors que les petits ARN interférants (siRNA) sont formés de deux brins parfaitement complémentaires (figure 15). Les miRNAs ont habituellement une provenance endogène, alors que les siRNAs sont plus souvent exogènes [76, 134].

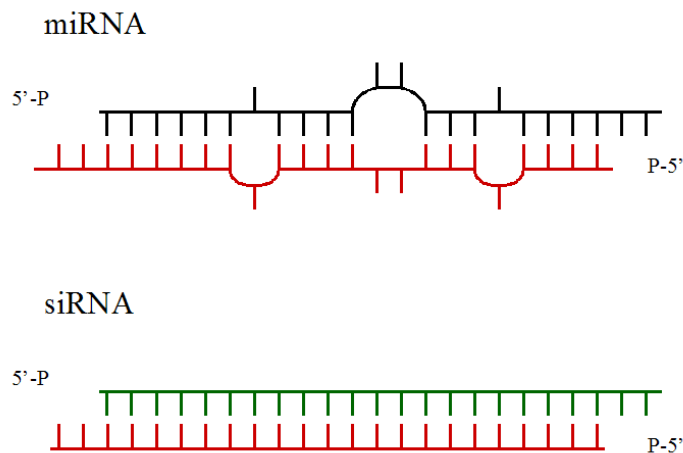


Figure 15. Illustration de la structure d'un miRNA et d'un siRNA. Adapté de [155].

13.3 Protéines impliquées et maturation

La maturation des molécules-clé de l'interférence à l'ARN se fait en plusieurs étapes (figure 16) et implique plusieurs protéines essentielles. La voie des miRNA comprend une étape nucléaire puis une étape cytoplasmique. Tout d'abord, un long fragment d'ARN contenant des structures en tige-boucles est transcrit au noyau. Ce long transcrit primaire (pri-miRNA) est alors clivé par Drosha (une ribonucléase de type III, RNase) en collaboration avec DGCR8. Cela donne naissance au précurseur du miRNA, le pre-miRNA, qui conserve une structure en tige-boucle, mais dont l'extrémité 5' contient un groupement phosphate alors que l'extrémité 3' hydroxylée présente deux nucléotides protubérants, ce qui correspond à la signature caractéristique de ce type de RNase. Ce pre-miRNA est ensuite transféré vers le cytoplasme via une interaction avec le récepteur d'export nucléaire Exportine-5. Par la suite, une autre RNase de type III nommée Dicer

reconnait ce pre-miRNA et le clive en un duplexe d'ARN de 19-21 nucléotides de long. Cette étape requiert également la présence d'une protéine appelée TRBP. Le miRNA mature peut ensuite être incorporé dans un complexe d'inhibition de la traduction nommé RISC (RNA induced silencing complex). Il s'agit du complexe effecteur qui comprend plusieurs protéines pouvant lier l'ARN, dont Argonaute 2 (Ago2), TRBP, la nucléase Tudor-SN et Dicer. La voie des siRNA, quant à elle, se déroule principalement au cytoplasme suite à l'introduction du duplex de ~ 20 bases dans la cellule. Le siRNA est directement pris en charge par le RISC ou, s'il s'agit un ARN double brin plus long (substrat de Dicer), sera d'abord reconnu et clivé par Dicer avant d'intégrer le RISC et ainsi induire l'interférence à l'ARN [74, 76, 174, 176, 189, 202].

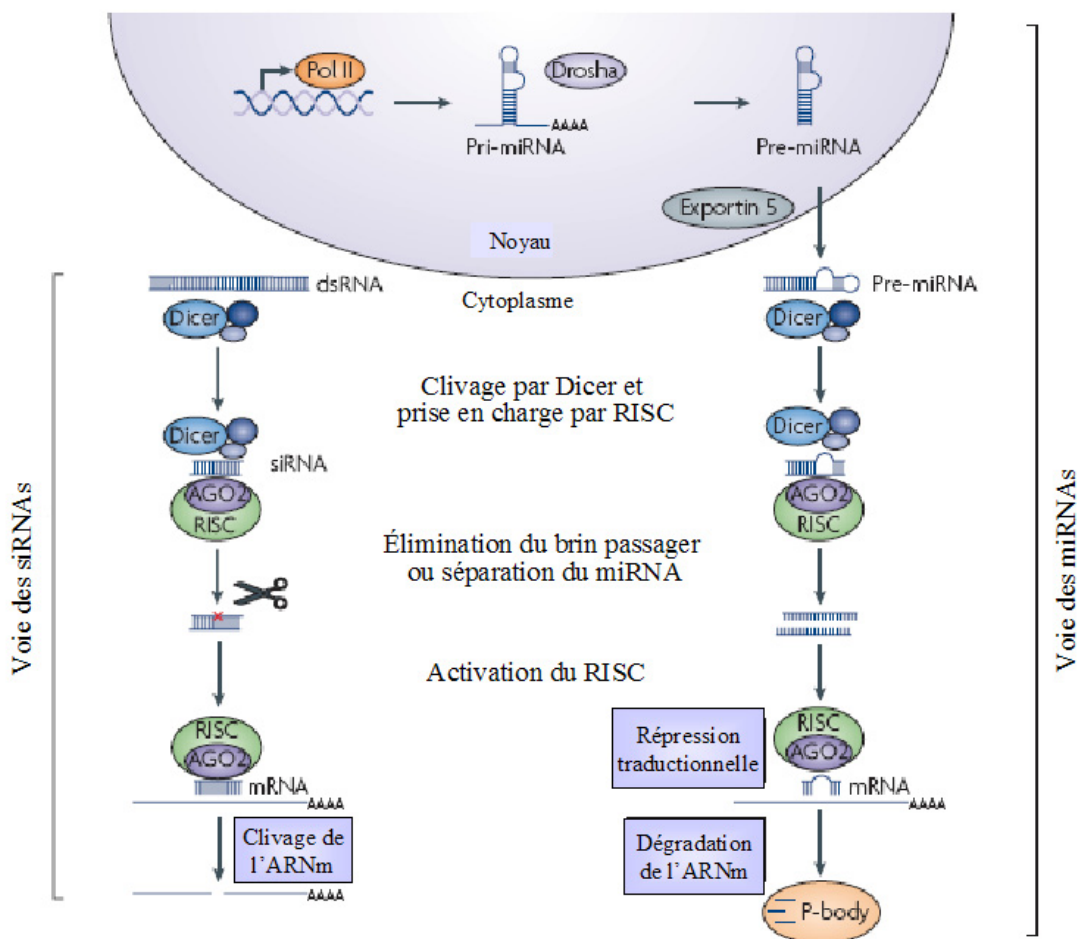


Figure 16. Illustration de la voie de l'interférence à l'ARN. Adapté de [64].

13.4 La voie des petits ARN interférants (siRNA)

Les siRNAs peuvent être introduits dans la cellule sous différentes formes. D'un côté, un duplexe d'ARN synthétique de 19-21 nucléotides, dont la séquence est parfaitement complémentaire et qui contient deux bases protubérantes à l'extrémité 3' peut être introduit dans la cellule et intégrer le RISC directement. Un plus long fragment d'ARN double brin peut également être reconnu par Dicer (substrat de Dicer) et être clivé avant d'être pris en charge par le RISC. Alternativement, un ARN double brin en tige-boucle (short hairpin RNA, shRNA) peut être exprimé à partir d'un vecteur, puis être clivé par Drosha et Dicer en un siRNA pouvant être reconnu par le RISC. Lorsque qu'un siRNA est pris en charge par le RISC, seul le brin guide (antisens) est chargé sur le complexe, alors que le brin passager (sens) est écarté ou présumément dégradé. L'ARNm cible est ensuite spécifiquement reconnu par le RISC contenant le brin guide de par la complémentarité de séquence entre l'ARNm et le siRNA. Cet ARNm va ainsi être clivé et puis dégradé (figure 17). Après chaque réaction de clivage, le complexe RISC se régénère et le cycle peut ainsi se répéter plusieurs fois, entraînant le clivage d'une grande portion des ARNm complémentaires au siRNA choisi, conduisant à une répression de l'expression génique et à une diminution du pool de protéines correspondantes à cet ARNm [74, 76, 174, 176, 189, 202].

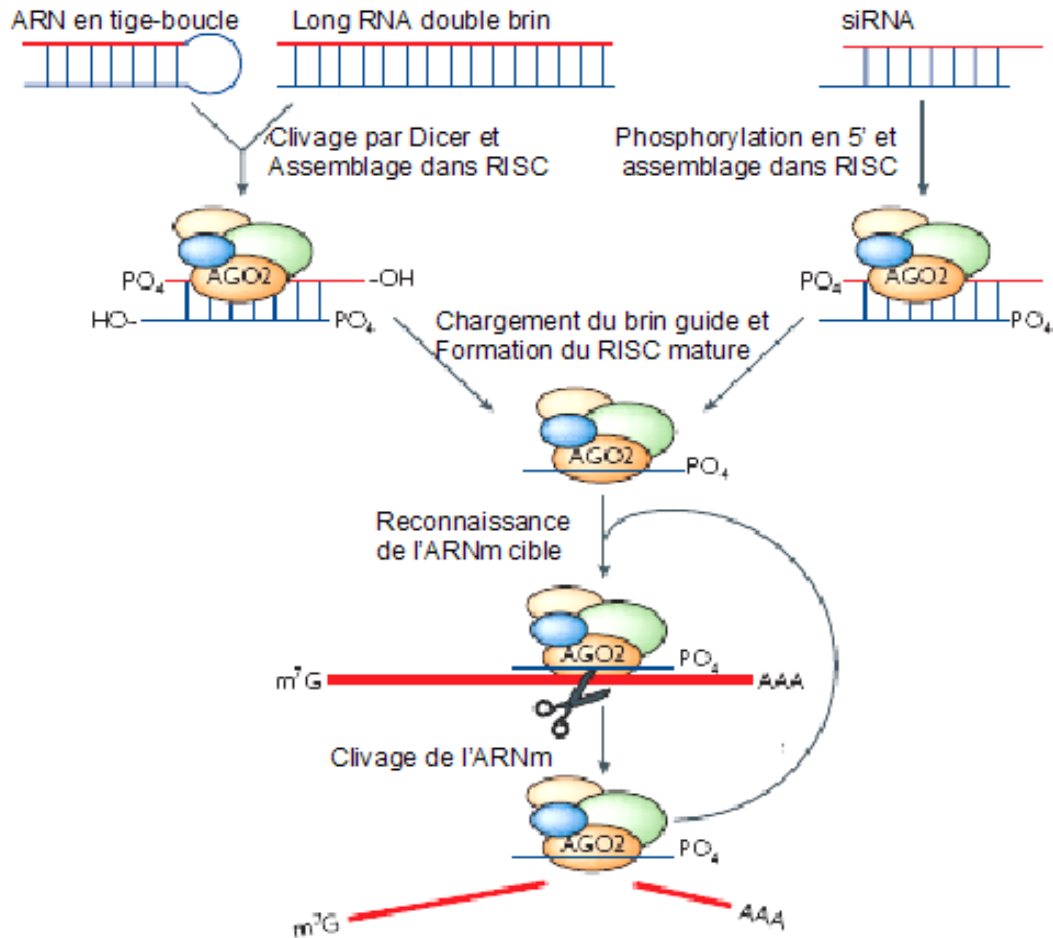


Figure 17. Chemin emprunté par les siRNAs dans la voie de l'interférence à l'ARN. Adapté de [202].

13.5 La voie des microARN (miRNA)

Contrairement aux siRNAs, les miRNAs ne sont pas nécessairement formés de séquences parfaitement complémentaires (figure 18). De plus, lorsque le RISC, chargé avec le brin guide du miRNA, s'apparie à l'ARNm cible, il s'en suit un clivage lorsque cette cible est complémentaire au brin guide. Par contre s'il y a un appariement incomplet causé par une différence de séquence entre le miRNA et sa cible, cela n'entraîne pas un clivage mais plutôt une répression de la traduction de cet ARNm. Ce phénomène serait entre autres attribuable à une séquestration de l'ARNm cible dans les compartiments cellulaires appelés « P-bodies » à l'intérieur desquels on ne retrouve aucun ribosome pour effectuer la traduction. L'encombrement causé par l'appariement du RISC chargé à l'ARNm pourrait également expliquer cette répression traductionnelle puisque les ribosomes n'ont plus libre

accès à cet ARNm (figure 19). Les miRNAs peuvent donc agir de façon similaire aux siRNAs, c'est-à-dire entraîner la dégradation de l'ARNm complémentaire et de façon différente en induisant une suppression de la traduction. Cela suggère qu'il existe au minimum deux mécanismes par lesquels de petits ARN double brin peuvent contrôler l'expression génique dans la cellule [74, 76, 174, 176, 189, 198, 202].

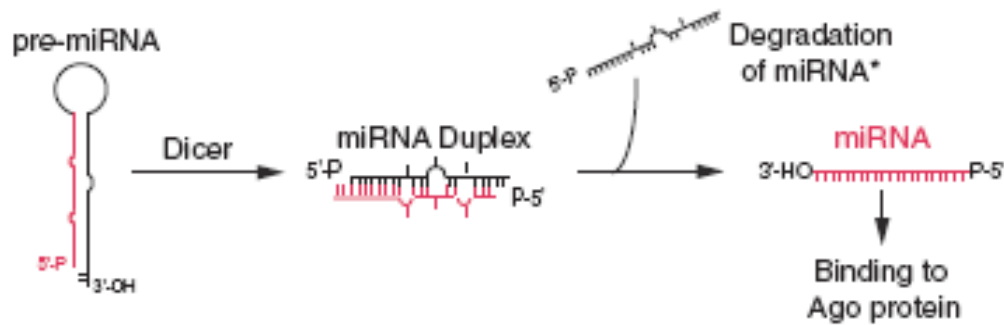


Figure 18. Représentation d'un miRNA : du pre-miRNA au brin guide incorporé dans le RISC [155].

13.6 Les applications liées à l'interférence à l'ARN

En recherche fondamentale, l'interférence à l'ARN offre la possibilité d'inhiber l'expression de gènes ciblés spécifiquement pour en déterminer le rôle. Cette technique s'avère une alternative efficace aux méthodes plus complexes de génomique fonctionnelle, telles que la génération d'organismes knock-out et la recombinaison homologe [74]. L'interférence à l'ARN présente également un potentiel thérapeutique énorme, majoritairement dans le domaine de la lutte antivirale [16, 105].

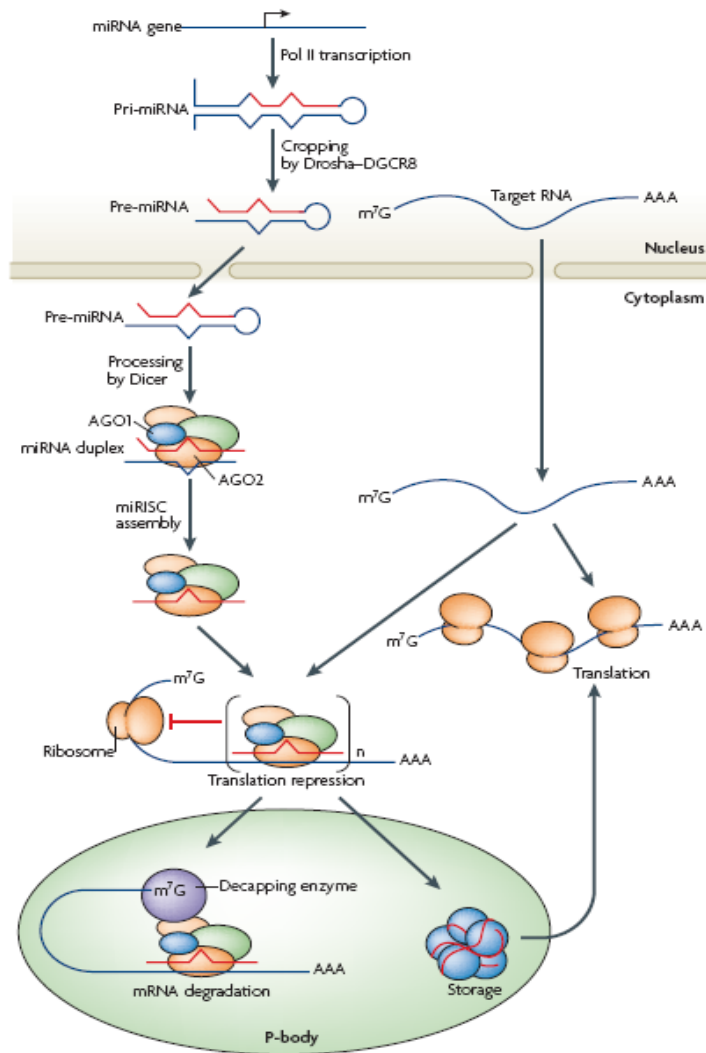


Figure 19. Illustration de la répression traductionnelle induite par un miRNA [202].

13.7 Exemples probants du potentiel thérapeutique des siRNAs.

L'utilisation de l'interférence à l'ARN en tant que thérapie antivirale est maintenant répandue à de nombreux virus, et ce, avec un certain succès. Des virus respiratoires tels que l'influenza, le hRSV, les PIV, les coronavirus, mais aussi d'autres virus à ARN comme le virus de l'hépatite C, le virus de Dengue, le poliovirus et le VIH, de même que des virus à ADN comme les virus herpes simplex et le cytomegalovirus semblent efficacement inhibés par des siRNAs *in vitro* [105]. Des essais *in vivo* suggèrent également que les siRNAs pourraient être des outils thérapeutiques très puissants. D'ailleurs, des souris ayant été traitées avec des siRNAs ciblant le virus de l'influenza, le PIV-3 ou le hRSV ont été

protégées contre l'infection [27, 92, 228, 257]. De plus, un siRNA dirigé contre l'ARNm codant pour la protéine N du hRSV est actuellement en phase clinique 2 [5], puisque cet siRNA s'est avéré sécuritaire et bien toléré chez les volontaires humains sains [72].

13.8 Les problèmes potentiels associés à cette technologie

La dégradation et/ou la répression des ARNm cibles sont donc guidées par de petits fragments d'ARN de 19-21 nucléotides résultant du clivage d'un ARN double brin plus long. Contrairement aux longs fragments d'ARN, les fragments de < 30 bases ne semblent pas induire la voie de l'interféron, bien qu'une étude ait noté une induction d'IFN *in vitro* [217]. La possibilité d'activer la voie de l'IFN ou la production d'autres cytokines doit donc être évaluée attentivement. Le risque majeur associé à l'utilisation de siRNAs et de miRNAs comme outil thérapeutique réside toutefois en la possibilité d'induire la répression de gènes non-ciblés. Cet effet indésirable est communément appelé effet « off-target » [219, 224]. De plus, l'introduction de siRNAs et de miRNAs dans les cellules pourrait provoquer une saturation de la machinerie impliquée dans l'interférence à l'ARN, dérégulant ainsi le contrôle post-transcriptionnel normal exercé par les miRNAs endogènes [16, 17]. La sélection de molécules hautement actives permet de réduire les concentrations requises pour obtenir un effet thérapeutique sans surcharger la machinerie, tout en minimisant les risques d'induction d'IFN et d'effet off-target [192, 224].

13.9 Optimisation

Bien que l'utilisation de siRNAs *in vitro* permette relativement aisément d'inhiber l'expression d'un gène cible, l'application *in vivo* de cette technologie demande davantage d'optimisation. Le mode d'administration varie d'ailleurs selon l'organe ou le type cellulaire ciblé. Les poumons semblent toutefois permissifs aux siRNAs complexés à un liposome ou seuls [65]. Différentes formulations doivent donc être évaluées *in vivo*. De même, la stabilité des siRNAs en présence de nucléases doit être améliorée pour atteindre un niveau d'inhibition satisfaisant et soutenu. L'ajout de modifications chimiques sur un ou les deux brins du siRNA permet ainsi de diminuer la susceptibilité d'un siRNA à la dégradation *in vivo* [56].

Chapitre II. Problématique, hypothèses et objectifs de recherche

1. Problématique

Il n'existe actuellement aucun vaccin disponible commercialement pour prévenir les infections causées par le hMPV. Heureusement, de nombreux candidats vaccinaux sont en cours de développement et s'annoncent prometteurs. D'un autre côté, aucune molécule thérapeutique n'est disponible et, bien que certaines molécules aient démontré une activité inhibitrice contre le hMPV *in vitro* et *in vivo*, seule la ribavirine a été employée en de rares occasions chez l'humain pour traiter une infection sévère causée par le hMPV. Il y a donc un urgent besoin de développer de nouvelles molécules pour lutter contre les infections sévères causées par le hMPV. De plus, le développement de molécules à visée thérapeutique et prophylactique se veut complémentaire à la mise au point de vaccins contre le hMPV, principalement pour les populations répondant moins bien à la vaccination telles que les très jeunes enfants et les personnes âgées. Les antiviraux offrent également une arme supplémentaire pour combattre les infections sévères, ce qui permettrait de réduire ou d'éliminer le développement d'effets néfastes à long terme, tel que l'asthme. De même, lorsque l'infection est déjà en cours, la vaccination est généralement inefficace alors que les antiviraux le sont. Par contre, les antiviraux peuvent perdre leur efficacité en cas de mutation de la cible ou être peu actifs lorsque administrés trop tardivement. Nous devons donc poursuivre activement l'étude et la mise au point de nouvelles molécules thérapeutiques.

2. Hypothèses de recherche

Puisque l'étape d'attachement et de pénétration du virus dans la cellule hôte est critique pour une infection efficace, il s'agit d'une cible idéale pour la mise au point d'une molécule antivirale. De même, plusieurs molécules actuellement en développement ciblent spécifiquement les protéines de fusion de différents virus. Le meilleur exemple de réussite demeurent l'inhibiteur de fusion du VIH (T-20/enfuvirtide/Fuzeon) qui fait maintenant partie de l'arsenal thérapeutique antirétroviral. Puisque le hMPV possède une protéine de

fusion ayant des caractéristiques similaires à la protéine de fusion du VIH, nous avons émis l'hypothèse qu'un peptide semblable au T-20 pourrait s'avérer efficace contre le hMPV. La mise au point, l'évaluation *in vitro* puis *in vivo* d'un tel inhibiteur de fusion sera donc abordé dans le cadre de mon premier objectif de recherche.

Une autre étape cruciale du cycle d'infection du hMPV est la transcription de gènes viraux en protéines nécessaires à la formation des nouveaux virions. Récemment, la découverte du mécanisme de régulation post-transcriptionnelle nommé l'interférence à l'ARN a fourni un outil supplémentaire dans la lutte contre les infections virales. D'ailleurs, des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré le potentiel antiviral des siRNAs dans le cadre d'une infection par le hRSV. Par la suite, des essais cliniques concluants ont été menés pour démontrer le caractère sécuritaire de l'administration du siRNA ALN-RSV01 chez l'humain. Cet siRNA cible une protéine essentielle à la réplication du virus : la protéine N. L'évaluation de l'efficacité de ce siRNA en tant que molécule thérapeutique chez l'humain pour les infections causées par le hRSV est actuellement réalisée par la compagnie pharmaceutique Alnylam [5]. Puisque le hRSV et le hMPV appartiennent à la même famille et que leur mécanisme de réplication est hautement similaire, nous avons émis l'hypothèse que l'interférence à l'ARN pourrait également être utilisée dans la lutte contre le hMPV. La sélection de siRNAs hautement inhibiteurs pour le hMPV sera donc associée à mon deuxième objectif de recherche.

3. Objectifs de recherche détaillés

Mes études de doctorat se sont donc divisées en deux objectifs distincts, le premier étant présenté au chapitre III alors que le deuxième est couvert par les chapitres IV et V.

1^{er} objectif de recherche : Développement d'un peptide pouvant inhiber efficacement la fusion du hMPV aux cellules cibles *in vitro* et *in vivo*.

Notre démarche visait à démontrer que des peptides dont la séquence est identique aux domaines HRA et HRB de la protéine de fusion du hMPV peuvent être d'excellents

inhibiteurs de fusion. Pour ce faire, nous voulions produire, à l'aide d'un système d'expression bactérien, plusieurs peptides de longueur et de séquence variables issus de ces deux domaines HRA et HRB du hMPV. En un premier temps, ces peptides devaient être évalués dans un modèle d'infection *in vitro*. Pour confirmer que le meilleur candidat représente un réel potentiel thérapeutique, nous devons évaluer son efficacité contre des souches de hMPV correspondant aux quatre sous-groupes connus. De plus, une version synthétique de ce peptide devait également être évaluée et nous permettre d'éviter les problèmes d'impuretés associés aux systèmes d'expression de protéines en bactéries. Finalement, le modèle d'infection létale des souris BALB/c par le hMPV allait permettre de démontrer l'efficacité du peptide en tant qu'agent prophylactique.

2^e objectif de recherche : Démonstration du potentiel thérapeutique des siRNAs dans le traitement d'une infection par le hMPV.

Notre intention était de démontrer qu'il est possible de réprimer la réplication du hMPV *in vitro* à l'aide de siRNAs. Pour ce faire, la sélection bioinformatique des siRNAs devait être basée sur la majorité des régions codantes du génome viral. Un processus d'entonnoir devaient ensuite être appliqué au cours duquel chaque étape permettait de conserver candidats les plus hautement actifs. L'identification des gènes ciblés par les siRNAs les plus performants nous permettait également de confirmer l'importance de certaines protéines dans la réplication virale. Afin de vérifier la conservation des séquences choisies parmi les différents sous-groupes de hMPV, nous voulions également répéter les essais d'inhibition avec des souches de hMPV correspondant aux quatre génotypes connus. Puisque des études suggèrent une performance accrue des siRNAs légèrement plus longs que les siRNAs standards de 19-21 bases et nommés substrats de Dicer, ceux-ci devaient également être synthétisés à partir des séquences des meilleurs candidats obtenus précédemment, puis évalués contre les quatre mêmes souches de hMPV *in vitro*. L'ajout de groupements visant à modifier la structure des siRNAs et leur conférer une meilleure résistance face aux RNases présentes dans les voies respiratoires devait aussi être abordé. Finalement, l'évaluation des meilleurs candidats, avec ou sans recourt à un vecteur

liposomal devaient être réalisé dans un modèle d'infection par le hMPV chez la souris BALB/c.

Le chapitre IV présente la forte inhibition de la réplication virale *in vitro* obtenue pour des siRNAs dirigés contre la protéine N et la protéine P du hMPV. Le chapitre V porte sur l'évaluation *in vivo* des siRNAs identifiés au chapitre précédent.

Chapitre III. Identification et développement d'un inhibiteur de la fusion du Métapneumovirus humain.

Cet article a été publié en janvier 2008 dans la revue *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (volume 52, numéro 1, pages 279-287) mais il était disponible sur internet dès le 29 octobre 2007 (epub ahead of print). Il s'agit d'un article pleine longueur.

1. Résumé

L'objectif de cette étude était d'identifier un inhibiteur de fusion du hMPV à partir des travaux ayant mené au développement de l'enfuvirtide (T-20) pour lutter contre le VIH.

Neuf peptides ont été exprimés à partir de domaines spécifiques retrouvés dans la séquence de la protéine de fusion du hMPV : trois provenant de la région HRA et six provenant de la région HRB du hMPV. Les régions ciblées ont d'abord été clonées dans un vecteur d'expression bactérien, puis exprimées chez la bactérie *E. coli*. Le potentiel d'inhibition de ces peptides a été évalué *in vitro* par infection des cellules LLC-MK2 par le hMPV en présence de différentes concentrations de peptide. L'effet inhibiteur a été mesuré par PCR quantitatif et la concentration inhibitrice 50% (CI_{50}) a été déterminée pour chacun des peptides. La CI_{50} du peptide le plus efficace a ensuite été confirmée par la méthode de titration par plaque à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine de fusion. Cinq peptides ont démontré un potentiel inhibiteur contre le hMPV avec des CI_{50} inférieures à 3,3 μ M. Le peptide le plus efficace provient de la région HRA (peptide HRA2) et présente une CI_{50} variant entre 1 et 15 nM selon le sous-groupe de hMPV ciblé (A1, A2, B1 et B2). Ce peptide s'est également révélé être inhibiteur lors de l'infection *in vitro* de cellules HEp-2 par le hRSV avec une CI_{50} de 1,4 μ M alors qu'aucune inhibition du hPIV-3 n'a été démontrée. Cette étude nous a également permis de faire ressortir des différences entre l'événement de fusion qui se produit lorsque le hMPV infecte une cellule cible et la fusion qui survient entre des cellules infectées et non-infectées, puisque le peptide HRA2 semble agir uniquement au niveau de l'infection virale initiale. L'évaluation de ce peptide a été poursuivie dans un modèle d'infection létale chez la souris BALB/c. Ces

expériences *in vivo* ont confirmé l'excellente activité de notre peptide en termes de prophylaxie, puisque l'administration par voie intranasale de 7 μ M (10 μ L) de ce peptide au moment de l'infection a été associée à 100% de survie chez les souris infectées (contrairement à 0% chez les contrôles) et une diminution des titres viraux pulmonaires de $>4 \log_{10}$, de l'inflammation et de la production de certaines cytokines, telles que RANTES, IFN- γ et MCP-1.

Ce peptide pourrait éventuellement faire partie de l'arsenal thérapeutique à utiliser lors d'éclotions d'infections par le hMPV chez des patients vulnérables ainsi que pour la prévention des infections sévères chez les jeunes enfants (tels des prématurés) ayant été en contact avec une personne infectée. L'efficacité de ce peptide, lorsqu'administré après l'infection (24h post-infection), n'a cependant pas donné les résultats attendus.

2. Contributions des auteurs

- | | |
|-------------------|--|
| Céline Deffrasnes | <ul style="list-style-type: none"> -Rédaction de cet article -Design et production des peptides -Mise au point de la titration en plaque avec marquage par anticorps (hMPV), des titrations en plaques pour hRSV et hPIV-3 -Tests d'inhibition hMPV, hRSV, hPIV-3 -Tests de cytotoxicité -Titres viraux pulmonaires, dosages de cytokines et analyses statistiques |
| Marie-Ève Hamelin | <ul style="list-style-type: none"> -Administration intranasale et monitoring des souris -Mesure du Penh, sacrifices animaux et prélèvement de poumons -Photographie des coupes pulmonaires |
| Gregory A. Prince | <ul style="list-style-type: none"> -Évaluation du score histopathologique |
| Guy Boivin | <ul style="list-style-type: none"> -Supervision du projet de recherche -Correction de l'article |

3. Article

Title: Identification and Evaluation of a Highly Effective Fusion Inhibitor for Human
Metapneumovirus.

Running title: Human metapneumovirus fusion inhibitor

Céline Deffrasnes¹, Marie-Ève Hamelin¹, Gregory A. Prince² and Guy Boivin^{1*}.

¹Research Center in Infectious Diseases of the Centre Hospitalier Universitaire de Québec
and Laval University, Quebec City, Quebec, Canada;

²Virion Systems, Inc., Rockville, MD, USA.

Abstract word count: 257

Text word count: 4013

*Corresponding author:

Dr Guy Boivin

CHUQ-CHUL, room RC-709

2705 blvd Laurier, Quebec City,

Quebec, Canada G1V 4G2

Tel : (418) 654-2705

Fax : (418) 654-2715

E-mail : Guy.Boivin@crchul.ulaval.ca

Abstract

Human metapneumovirus (hMPV) can cause acute upper and lower respiratory tract infections that are particularly severe in young children, elderly subjects and immunocompromised patients. To date, no treatments or vaccines are available for hMPV infections. Our objective was to assess the inhibitory potential of several peptides derived from heptad repeat A and B (HRA and HRB) domains of the hMPV fusion protein. Nine candidate peptides were expressed in *Escherichia coli* or obtained synthetically and tested in vitro and in an animal model. Excellent in vitro inhibition of an hMPV strain of the A1 subgroup was obtained for 5 peptides with 50% inhibitory concentration ranging from 1.4 nM to 3.3 μ M. One peptide, HRA2, displayed very potent activity against all 4 hMPV subgroups. It was also moderately active against human respiratory syncytial virus (A2 strain) but displayed no activity against human parainfluenza virus type 3. BALB/c mice that received the HRA2 peptide and a lethal hMPV intranasal challenge simultaneously were completely protected from clinical symptoms and mortality. On day 5 postinfection, HRA2-treated mice had undetectable lung viral loads which were significantly less than those of untreated mice (3×10^4 50% tissue culture infective doses/lung). Pulmonary inflammation, levels of proinflammatory cytokines/chemokines (RANTES, gamma interferon and monocyte chemoattractant protein 1) and airways obstruction were also significantly decreased in HRA2-treated mice. The results of this study demonstrate that potent antivirals can be derived from the hMPV fusion protein HR domains. Moreover, hMPV, compared to other paramyxoviruses and to the human immunodeficiency virus, seems to be more susceptible to HRA- than HRB-derived peptides.

Introduction

Human metapneumovirus (hMPV) is a newly discovered paramyxovirus (41). It belongs to the *Paramyxoviridae* family, *Pneumovirinae* subfamily, and the *Metapneumovirus* genus. Other well-known human members of this family include the human respiratory syncytial virus (hRSV), human parainfluenza viruses (hPIV), as well as measles and mumps viruses. hMPV is most closely related to avian pneumovirus type C, which is responsible for laryngotracheitis and high mortality rates in poultry farms (31, 41). Serological studies from The Netherlands suggested that hMPV has been circulating in humans since at least 1958 and that virtually all children are infected by the age of 5 to 10 years (41). Infections caused by hMPV have been reported worldwide and are responsible for 5 to 10% of hospitalizations due to respiratory tract infections in young children (11). hMPV is associated with both upper and lower respiratory tract infections, mainly in young children, elderly subjects, and immunocompromised patients (2). Some infections can be life-threatening in infants with underlying diseases (2, 30) and in hematopoietic stem cell transplant recipients (7, 13). A recent study has also reported an outbreak of severe hMPV infections associated with many deaths in a long-term-care facility (3). Despite the development of specific vaccines and monoclonal antibodies (6, 9, 39, 47), no prophylactic or therapeutic modalities have been approved for hMPV infections.

hMPV isolates can be classified into two major groups (A and B) and at least four subgroups (A1, A2, B1, and B2) based mainly on sequence analysis of the P, F, and G genes (4, 26, 32, 42). The hMPV genome consists of a single strand of negative-sense RNA which codes for nine viral proteins. Three of the latter are glycoproteins potentially exposed

at the surface of the virion and infected cells: the fusion (F), attachment and small hydrophobic proteins (12, 40). The F protein, which is the major antigenic determinant (37), is a class I transmembrane protein mediating virus-cell fusion and infected cell-cell fusion as found in other paramyxoviruses (21, 28, 36). Membrane fusion mechanisms have been studied largely for fusogenic viruses such as human immunodeficiency virus (HIV), influenza virus and other paramyxoviruses (17, 21, 23, 25, 29, 38, 44, 49). It is believed that hMPV follows the same pathway to penetrate target cells. The F protein first requires activation by a proteolytic cleavage event mediated by a furin-like enzyme of the host cell. Then, the fusion process involves insertion of the hydrophobic fusion peptide into the target cell membrane and a refolding of the F protein. This step requires the interaction of two specific domains: heptad repeats A and B (HRA and HRB). These alpha-helix-forming domains are sequence motifs composed of seven repeated amino acids labeled *a-b-c-d-e-f-g* where *a* and *d* are usually hydrophobic amino acids and *e* and *g* are charged amino acids. The hydrophobic amino acids pack together in the interior of the helix and interact with other *a* and *d* residues from nearby helices so that they wrap around each other, forming a very stable coiled coil structure (5). In hMPV, the F proteins assemble as trimers inside which three HRA (as well as three HRB) are creating a coiled coil. Then, the two pairs of coiled coil (HRA and HRB) interact, creating a six-helix bundle structure that brings the viral and the cellular membranes close together, causing membrane merge and fusion pore dilatation. As seen with HIV, hRSV and hPIV, exogenous HRA or HRB peptides can compete with their endogenous counterparts, inhibiting fusion and, consequently, infection (18-20, 22, 44, 46, 48).

Herein, we designed and evaluated several potential hMPV inhibitors based on the sequence of the HRA and HRB domains of the F protein.

Materials and Methods

Cell lines and viruses. LLC-MK2 (Rhesus monkey kidney) and HEp-2 (human laryngeal carcinoma) cells were grown in minimum essential medium (MEM) (GIBCO; Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). hMPV clinical strains C-85473 (group A1), CAN97-83 (group A2), CAN97-82 (group B1), and CAN98-75 (group B2) as well as hPIV-3 strain ATCC VR-93 and hRSV ATCC VR-1540 (strain A2), were used in this study.

Virus propagation. hMPV was grown in LLC-MK2 cells using Opti-MEM I medium (Invitrogen) containing 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of trypsin (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) (hMPV infection medium). The virus titers were reported as 50% tissue culture infectious doses (TCID_{50}) per ml using the Reed and Muench method. The hRSV A2 strain was propagated in HEp-2 cells using MEM with 2% FBS, and titers were reported as PFU per ml. The hPIV-3 strain was propagated in LLC-MK2 cells, and titers were reported as for hRSV.

hMPV immunostaining. Confluent LLC-MK2 cells were incubated with hMPV for 1.5 to 2 h, then the medium was removed, and an overlay containing 0.8% methylcellulose and hMPV infection medium was added. After 3 to 5 days, cell monolayers were fixed with formalin and blocked with phosphate-buffered saline (PBS)-5% milk. Cells were incubated for 1 h with the anti-hMPV F monoclonal antibody 1016 (a gift from MedImmune Inc, Gaithersburg, MD) and then incubated for 1 h with horseradish

peroxidase-labeled goat anti-Armenian hamster antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA). Plaques were stained with the TrueBlue substrate (KPL, Gaithersburg, MD). Experiments were performed in triplicate, and results were reported as the means \pm standard errors of the means (SEM).

Peptide production. Nine fragments encompassing the HRA and HRB domains were amplified from hMPV strain C-85473 and cloned in the pET30a vector (Novagen, Mississauga, Ontario, Canada) by using EcoRI and HindIII restriction sites. Peptides were expressed in *Escherichia coli* BL21(Star) cells (Invitrogen) for 5 h at 25°C and purified using Ni-nitrilotriacetic acid agarose columns (QIAGEN, Mississauga, Ontario, Canada). Peptides were filtered on 0.22- μ m membranes, quantified with a BCA Protein kit (Pierce, Rockford, IL) and kept at -80°C until further use. The residual peptide produced by the empty pET30a vector was used as a negative control in the experiments. Two peptides were also synthesized at the Eastern Quebec Peptide Synthesis Facility (Quebec City, QC, Canada) using the peptide synthesizer AB433A. Quality control analysis was performed by using high-pressure liquid chromatography and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, and purity was estimated at >95%. The synthetic peptides were solubilized in PBS at concentration varying between 100 μ M and 500 μ M.

Cytotoxicity assay. Cytotoxicities of the expressed peptides and the pET30a control peptide were evaluated with an MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay in LLC-MK2 cells. Serial dilutions of each peptide were made in hMPV infection medium and then added to the cells. After 3 days of incubation, 100 μ l of a 1-mg/mL concentration of MTT was added to each well for 2 h at 37°C. The dye was solubilized with 100 μ l/well of acidic isopropanol, and absorbance was

read at a wavelength of 570 nm. Absorbance values that were lower than the control cells (optical density of 0.2 to 0.4) indicated a reduction in the rate of cell proliferation, i.e., cytotoxicity.

hMPV inhibition assays. Serial twofold dilutions of each peptide were mixed with 10^7 TCID₅₀ of hMPV strain C-85473 in infection medium and then added to LLC-MK2 cells. After 2 h, the medium was removed and fresh medium containing serial twofold dilutions of peptides was added. On day 3, supernatants were collected and stored at -80°C until quantification by a real-time reverse transcriptase-PCR assay for the N gene using previously described primers (27) and a new TaqMan probe (5'-FAM-CTTGRTGCAATGATGAYGGTGTCACTGCXT-Tamra-PH-3').

Immunostaining was also used to assess the inhibitory activity of the HRA2 peptide against all four hMPV subgroups. Briefly, confluent LLC-MK2 cells were infected with 30 to 50 PFU of hMPV and serial twofold dilutions of the peptide for 1.5 to 2 h. The medium was then removed, and an overlay containing 0.8% methylcellulose and serial twofold dilutions of the peptide was added. After 4 days, the cell monolayers were fixed with formalin and immunostained as described earlier. All 50% inhibitory concentration (IC₅₀) values were calculated from experiments performed in triplicate.

Immunostaining was then used to determine hMPV subgroup A1 fusion events inhibited by the HRA2 peptide. The experiment was done as described above, but the peptide was added during virus adsorption and/or in the methylcellulose overlay.

hRSV and hPIV-3 inhibition assays. Inhibitory activity of the HRA2 peptide against hRSV was determined by plaque assay. Briefly, confluent HEp-2 cells were infected with 30 to 50 PFU of hRSV and serial twofold dilutions of HRA2 in MEM with

2% FBS for 1.5 h. The medium was then replaced by an overlay medium containing 0.8% methylcellulose (Sigma) and serial dilutions of HRA2. Cells were incubated for 4 days before fixation with formalin and staining with crystal violet. Plaques and syncytia were visualized under light microscopy and the IC₅₀ values were determined by visual count. A similar strategy was used to evaluate the activity of the HRA2 peptide against hPIV-3, except that the overlay medium contained 0.8% SeaPlaque agarose (Mandel Scientific Company Ltd, Guelph, Ontario, Canada).

Animal experiments. A lethal BALB/c mouse model for hMPV infection was used to evaluate peptide efficacy. Ninety 4- to 6-week-old female BALB/c mice (Charles Rivers Laboratories, Ontario) were divided into five groups (18 mice/group) as follows: group A received the HRA2 peptide only; group B received hMPV only; group C received hMPV and the HRA2 peptide simultaneously; group D mice were first infected by hMPV and then received the HRA2 peptide 24 h later; and group E received hMPV and the HRB1 control peptide simultaneously. The mice were anesthetized with isoflurane [2-chloro-2-(difluoromethoxy)-1,1,1-trifluoro-ethane] and inoculated intranasally with PBS or 2×10^6 TCID₅₀/mL of hMPV strain C-85473 (group A1) in 70 μ L of infection medium and received, or did not receive, 7 μ M of synthetic peptide by the same route. All mice were housed in groups of three in microisolator cages and monitored daily for mortality, weight loss, and clinical signs of disease. Mice were sacrificed when they had lost >25% of their initial weight or at the end of the experiment.

Lung viral titers, cytokine levels, and histopathological scores. On day 5 postinfection, 12 mice per group were sacrificed and their lungs were collected and quickly frozen in liquid nitrogen. Lungs from six mice per group were homogenized in one ml of

hMPV infection medium and centrifuged 10 min at 350 X g, and then 100- μ l amounts of supernatant was used for viral titration studies. A second aliquot of 500 μ l of supernatant was kept to quantify the cytokines/chemokines RANTES, monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), and gamma interferon (IFN- γ) by enzyme-linked immunosorbent assay as described elsewhere (16). For histopathological studies, lungs from six mice per group were fixed with 10% buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned in 5- μ m slices, and stained with hematoxylin-eosin. Four types of pulmonary inflammation (peribronchiolitis, perivascularitis, interstitial inflammation and alveolitis) were evaluated to determine histopathological scores based on a scale ranging from 0 to 4 as described elsewhere (16, 34).

Airways obstruction. On day 5 postinfection, the breathing patterns were characterized in six mice/group by using an unrestrained whole-body flowthrough plethysmograph system as previously reported (15). Mice were allowed to acclimate to the chamber for 30 min, and then respiratory parameters were recorded for 5 min and enhance pause (P_{enh}) values were calculated. The P_{enh} value is an indicator of lung function. This value increases when airway obstruction is observed, as the mice generate a larger inspiratory effort in order to fill their lungs (15, 24).

Statistical analyses. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5 software using one-way analysis of variance and the Tukey multiple comparisons test.

Results

Peptides design. The peptides evaluated in this study encompassed the HRA and HRB domains present in the hMPV F protein (Table 1). Nine peptides of different lengths

were selected based on previously reported inhibitory peptides active against other viruses, such as HIV, hRSV, and hPIV-3 (19, 22, 23, 46).

Cytotoxicity and viral inhibition assays. There was no cytotoxicity associated with the different peptides at the highest concentrations tested (9 μ M). Each peptide and the vector residual peptide used as a negative control were first tested for their inhibitory activities against an hMPV subgroup A1 strain by real-time PCR. Of the nine tested peptides (three encompassing HRA and six encompassing HRB), five showed good in vitro inhibition against hMPV, with IC_{50} values <3.3 μ M (Table 1). Peptides derived from the HRA domain were generally more potent (three out of three) than those derived from the HRB region (two out of six). All peptides showed concentration-dependent inhibition against the challenge viral strain (data not shown).

One peptide in particular, the longest HRA-derived peptide, named HRA2, showed important inhibitory activity against the hMPV A1 strain, with an IC_{50} value of 2.1 nM (Table 1). This peptide was thus selected for further evaluation against strains from all four hMPV subgroups. Results showed that the HRA2 peptide expressed in *E. coli* had significant and similar antiviral activities against all hMPV subgroups, with IC_{50} values <12 nM when tested by real-time PCR (Table 2). These low IC_{50} values were also confirmed by performing plaque assays and immunostaining (Table 2). A synthetic version of peptide HRA2 lacking the extra amino acids from the pET30a vector was also evaluated for its antiviral activity against the four hMPV subgroups by plaque assay followed by immunostaining. This synthetic peptide had a slightly less important inhibitory activity compared to the *E. coli*-expressed peptide but still exhibited low IC_{50} values against the four hMPV strains ($IC_{50} < 22$ nM) (Table 2).

We then sought to determine if the HRA2 peptide inhibits virus-cell or cell-cell fusion event. In a cell-based plaque assay experiment, the development of plaques is dependent on both initial infection and subsequent spread of infection to neighboring cells. By adding the HRA2 peptide during virus adsorption to the cells as well as in the methylcellulose overlay or only during virus adsorption or only in the overlay, it is possible to determine which fusion event is inhibited. As seen in Table 3, the addition of HRA2 peptide only in the overlay did not result in inhibition ($IC_{50} > 250$ nM), which means that this peptide cannot inhibit cell-cell fusion. Moreover, the IC_{50} values obtained when HRA2 was added only during adsorption or during both adsorption and in the overlay are not statistically different (IC_{50} of 27.5 ± 7.0 nM and 20.1 ± 6.3 nM, respectively) which means that the HRA2 peptide is a strong inhibitor of virus-cell fusion but not of subsequent cell-cell fusion.

The inhibitory activity of the HRA2 peptide produced in *E. coli* was also evaluated by plaque assay against two other members of the *Paramyxoviridae* family, hRSV and hPIV-3. The peptide presented moderate activity against hRSV (IC_{50} value of 1.6 ± 0.18 μ M) and no activity against hPIV-3 at the highest concentrations tested (9 μ M).

In vivo activity of the HRA2 peptide. The simultaneous intranasal administration of hMPV and the synthetic HRA2 peptide (7 μ M) protected all mice from death. In contrast, all hMPV-infected mice that received either the HRA2 peptide 24 h following viral infection, the synthetic inactive HRB1 peptide, or PBS died or were sacrificed based on weight loss of $\geq 25\%$ beyond day 5. From day 0 to 5, simultaneously infected and HRA2-treated mice did not lose any weight and had no clinical signs of illness, whereas other groups of infected mice lost 20 to 23% of their initial weight, associated with ruffled

fur and a decrease in activity (Figure 1A). On day 5 postinfection, uninfected mice receiving the HRA2 peptide only, as well as simultaneously infected and HRA2-treated mice, had undetectable lung viral titers ($<10^2$ TCID₅₀/lung) whereas other groups of infected mice had viral titers of $3 \times 10^4 \pm 1.3 \times 10^4$ (hMPV only), $1.7 \times 10^4 \pm 1 \times 10^4$ (hMPV with HRA2 24 h later), and $4 \times 10^3 \pm 2 \times 10^3$ (hMPV and HRB1) TCID₅₀/lung (Figure 1B).

The degree of airway obstruction in HRA2-treated mice was similar to that of uninfected mice and was significantly decreased compared to that of untreated mice, with P_{enh} values of 0.32 ± 0.01 , 0.35 ± 0.01 and 2.63 ± 0.13 , respectively (Figure 2). Sham-infected mice receiving PBS normally have a P_{enh} value ≤ 0.5 (15). Delayed treatment with the HRA2 peptide 24 h postinfection or simultaneous treatment with the HRB1 peptide did not result in a significant decreased in the P_{enh} values compared to those of untreated mice.

The pulmonary levels of the cytokines and chemokines RANTES, IFN- γ and MCP-1 were significantly decreased only in the group of infected mice that received early treatment with the HRA2 peptide (Figure 3). Finally, groups of mice that received PBS (hMPV infection only, mock-treated group), the HRB1 peptide, or a delayed treatment with HRA2 presented important and similar levels of peribronchiolar, perivascular, interstitial, and alveolar inflammation, whereas the early administration of the HRA2 peptide at the time of infection led to a considerable reduction in all types of inflammation (Figure 4A). Overall, pulmonary inflammation was decreased with early HRA2 treatment compared to untreated mice, but this treatment could not completely resolve the inflammation caused by hMPV infection, as shown in Figure 4B. Lung tissues from sham-infected but HRA2-treated mice showed no signs of inflammation and are visually like those from sham-infected mice (14-16).

Discussion

In this study, we showed that some peptides encompassing the HRA and HRB regions located at the N- and C-terminal portions of the hMPV F1 domain can significantly inhibit viral infection. In particular, a 48-amino-acid (aa) HRA peptide (HRA2) had very potent activity against all subgroups of hMPV, with IC_{50} values <25 nM. Furthermore, HRA2 completely prevented clinical signs and lung viral replication when administered to mice at the time of infection.

It has been proposed that peptides derived from the HR regions act by blocking the interaction between the endogenous HRA and HRB domains of the F protein, which is essential for the fusion of viral and cellular membranes. In contrast to results for other fusogenic viruses (22, 35, 44, 46), we found that peptides derived from the HRA sequence were generally more potent than those based on the HRB domain to inhibit hMPV replication. The hMPV HRA peptides tested in this study were as potent as compounds T-118 (HRB peptide) against hRSV (22) and HR-1 (HRA peptide) against another hMPV strain (28). One of the peptides we designed from the HRA domain (HRA2) was found to be highly effective in inhibiting hMPV fusion, with a mean IC_{50} of 16.8 ± 2.6 nM against four different hMPV strains (Table 2). The hMPV HR-1 peptide previously reported by Miller et al. (28) differed from our HRA2 peptide in its length (5 aa shorter at its N-terminal end) and in its activity (IC_{50} value of 46 nM when tested against a single hMPV strain).

Our HRA2 peptide that was expressed in *E. coli* from the pET30a vector had a slightly better antiviral activity than the synthetic one (Table 2). This could be attributed to the extra peptide fused to HRA2 when produced from the vector. This extra peptide of 52

aa could stabilize the HRA2 α -helix structure or simply help the peptide to fold correctly and gain an active conformation. This difference in IC_{50} values could also be associated to impurities remaining in the *E. coli*-generated HRA2 peptide. Despite some differences in the amino acid sequences of the HRA and HRB domains among the four hMPV subgroups (Figure 5), the HRA2 peptide had similar activities against all representative hMPV strains (Table 2). More unexpectedly, the HRA2 peptide showed some activity against hRSV, but to a lesser extent than against hMPV. This could be explained by the 48% amino acid identity between the HRA domains of hMPV and hRSV. The conserved helical structure of the HR domains between these two viruses could allow the interaction of the HRA2 peptide with the hRSV HRB domain, preventing its normal interaction with endogenous HRA. HR-derived peptides usually present sequence-specific inhibitory activity (35, 45, 46), but some groups have reported that cross-activity can be observed between viruses from different genera in the same family (hPIV-3 and Hendra virus (33) and hPIV-3 and hRSV (22)). On the other hand, the HRA2 peptide did not inhibit hPIV-3 replication, which could be attributed to the much lower level of amino acid sequence identity between hMPV and hPIV-3, i.e., 25% for both HRA and HRB (Figure 5). A combined activity against hMPV and hRSV would be of benefit in clinic use, considering the similar mode of presentation for the two viruses, i.e., bronchiolitis. A more detailed evaluation of HRA2 activity against different strains of hRSV is needed both in vitro and in vivo.

The HRA2 peptide presented a strong antiviral activity against the four known hMPV subgroups in vitro and was used in further animal studies. Using a lethal BALB/c mouse model of hMPV infection, we showed that all mice that received HRA2 at the time of infection survived and that none presented any weight loss or clinical signs of illness as

reported previously (1, 10, 16). Moreover, when the HRA2 peptide was administered simultaneously with hMPV, no infectious viruses could be recovered from the lungs of mice on day 5 postinfection and, as a consequence of this potent inhibition of viral replication, the levels of proinflammatory cytokines (RANTES, MCP-1, and IFN- γ), airway obstruction, and pulmonary inflammation were all significantly decreased. These data suggest that early administration of the HRA2 peptide might be able to prevent the development of the long-term consequences associated with this virus, most notably, airway hyperresponsiveness (15, 43).

On the other hand, delayed treatment with HRA2, i.e., 24 h postinfection did not protect mice from clinical signs (weight loss) and was associated with viral replication in the lungs similar to that found in untreated mice. Also, as expected from the in vitro assays, mice that received the HRB1 peptide were not protected from hMPV clinical manifestations, which confirms the fact that viral inhibition is sequence dependent.

The cell-based plaque assay first demonstrated that the HRA2 peptide activity is restricted to the fusion event taking place between viruses and cells and not the one occurring during the cell-cell spread of infection. Furthermore, the absence of benefits in mice receiving the 24 h-delayed treatment with the HRA2 peptide confirms that this peptide can inhibit only the virus-cell fusion event and not the cell-cell spread of hMPV infection. This suggests the use of the HRA2 peptide as a prophylactic agent instead of as a treatment once the disease is declared. Some explanations for the restricted fusion inhibition activity of the HRA2 peptide can be proposed. First, a larger amount of F proteins could be found on the surface of infected cells than on virions, which could improve the efficacy of cell-cell fusion thus increasing the concentration of the HRA2 peptide required

to inhibit this fusion. Also, the fusion mechanisms could be different in virus-cell fusion than in cell-cell fusion. Moreover, different proteins could be involved in the two fusion events, with the F protein being the most important protein in virus-cell fusion but, possibly, not in the cell-cell fusion event. More research are needed to ensure better understanding of these fusion events and their inhibition.

To pursue the development of the HRA2 compound, the most efficient delivery systems for human administration need to be identified. A carrier, such as a liposome, could protect HRA2 from potential degradation in the lungs and increase its half-life. The peptide could also be chemically modified for stronger resistance against degradation. In contrast to the approved anti-HIV-1 drug enfuvirtide (8), the HRA2 peptide would not need to be administered by subcutaneous injection but could be aerosolized or nebulized for direct penetration into the lungs.

In conclusion, we report for the first time the *in vivo* inhibition of hMPV infection by a fusion inhibitor analogous to the HRA domain. This peptide showed important antiviral activity when administered intranasally at the same time as viral challenge but no significant benefits when administration was delayed 24 h postinfection. Our results indicate a potential for at least its prophylactic use, particularly in postexposure treatment of contacts of infected persons and possibly for early treatment in an epidemic context. More studies are needed to characterize the best delivery mode, dosage, and schedule of administration for this hMPV fusion inhibitor.

Acknowledgments

This work was supported by research grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-62789) and Le Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) to G.B. G.B. is a national researcher scholar of the FRSQ and the holder of the Canada Research Chair on Emerging Viruses and Antiviral Resistance. C.D. has a Ph.D. scholarship from the FRSQ.

Sections of lung tissues were photographed with the help of the Bioimaging Platform from the Infectious Disease Research Center, CHUQ-CHUL, Quebec City, QC, Canada.

References

1. **Alvarez, R., K. S. Harrod, W. J. Shieh, S. Zaki, and R. A. Tripp.** 2004. Human metapneumovirus persists in BALB/c mice despite the presence of neutralizing antibodies. *J Virol.* **78**:14003-14011.
2. **Boivin, G., Y. Abed, G. Pelletier, L. Ruel, D. Moisan, S. Cote, T. C. Peret, D. D. Erdman, and L. J. Anderson.** 2002. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis.* **186**:1330-1334.
3. **Boivin, G., G. De Serres, M. E. Hamelin, S. Cote, M. Argouin, G. Tremblay, R. Maranda-Aubut, C. Sauvageau, M. Ouakki, N. Boulianne, and C. Couture.** 2007. An outbreak of severe respiratory tract infection due to human metapneumovirus in a long-term care facility. *Clin Infect Dis.* **44**:1152-1158.
4. **Boivin, G., I. Mackay, T. P. Sloots, S. Madhi, F. Freymuth, D. Wolf, Y. Shemer-Avni, H. Ludewick, G. C. Gray, and E. LeBlanc.** 2004. Global genetic diversity of human metapneumovirus fusion gene. *Emerg Infect Dis.* **10**:1154-1157.
5. **Branden, C., and J. Tooze.** 1999. *Introduction to Protein Structure*, Second ed. Garland Publishing, New York.
6. **Buchholz, U. J., K. Nagashima, B. R. Murphy, and P. L. Collins.** 2006. Live vaccines for human metapneumovirus designed by reverse genetics. *Expert Rev Vaccines.* **5**:695-706.
7. **Cane, P. A., B. G. van den Hoogen, S. Chakrabarti, C. D. Fegan, and A. D. Osterhaus.** 2003. Human metapneumovirus in a haematopoietic stem cell transplant recipient with fatal lower respiratory tract disease. *Bone Marrow Transplant.* **31**:309-310.
8. **Cooper, D. A., and J. M. Lange.** 2004. Peptide inhibitors of virus-cell fusion: enfuvirtide as a case study in clinical discovery and development. *Lancet Infect Dis.* **4**:426-436.
9. **Cseke, G., D. W. Wright, S. J. Tollefson, J. E. Johnson, J. E. Crowe, Jr., and J. V. Williams.** 2007. Human metapneumovirus fusion protein vaccines that are immunogenic and protective in cotton rats. *J Virol.* **81**:698-707.
10. **Darniot, M., T. Petrella, S. Aho, P. Pothier, and C. Manoha.** 2005. Immune response and alteration of pulmonary function after primary human metapneumovirus (hMPV) infection of BALB/c mice. *Vaccine.* **23**:4473-4480.
11. **Deffrasnes, C., M. E. Hamelin, and G. Boivin.** 2007. Human metapneumovirus. *Semin Respir Crit Care Med.* **28**:213-221.
12. **Easton, A. J., J. B. Domachowske, and H. F. Rosenberg.** 2004. Animal pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* **17**:390-412.
13. **Englund, J. A., M. Boeckh, J. Kuypers, W. G. Nichols, R. C. Hackman, R. A. Morrow, D. N. Fredricks, and L. Corey.** 2006. Brief communication: fatal human

- metapneumovirus infection in stem-cell transplant recipients. *Ann Intern Med.* **144**:344-349.
14. **Hamelin, M. E., G. A. Prince, and G. Boivin.** 2006. Effect of ribavirin and glucocorticoid treatment in a mouse model of human metapneumovirus infection. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**:774-777.
 15. **Hamelin, M. E., G. A. Prince, A. M. Gomez, R. Kinkead, and G. Boivin.** 2006. Human metapneumovirus infection induces long-term pulmonary inflammation associated with airway obstruction and hyperresponsiveness in mice. *J Infect Dis.* **193**:1634-1642.
 16. **Hamelin, M. E., K. Yim, K. H. Kuhn, R. P. Cragin, M. Boukhvalova, J. C. Blanco, G. A. Prince, and G. Boivin.** 2005. Pathogenesis of human metapneumovirus lung infection in BALB/c mice and cotton rats. *J Virol.* **79**:8894-8903.
 17. **Joshi, S. B., R. E. Dutch, and R. A. Lamb.** 1998. A core trimer of the paramyxovirus fusion protein: parallels to influenza virus hemagglutinin and HIV-1 gp41. *Virology.* **248**:20-34.
 18. **Kilby, J. M., and J. J. Eron.** 2003. Novel therapies based on mechanisms of HIV-1 cell entry. *N Engl J Med.* **348**:2228-2238.
 19. **Kilby, J. M., S. Hopkins, T. M. Venetta, B. DiMassimo, G. A. Cloud, J. Y. Lee, L. Alldredge, E. Hunter, D. Lambert, D. Bolognesi, T. Matthews, M. R. Johnson, M. A. Nowak, G. M. Shaw, and M. S. Saag.** 1998. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med.* **4**:1302-1307.
 20. **Krambovitis, E., F. Porichis, and D. A. Spandidos.** 2005. HIV entry inhibitors: a new generation of antiretroviral drugs. *Acta Pharmacol Sin.* **26**:1165-1173.
 21. **Lamb, R. A., R. G. Paterson, and T. S. Jardetzky.** 2006. Paramyxovirus membrane fusion: lessons from the F and HN atomic structures. *Virology.* **344**:30-37.
 22. **Lambert, D. M., S. Barney, A. L. Lambert, K. Guthrie, R. Medinas, D. E. Davis, T. Bucy, J. Erickson, G. Merutka, and S. R. Petteway, Jr.** 1996. Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:2186-2191.
 23. **Lawless-Delmedico, M. K., P. Sista, R. Sen, N. C. Moore, J. B. Antczak, J. M. White, R. J. Greene, K. C. Leanza, T. J. Matthews, and D. M. Lambert.** 2000. Heptad-repeat regions of respiratory syncytial virus F1 protein form a six-membered coiled-coil complex. *Biochemistry.* **39**:11684-11695.
 24. **Lomask, M.** 2006. Further exploration of the Penh parameter. *Exp Toxicol Pathol.* **57 Suppl 2**:13-20.
 25. **Lu, M., S. C. Blacklow, and P. S. Kim.** 1995. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat Struct Biol.* **2**:1075-1082.
 26. **Mackay, I. M., S. Bialasiewicz, Z. Waliuzzaman, G. R. Chidlow, D. C. Fegredo, S. Laingam, P. Adamson, G. B. Harnett, W. Rawlinson, M. D. Nissen, and T. P. Sloots.** 2004. Use of the P gene to genotype human metapneumovirus identifies 4 viral subtypes. *J Infect Dis.* **190**:1913-1918.
 27. **Maertzdorf, J., C. K. Wang, J. B. Brown, J. D. Quinto, M. Chu, M. de Graaf, B. G. van den Hoogen, R. Spaete, A. D. Osterhaus, and R. A. Fouchier.** 2004.

- Real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of human metapneumoviruses from all known genetic lineages. *J Clin Microbiol.* **42**:981-986.
28. **Miller, S. A., S. Tollefson, J. E. Crowe, Jr., J. V. Williams, and D. W. Wright.** 2007. Examination of a fusogenic hexameric core from human metapneumovirus and identification of a potent synthetic peptide inhibitor from the heptad repeat 1 region. *J Virol.* **81**:141-149.
 29. **Morrison, T. G.** 2003. Structure and function of a paramyxovirus fusion protein. *Biochim Biophys Acta.* **1614**:73-84.
 30. **Morrow, B. M., M. Hatherill, H. E. Smuts, J. Yeats, R. Pitcher, and A. C. Argent.** 2006. Clinical course of hospitalised children infected with human metapneumovirus and respiratory syncytial virus. *J Paediatr Child Health.* **42**:174-178.
 31. **Njenga, M. K., H. M. Lwamba, and B. S. Seal.** 2003. Metapneumoviruses in birds and humans. *Virus Res.* **91**:163-169.
 32. **Peret, T. C., G. Boivin, Y. Li, M. Couillard, C. Humphrey, A. D. Osterhaus, D. D. Erdman, and L. J. Anderson.** 2002. Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. *J Infect Dis.* **185**:1660-1663.
 33. **Porotto, M., L. Doctor, P. Carta, M. Fornabaio, O. Greengard, G. E. Kellogg, and A. Moscona.** 2006. Inhibition of hendra virus fusion. *J Virol.* **80**:9837-9849.
 34. **Prince, G. A., J. P. Prieels, M. Slaoui, and D. D. Porter.** 1999. Pulmonary lesions in primary respiratory syncytial virus infection, reinfection, and vaccine-enhanced disease in the cotton rat (*Sigmodon hispidus*). *Lab Invest.* **79**:1385-1392.
 35. **Pyrc, K., B. J. Bosch, B. Berkhout, M. F. Jebbink, R. Dijkman, P. Rottier, and L. van der Hoek.** 2006. Inhibition of human coronavirus NL63 infection at early stages of the replication cycle. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**:2000-2008.
 36. **Russell, C. J., T. S. Jardetzky, and R. A. Lamb.** 2001. Membrane fusion machines of paramyxoviruses: capture of intermediates of fusion. *Embo J.* **20**:4024-4034.
 37. **Skiadopoulos, M. H., S. Biacchesi, U. J. Buchholz, J. M. Riggs, S. R. Surman, E. Amaro-Carambot, J. M. McAuliffe, W. R. Elkins, M. St Claire, P. L. Collins, and B. R. Murphy.** 2004. The two major human metapneumovirus genetic lineages are highly related antigenically, and the fusion (F) protein is a major contributor to this antigenic relatedness. *J Virol.* **78**:6927-6937.
 38. **Smith, B. J., M. C. Lawrence, and P. M. Colman.** 2002. Modelling the structure of the fusion protein from human respiratory syncytial virus. *Protein Eng.* **15**:365-371.
 39. **Ulbrandt, N. D., H. Ji, N. K. Patel, J. M. Riggs, Y. A. Brewah, S. Ready, N. E. Donacki, K. Folliot, A. S. Barnes, K. Senthil, S. Wilson, M. Chen, L. Clarke, M. MacPhail, J. Li, R. M. Woods, K. Coelingh, J. L. Reed, M. P. McCarthy, D. S. Pfarr, A. D. Osterhaus, R. A. Fouchier, P. A. Kiener, and J. A. Suzich.** 2006. Isolation and characterization of monoclonal antibodies which neutralize human metapneumovirus in vitro and in vivo. *J Virol.* **80**:7799-7806.
 40. **van den Hoogen, B. G., T. M. Bestebroer, A. D. Osterhaus, and R. A. Fouchier.** 2002. Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology.* **295**:119-132.

41. **van den Hoogen, B. G., J. C. de Jong, J. Groen, T. Kuiken, R. de Groot, R. A. Fouchier, and A. D. Osterhaus.** 2001. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med.* **7**:719-724.
42. **van den Hoogen, B. G., S. Herfst, L. Sprong, P. A. Cane, E. Forleo-Neto, R. L. de Swart, A. D. Osterhaus, and R. A. Fouchier.** 2004. Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. *Emerg Infect Dis.* **10**:658-666.
43. **Vargas, S. O., H. P. Kozakewich, A. R. Perez-Atayde, and A. J. McAdam.** 2004. Pathology of human metapneumovirus infection: insights into the pathogenesis of a newly identified respiratory virus. *Pediatr Dev Pathol.* **7**:478-486; discussion 421.
44. **Wang, E., X. Sun, Y. Qian, L. Zhao, P. Tien, and G. F. Gao.** 2003. Both heptad repeats of human respiratory syncytial virus fusion protein are potent inhibitors of viral fusion. *Biochem Biophys Res Commun.* **302**:469-475.
45. **Wang, X. J., Y. D. Bai, G. Z. Zhang, J. X. Zhao, M. Wang, and G. F. Gao.** 2005. Structure and function study of paramyxovirus fusion protein heptad repeat peptides. *Arch Biochem Biophys.* **436**:316-322.
46. **Wild, C. T., D. C. Shugars, T. K. Greenwell, C. B. McDanal, and T. J. Matthews.** 1994. Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**:9770-9774.
47. **Williams, J. V., Z. Chen, G. Cseke, D. W. Wright, C. J. Keefer, S. J. Tollefson, A. Hessel, A. Podsiad, B. E. Shepherd, P. P. Sanna, D. R. Burton, J. E. Crowe, Jr., and R. A. Williamson.** 2007. A Recombinant Human Monoclonal Antibody to Human Metapneumovirus Fusion Protein that Neutralizes Virus in Vitro and is Effective Therapeutically in Vivo. *J Virol.* **81**:8315-8324.
48. **Yao, Q., and R. W. Compans.** 1996. Peptides corresponding to the heptad repeat sequence of human parainfluenza virus fusion protein are potent inhibitors of virus infection. *Virology.* **223**:103-112.
49. **Yin, H. S., R. G. Paterson, X. Wen, R. A. Lamb, and T. S. Jardetzky.** 2005. Structure of the uncleaved ectodomain of the paramyxovirus (hPIV3) fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**:9288-9293.

TABLE 1. Amino acid sequences and IC₅₀ values of HRA- and HRB-derived peptides from the hMPV F protein.

Peptide	Length (aa) ^a	Sequence	IC ₅₀ values (nM) against hMPV A1 ^b
HRA ^c	43	TIRLESEVTAIKNALKKTNEAVSTLGNQVVRVLATAVRELKDFV	
HRA1	43	TIRLESEVTAIKNALKKTNEAVSTLGNQVVRVLATAVRELKDFV	177
HRA2	48	AKTIRLESEVTAIKNALKKTNEAVSTLGNQVVRVLATAVRELKDFVSKN	2.1
HRA3	35	LESEVTAIKNALKKTNEAVSTLGNQVVRVLATAVRE	3240
HRB ^c	28	NVALDQVFESIENSQALVDQSNRILSSA	
HRB1	28	NVALDQVFESIENSQALVDQSNRILSSA	>9000
HRB2	30	FNVALDQVFESIENSQALVDQSNRILSSAE	>9000
HRB3	33	FNVALDQVFESIENSQALVDQSNRILSSAEKGN	>9000
HRB4	43	SSFDPVKFPEDQFNVALDQVFESIENSQALVDQSNRILSSAEK	>9000
HRB5	35	FNVALDQVFESIENSQALVDQSNRILSSAEKGNTG	1520
HRB6	39	PEDQFNVALDQVFESIENSQALVDQSNRILSSAEKGNTG	3310
pET30a empty vector	52	MHHHHHHSSGLVPRGSGMKETAATAAKFERQHMDSPDLGTDDDDKAMADIGSEF	>9000

^a Sequences were 52 aa longer when produced with the pET30a vector in *E. coli*.

^b Data (from one assay) obtained by real-time PCR.

^c From hMPV strain C-85473 strain (A1 subgroup).

TABLE 2. IC₅₀ values of peptide HRA2 against strains from the four hMPV subgroups.

Peptide, method of production (assay)	IC ₅₀ value (nM) against:				Mean IC ₅₀ (nM) ± SD for all subgroup results
	hMPV A1	hMPV A2	hMPV B1	hMPV B2	
HRA2 pET30a (PCR) ^a	2.1 nM	11.9 nM	7.1 nM	1.7 nM	5.7 ± 4.8 nM
HRA2 pET30a (Plaque assay) ^a	1.6 nM	2.6 nM	1.4 nM	2.9 nM	2.1 ± 0.7 nM
HRA2 synthetic (PCR) ^a	29.3 nM	ND ^b	ND	ND	ND
HRA2 synthetic (Plaque assay) ^c	19.0 ± 5.5 nM	22.0 ± 14.1 nM	16.6 ± 8.3 nM	9.7 ± 2.4 nM	16.8 ± 5.2 nM

^aData are from one experiment.

^bND, not done.

^cValues are the means of the results of two independent experiments. Errors are expressed as standard deviation.

TABLE 3. IC₅₀ of HRA2 peptide against hMPV group A1 when added at different time points in the plaque assay experiment.

Peptide addition time point ^a	IC ₅₀ (nM) ^b	Fusion event assayed for inhibition	
		Virus-cell	Cell-cell
Virus adsorption and overlay	20.1 ± 6.3	X	X
Overlay	>250		X
Virus adsorption	27.5 ± 7.0	X	

^a hMPV adsorption was performed for 1.5 h, and methylcellulose overlay was in place for 3 to 4 days.

^b Values are the means of the results obtained from two independent experiments, with errors expressed as standard deviations.

Figure Legends

Figure 1. (A) Body weight loss in groups of treated and untreated mice (6 mice/group). The weight of mice was evaluated on a daily basis until day 5 postinfection. (B) Mean lung viral titers on day 5 postinfection. *, Results are statistically different ($P < 0.05$) from those for infected, untreated mice (hMPV only). The error bars indicate SEM.

Figure 2. Airway obstruction in groups of treated and untreated mice (6 mice/group). The degree of airway obstruction as measured by the P_{enh} value was evaluated on day 5 postinfection. *, Results are statistically different ($P < 0.05$) from those infected, untreated mice (hMPV only). The error bars indicate SEM.

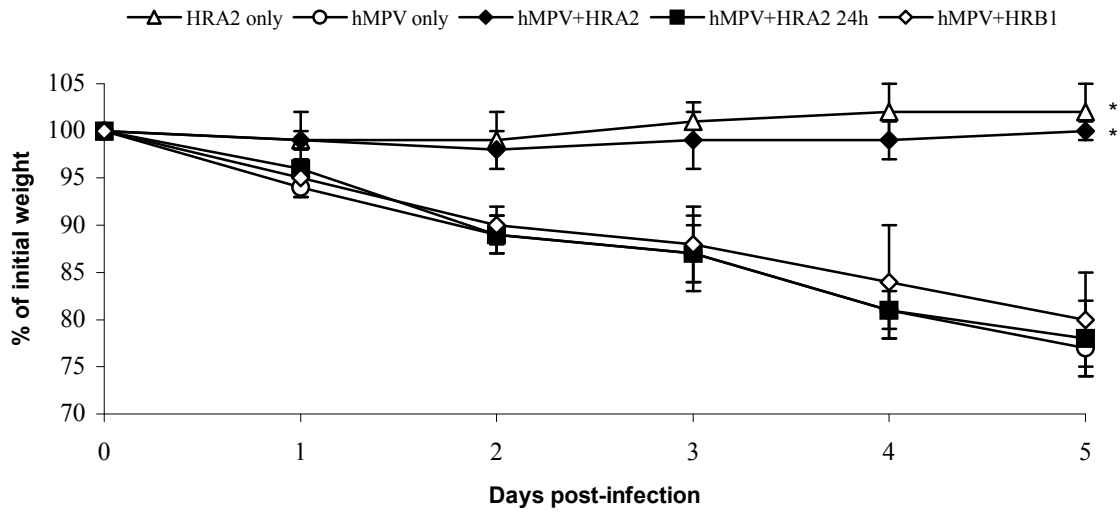
Figure 3. Pulmonary levels of the cytokines and chemokines RANTES, MCP-1, and IFN- γ in mice (6 mice/group). The levels of the different cytokines/chemokines in lungs of treated and untreated mice were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. *, Results are statistically different ($P < 0.05$) from those infected, untreated mice (hMPV only). The error bars indicate SEM.

Figure 4. Lung inflammation on day 5 postinfection in groups of treated and untreated mice (6 mice/group). (A) Lung were removed and fixed with 10% buffered formalin. Histopathological scores were determined based on peribronchiolar, perivascular, interstitial, and alveolar inflammation. (B) Five-micrometer sections of paraffin-embedded lung tissues stained with hematoxylin/eosin. A representative sections (10X enlargement) is shown for each group.

Figure 5. Alignment of the HRA and HRB amino acid sequences from hMPV group A1, A2, B1, and B2, as well as from hRSV (strain A2) and hPIV-3 fusion proteins. The sequences were aligned using ClustalW with BioEdit software (version 7.0.5.2.). **(A)** Alignment of hMPV, hRSV, and hPIV-3 HRA sequences. Grey letters are amino acids added to the HRA sequence to form the HRA2 peptide. **(B)** Alignment of hMPV, hRSV, and hPIV-3 HRB sequences. **(C)** Amino acid identity for HRA, HRA2, and HRB sequences of hMPV, hRSV, and hPIV-3 fusion protein sequences. hMPV clinical strains C-85473 and NL-001 (GenBank AF371337) were used as representatives of the hMPV A1 group; hMPV Can97-83 (GenBank AY145296) was used as representative of the hMPV A2 group; hMPV Can97-82 (GenBank AY145295) was used as representative of the hMPV B1 group; hMPV Can98-75 (GenBank AY145289) was used as representative of the hMPV B2 group; hRSV strain A2 (GenBank M11486) and hPIV-3 (GenBank M14892) were also used in this alignment.

Figure 1.

A)



B)

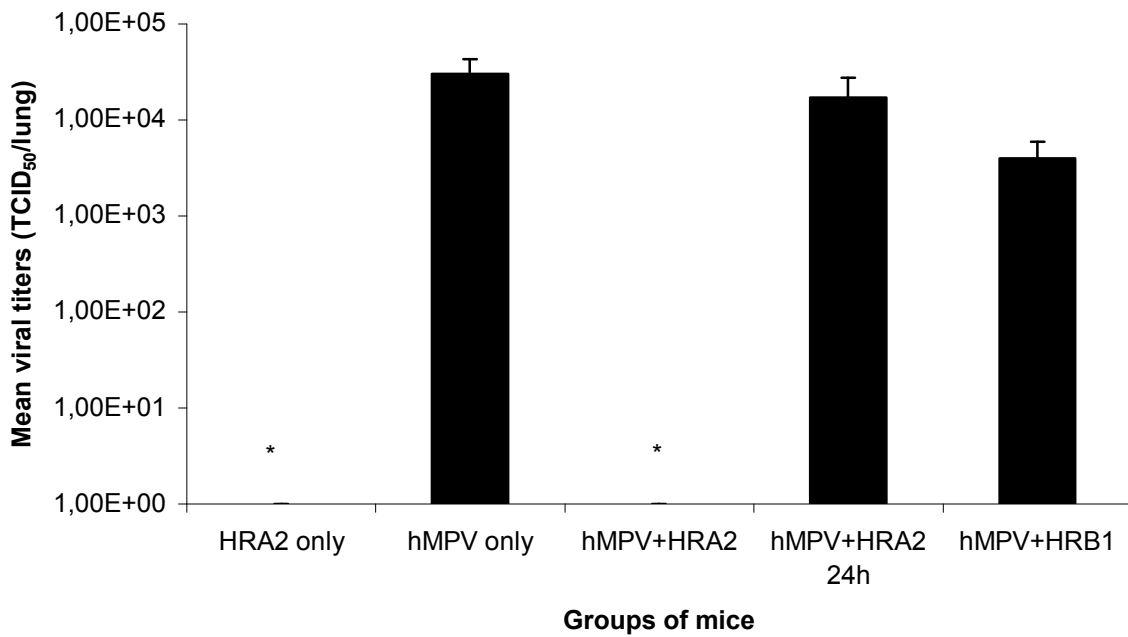


Figure 2.

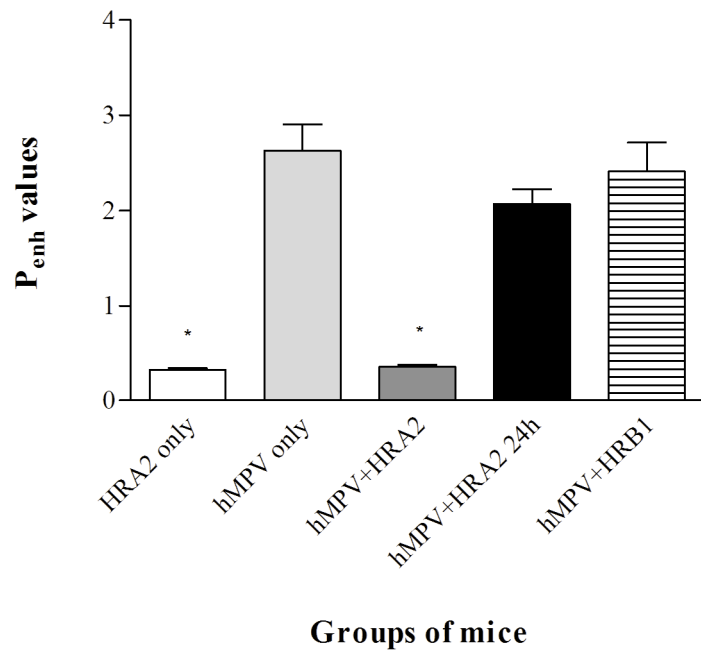


Figure 3.

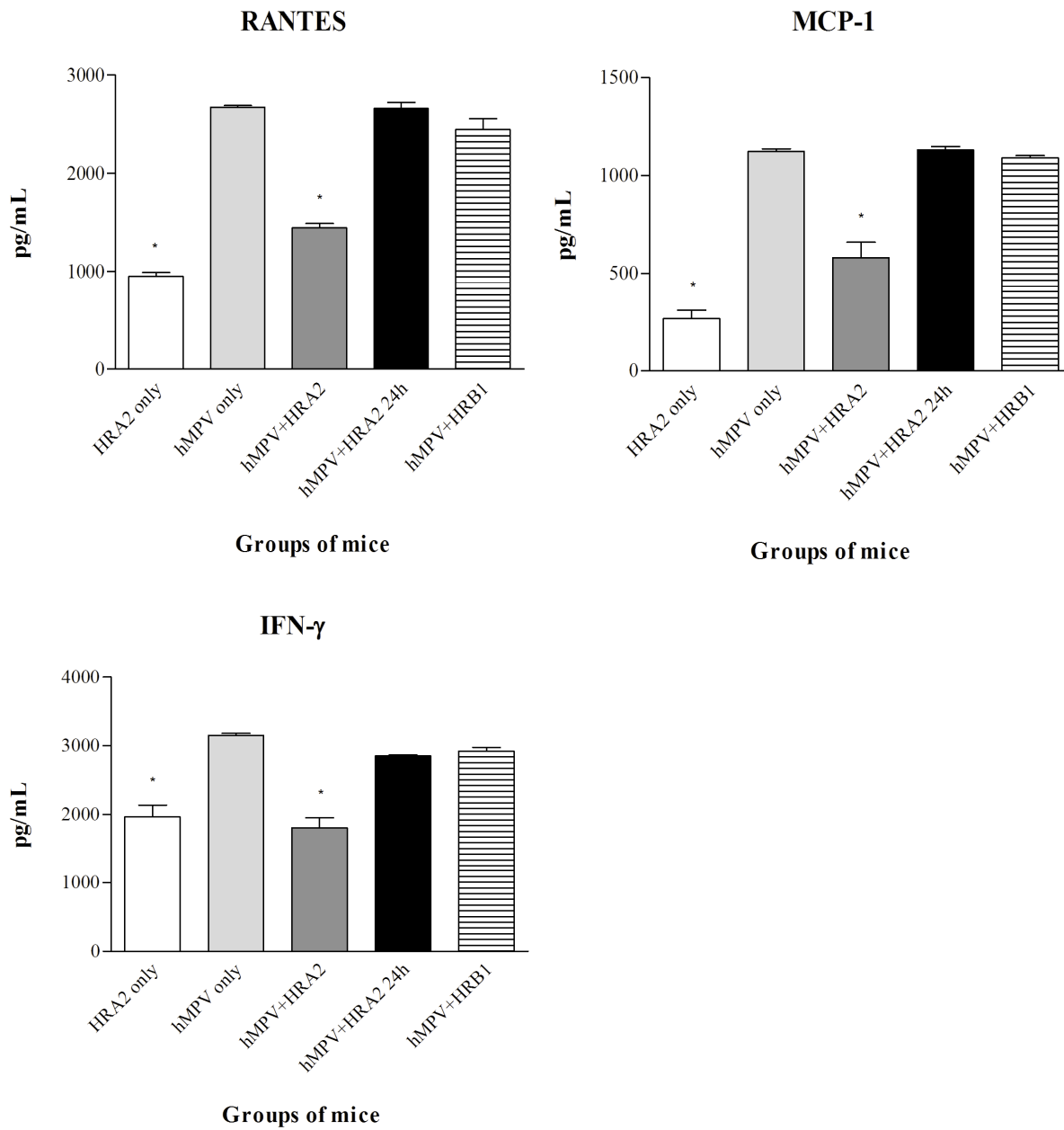


Figure 4.

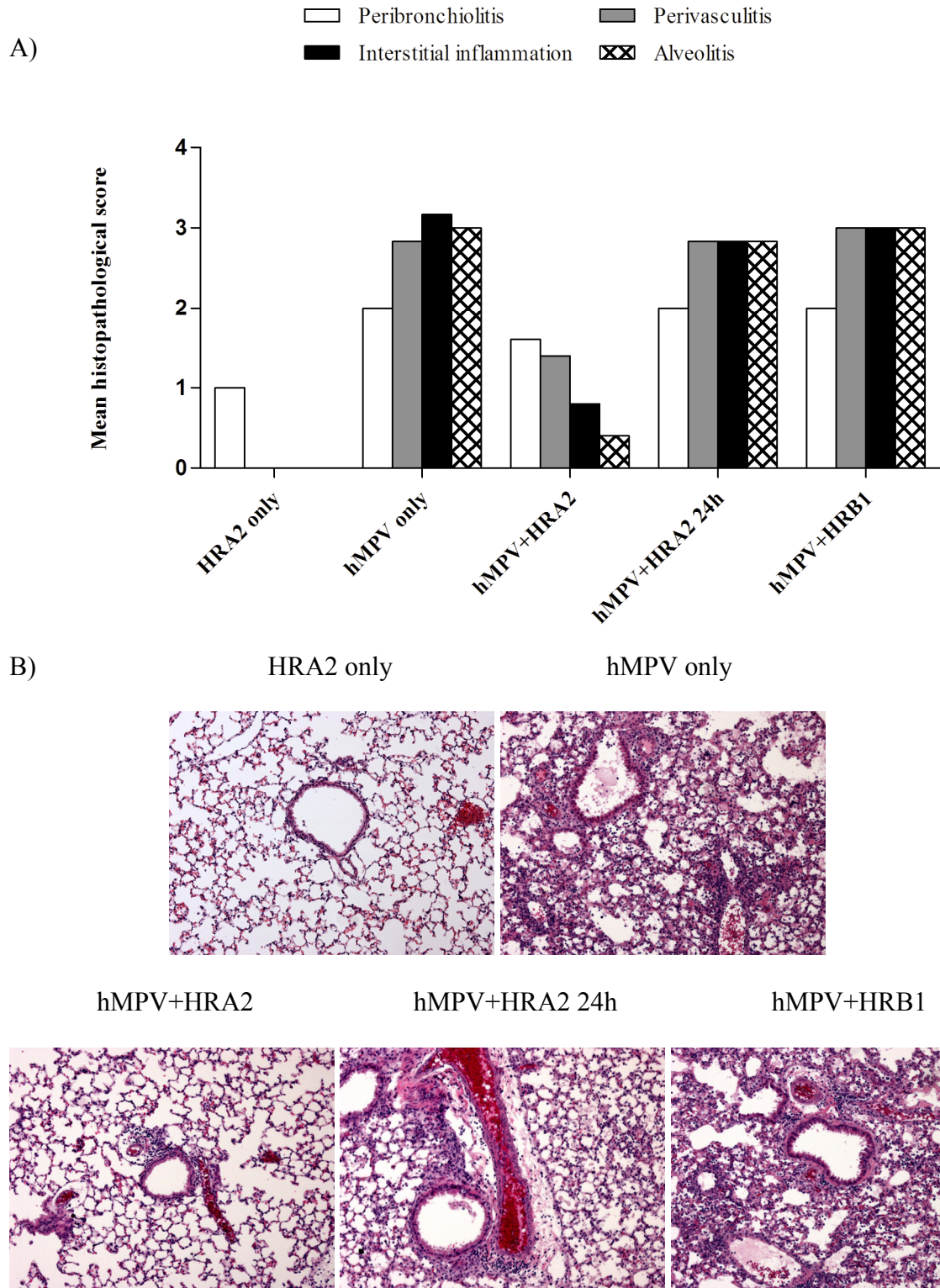


Figure 5.

A) HRA sequence homology

```

                10      20      30      40
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
hMPV A1 C-85473  ARTIRLESEVTAIKNALKKTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKN
hMPV A1 NL00-1  .....
hMPV A2 CAN97-83 .....T.....
hMPV B1 CAN97-82 .....N..G..Q.....E.....
hMPV B2 CAN98-75 .....N..G..T.....E.....
hRSV A2        S.VLH..G..NK..S..LS..K..VS.S...S..TSK.LD..NYID.Q
hPIV-3        VEAKQAR.DIEKLE.IRD..K..QSVQSSIGN.IV.IKSVQ.Y.N.E

```

B) HRB sequence homology

```

                10      20
.....|.....|.....|.....|.....|.....
hMPV A1 C-85473  NVALDQVFESIENSQALVDQSNRILSSA
hMPV A1 NL00-1  .....
hMPV A2 CAN97-83 .....N.....
hMPV B1 CAN97-82 .....K..N..
hMPV B2 CAN98-75 .....K..N..
hRSV A2        DASIS..N.K.NQ.L.FIRK.DEL.HNV
hPIV-3        SIE.NKAKSDL.E.KEWIRK..QK.D.I

```

C)

A.A.Sequence Identity ¹	hMPV A1	hMPV A2	hMPV B1	hMPV B2	hRSV A2	hPIV-3
HRA sequence	100%	97.7%	90.7%	90.7%	48.8%	25.6%
HRA2 peptide sequence	100%	97.9%	91.7%	91.7%	47.9%	25.0%
HRB sequence	100%	96.4%	92.9%	92.9%	28.6%	25.0%

¹ Compared with hMPV C-85473 strain sequence (A1 subgroup).

Chapitre IV. Inhibition de la réplication du Métapneumovirus humain par de petits ARN interférants

Cet article a été publié en octobre 2008 dans la revue *Antiviral Therapy* (volume 13, numéro 6, pages 821-832). Il s'agit d'un article pleine longueur.

1. Résumé

Durant cette étude, nous avons évalué le potentiel inhibiteur de nombreux siRNAs identifiés à partir de la majorité des séquences codantes du génome du hMPV. La première étape a consisté en une analyse informatique visant à éliminer les candidats les moins favorables. Ensuite, 200 siRNAs ont été évalués *in vitro* à l'aide d'un système de gène rapporteur (luciférase). Cette étape ne requérait pas la croissance du hMPV. Cinquante-sept siRNAs ont ainsi été identifiés comme ayant une capacité d'inhibition post-transcriptionnelle. Ces siRNAs ont alors été testés à deux concentrations (10 et 100 nM) en présence du hMPV dans un modèle de réplication *in vitro* suivi d'une quantification du surnageant par RT-PCR en temps réel. Dix siRNAs ayant démontré une inhibition >80% de la réplication du hMPV ont été conservés et la concentration inhibitrice 50% (CI₅₀) a été déterminée pour chaque siRNAs. Deux siRNAs hautement inhibiteurs pour le hMPV ont été subséquemment sélectionnés. Des versions plus longues (25/27 bases) nommées substrats de Dicer ont aussi été produites à partir de la séquence de ces deux siRNAs. Le siRNA45 cible spécifiquement l'ARNm codant pour la protéine N du hMPV alors que le siRNA60 cible l'ARNm codant pour la protéine P de ce virus. Ces deux siRNAs et les substrats de Dicer correspondants affichent des valeurs de IC₅₀ variant de 0.090 nM à <0.078 nM. De plus, ces molécules sont efficaces à des niveaux comparables contre des souches représentant les quatre sous-types de hMPV. Cette étude nous a également permis d'évaluer l'impact d'une divergence de séquence entre le siRNA et sa cible. Nous avons démontré que la présence d'un ou deux nucléotides discordants entre le siRNA et sa cible peut entraîner une perte d'efficacité *in vitro* mais peut également être bien tolérée. L'emplacement et le type de nucléotides impliqués dans cette discordance semblent être importants. Cette étude est donc la première démonstration que des siRNAs peuvent être utilisés comme molécule antivirale pour contrôler l'infection par le hMPV *in vitro* du moins.

2. Contributions des auteurs

- Céline Deffrasnes -Rédaction de cet article
- Productions virales
 - Tests d'inhibition du hMPV par RT-PCR quantitatif, par titration en plaque et marquage par anticorps et par « virus yield assay »
 - Tests de cytotoxicité
 - Analyses statistiques
- Marie-Hélène Cavanagh -Assistance technique pour le « virus yield assay »
- Nathalie Goyette -Assistance technique pour certains PCR
- Kunyuan Cui / Qing Ge / Shaguna Seth / Michael V. Templin / Steven C. Quay / Paul H. Johnson
- Design des siRNAs
 - Essais luciférase
 - Correction de l'article
- Guy Boivin
- Supervision du projet de recherche
 - Correction de l'article

3.Article

Title: Inhibition of Human Metapneumovirus Replication by Small Interfering RNA (siRNA).

Running title: Human metapneumovirus inhibition by siRNA

Céline Deffrasnes¹, Marie-Hélène Cavanagh¹, Nathalie Goyette¹, Kunyuan Cui², Qing Ge^{2,3}, Shaguna Seth², Michael V. Templin², Steven C. Quay², Paul H. Johnson^{2,4} and Guy Boivin^{1*}.

¹ Infectious Disease Research Center of the “Centre Hospitalier Universitaire de Québec” and Laval University, Quebec City, QC, Canada.

² Nastech Pharmaceutical Company Inc, Bothell, WA, USA

³ Current address: Somagenics, Inc. Santa Cruz, CA, USA; ⁴ Current address: PhaseRx Pharmaceuticals, Seattle, WA, USA

Abstract word count: 233

Text word count: 4634

*Corresponding author:

Dr Guy Boivin

CHUQ-CHUL, room RC-709

2705 Blvd Laurier, Québec,

Québec, Canada G1V 4G2

Tel: (418) 654-2705

Fax: (418) 654-2715

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

Alternate corresponding author:

Celine Deffrasnes

CHUQ-CHUL, room RC-709

2705 Blvd Laurier, Québec,

Québec, Canada G1V 4G2

Tel: (418) 654-2705

Fax: (418) 654-2715

E-mail: celine.deffrasnes@crchul.ulaval.ca

Abstract

Human metapneumovirus (hMPV) is a major respiratory viral pathogen in young children, elderly subjects and immunocompromised patients. Despite its major impact related to bronchiolitis, pneumonia and its potential role in recurrent wheezing episodes, there is still no commercial treatment or vaccine available against this paramyxovirus. We tested a therapeutic strategy for hMPV based on RNA interference (RNAi). A hMPV genome-wide search for small interfering RNAs (siRNAs) by computational analysis revealed 200 potentially effective 21-mer siRNAs. Initial screening with a luciferase-based assay identified 57 siRNAs of interest. Further evaluation of their inhibitory potential against the four hMPV subgroups by quantitative real-time RT-PCR and plaque immunoassay identified two highly potent siRNAs with 50% inhibitory concentration (IC_{50}) values in the subnanomolar range. SiRNA45 targets the nucleoprotein mRNA and had IC_{50} values <0.078 nM against representative strains from the four hMPV subgroups while siRNA60, which targets the phosphoprotein mRNA, had IC_{50} values between 0.090 nM and <0.078 nM against the same panel of hMPV strains. Longer 25/27-mer siRNAs known as Dicer substrates designed from the top two siRNA candidates were also evaluated and were at least as effective as their corresponding 21-mer siRNAs. Interestingly, the presence of 1 or 2-nt mismatches in the target mRNA sequence of some hMPV subgroups did not always affect hMPV inhibition *in vitro*. In conclusion, we successfully identified two highly efficient siRNAs against hMPV targeting essential components of the hMPV replication complex.

Keywords: human metapneumovirus, inhibition, siRNA, Dicer substrates, mismatches.

Introduction

Human metapneumovirus (hMPV) was first identified in the Netherlands in 2001 [1] and has been reported worldwide since then [2, 3]. hMPV is mainly associated with pneumonia and bronchiolitis or bronchitis in young children, elderly patients and immunocompromised subjects while immunocompetent adults present mostly flu-like illnesses or cold symptoms [2, 4]. hMPV infections account for about 5 to 10% of hospitalizations of young infants suffering from acute respiratory tract infections [2]. Moreover, hMPV outbreaks have been reported in long-term care facilities [5, 6]. Based on findings from a mouse model [7] and a recent study in young infants [8], hMPV infections could be associated with long-term effects such as recurring wheezing episodes and asthma. There are two major lineages of hMPV (A and B) that often co-circulate during the same winter-spring period in temperate countries. These two groups can be further subdivided into additional subgroups: A1, A2, B1, and B2 based on genomic analysis [2, 3, 9-12].

hMPV contains a nonsegmented single-stranded negative-sense RNA genome of 13.3 kb and belongs to the *Metapneumovirus* genus within the *Paramyxoviridae* family. Its genome contains eight genes coding for nine proteins in the order 3'-N-P-M-F-M2.1-M2.2-SH-G-L-5' [13]. Based on previous paramyxovirus studies [14-16], hMPV gene expression should follow a transcriptional gradient, i.e., the nucleoprotein gene (N) is transcribed first and in larger amounts than the polymerase (L) gene, which is expressed last and in very small amounts. The N, P (phosphoprotein) and L proteins form the functional polymerase complex required for hMPV transcription and replication [15, 16]. These proteins are considered good targets for antiviral drug development since they are essential for hMPV replication and less subject to

immunological pressure than the surface proteins, i.e., F (fusion), G (attachment), and SH (small hydrophobic) proteins [17-19].

Since no vaccines are currently available to prevent hMPV infections, there is an important need for developing efficient antiviral agents. One promising technology involves RNA interference (RNAi) [16]. RNAi is a mechanism of post-transcriptional gene silencing found in almost all eukaryotes and is known to confer natural antiviral protection in plants [20, 21]. RNAi is triggered by endogenous small non-coding microRNAs (miRNAs) or small interfering RNAs (siRNAs) exogenously introduced in cells. While miRNAs mostly induce repression of messenger RNA (mRNA) translation, siRNAs instead lead to cleavage of the target mRNA. Sequence specific double-stranded siRNA molecules of 19-21 nucleotides can efficiently elicit degradation of the cognate mRNAs through the RNA Induced Silencing Complex (RISC) located in the cytoplasm and thus suppress the expression of the corresponding proteins [16]. In the endogenous pathway, long primary miRNAs (pri-miRNAs) are processed in the nucleus into pre-miRNAs by an RNase III enzyme called Drosha, and then exported to the cytoplasm where Dicer, another RNase III enzyme, further shortens the pre-miRNAs in miRNAs. Similarly, exogenously-introduced long double stranded RNA (dsRNA) can be processed by Dicer into siRNA [22]. SiRNA duplex consists of a passenger strand (sense strand) and a guide strand (antisense strand). When the latter is integrated into RISC, it allows for mRNA pairing and subsequent degradation. The 5' region of the siRNA guide strand, mainly nucleotides 2-8 named the seed region, is responsible for recognition and pairing to the target mRNA, while positions 10 and 11 are critical for the cleavage of the mRNA by RISC [23-25]. In the context of a viral infection, delivery of siRNA to infected cells could inhibit viral mRNA translation to proteins and thus virus replication. Reports on hRSV, avian metapneumovirus (aMPV) and influenza virus inhibition by siRNA have demonstrated a great potential for this novel and specific nucleic

acid-based therapy for respiratory viral infections [26-35]. In this study, we aimed to identify highly efficient siRNAs that inhibit hMPV replication from a pool of siRNAs covering most of the coding sequences within the hMPV genome.

Materials and Methods

Cell lines and viruses. LLC-MK2 (rhesus monkey kidney) and HEP-2 (human laryngeal carcinoma) cells were grown in minimum essential medium (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Wisent, St-Bruno, Québec, Canada). A549 (human lung carcinoma) were grown in Ham's F12K medium (Invitrogen) containing 10% FBS. The hMPV clinical strains C-85473 (group A1), CAN97-83 (group A2), CAN97-82 (group B1) and CAN98-75 (group B2) were used in this study.

Virus quantification. LLC-MK2 cells were infected with hMPV using Opti-MEM (Invitrogen) containing 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of trypsin (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) until maximal cytopathic effects were noted. Supernatant was collected and virus titer was reported as 50% tissue culture infectious dose (TCID_{50}) per milliliter (mL) or plaque forming units (PFU) per mL by immunostaining [36].

SiRNA design and synthesis. Sequence alignment of hMPV sequences using CAN98-75 (GenBank AY297748.1) as the base sequence along with two other hMPV full length genome sequences available in GenBank (AF371337 and AY297749) and one from our laboratory (C-85473) was carried out using ClustalW2 to find conserved regions among viral strains. Algorithms available in the public domain (<http://www.dharmacon.com/DesignCenter/DesignCenterPage.aspx>; <http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext>) were used to identify 200 siRNA sequences. The criteria for selecting sequences were as follows: A to G and C to U mismatches (sense strand) were

allowed in any position, G to A or C to A mismatches (sense strand) were not allowed in any position other than 1, 18 and 19. Positions 10 to 17 (sense strand) should have no or 1 mismatch and positions 1 to 9 on the sense strand were allowed 2 to 3 mismatches. No GGGG, CCCC, AAAA, TTTT, or SSSS (G or C) stretches or stretches longer than 4 nucleotides were allowed in any position. siRNAs were synthesized by IDT Inc (Coralville, IA, USA) at 10 nM scale and purified by RNase-Free HPLC so that the full length 21-mer siRNA products constituted greater than 85% of the total yield and the remaining impurities were smaller fragments which are inefficient in RISC-associated RNA interference. All siRNAs were double stranded and contained 19 RNA bases and two chimeric DNA base overhangs at the 3' terminus for each strand. None of the siRNAs were chemically modified. For testing, siRNAs were resuspended at 100 μ M and 5 μ M concentrations in a Rnase-Free Duplex Buffer containing 100 mM potassium acetate and 30 mM HEPES at pH 7.5. A siRNA sequence with no known target within the mammalian genome (sense: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT-3') (synthesized by Dharmacon Inc, Lafayette, CO) or a Dicer substrate scrambled siRNA (sense: 5'-CUUCCUCUCUUUCUCUCCCUUGUGdA-3') served as negative controls in all experiments. Longer 25/27-mer Dicer substrate siRNAs were designed and synthesized (Nastech Pharmaceutical Co., Inc., Bothell, WA) based on the most potent 21-mer (RISC substrates) siRNAs. Dicer substrate siRNAs contained 23 RNA bases and two chimeric DNA bases at their 3' terminus for their sense strand while their anti-sense strand contained 27 RNA bases. No chemical modification of these Dicer substrate siRNAs was made.

Luciferase-based assay. hMPV gene fragments (N, P, F, M2, L), corresponding to each target region, were cloned in psiCHECK2 vector (Promega, Madison, WI, USA) and the accuracy was verified by sequencing. Vector (100 ng) and corresponding siRNA (10 nM) were cotransfected (in triplicate) in 85% confluent A549 cells in 96-well plates using Lipofectamine

2000 (Invitrogen) according to manufacturer's guidelines. At 24 h post-transfection, Dual-Glo Luciferase Reagent (Promega) was added to the well and incubated for 10 min before quantification of firefly luciferase activity using a Microlite Luminescence Microtiter (Thermo labsystems, Milford, MA, USA). Dual-Glo Stop & Glo Reagent (Promega) was then added to the well, and renilla luciferase activity was quantified after 10 min. Ratios of dual-luciferase activity were determined to normalize renilla luciferase values and siRNAs showing >40% reduction in renilla luciferase activity were selected for further evaluation.

Quantitative RT-PCR-based assay for hMPV inhibition. 95% confluent LLC-MK2 cells in 24-well plates were transfected with different siRNAs in 300 μ L/well of Opti-MEM using 1.5 μ L/well of Lipofectamine 2000. Each siRNA was transfected in triplicate. The medium was removed after 5 h and 500 μ L of infection medium containing 10^7 TCID₅₀ of hMPV in Opti-MEM with 2 μ g/mL of trypsin were added to the cells for 1.5 h. The medium was then replaced with fresh one containing no virus, and cells were incubated for three days. Supernatants were collected and stored at -80°C until viral RNA extraction and quantification using a real-time reverse transcription-PCR assay for the hMPV N gene as previously described [36].

Immunostaining-based assay for hMPV inhibition. 95% confluent LLC-MK2 cells were transfected with siRNA using Lipofectamine 2000 as described above. After 5 h, cells were infected with 30 to 50 PFU of hMPV for 1.5 h and the medium was replaced with 1 mL/well of methylcellulose overlay. Cells were incubated for three days then immunostained as previously described [36]. These inhibition assays were done between two and four times.

Viral yield assay. LLC-MK2 cells were transfected with siRNA and infected as described above with the overlay containing only Opti-MEM and trypsin. Cells were incubated for three days, then supernatants were collected and titrated by plaque assay and immunostaining [36].

Cytotoxicity assay. Cytotoxicity of control and viral siRNAs was evaluated with an MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay in LLC-MK2 cells. In brief, serial dilutions of each siRNA were transfected in triplicate using Lipofectamine 2000 as described above. After a 3-day incubation period, 100 μ l of 1 mg/mL of MTT was added to each well for 2 h at 37°C. The dye was solubilized with 100 μ l/well of acidic isopropanol and absorbance was read at a wavelength of 570 nm with reference at 650 nm. An absorbance value that was significantly lower than the control cells indicated cytotoxicity.

Statistical analyses. Analyses were performed with GraphPad Prism 5 software using one-way analysis of variance and the Tukey multiple comparisons test.

Results

Selection and pre-screening of siRNAs in the absence of virus. Complete hMPV genome sequences available in GenBank at the time of the design, i.e., AY297748 CAN98-75 (group B2), AF371337 NL-001 (group A1) and AY297749 CAN97-83 (group A2), in addition to that of clinical strain C-85473 (group A1) used in our laboratory, were aligned (using CAN98-75 as consensus sequence) and analysed using ClustalW2. The most conserved hMPV genes, i.e., N, P, M, F, M2-1/M2-2 and L genes, were targeted for siRNA selection. We identified 200 siRNA sequences based on specific requirements such as sequence stability at the 5' end of the antisense strand relative to the 3' terminus, and insertion of chimeric DNA base overhangs at the 3' terminus of each strand.

These siRNAs were pre-screened in the absence of virus using a luciferase-based assay. Partial sequences from hMPV genome were cloned downstream of the renilla translational stop codon in the psiCHECK-2 vector. RNAi-based cleavage and subsequent degradation of the fusion mRNA can be easily monitored. The vector also contains the firefly luciferase gene which

allows for normalization of gene expression and transfection efficiency in every well. Each siRNA was cotransfected with the vector in A549 cells and expression of both luciferase genes was measured to determine activity ratios, i.e., normalized luciferase values. Renilla luciferase inhibition by the siRNAs varied between -58% and 97%; there were siRNAs showing good inhibition of renilla luciferase expression in all target genes, as shown in Figure 1. All 57 siRNAs associated with inhibition scores >40% were selected for further inhibition studies against hMPV. None of the siRNAs unable to inhibit luciferase expression was selected for further testing against hMPV and, therefore, the value of the luciferase test as a screening assay could not be determined.

Screening and evaluation of siRNA activity against hMPV. A quantitative real-time reverse transcriptase (RT)-PCR assay was used to first determine siRNA activity against hMPV strains. The 57 siRNAs identified by dual-luciferase were evaluated at two concentrations, i.e., 100 nM and 10 nM, against the hMPV group A1 clinical strain (C-85473). Viral RNA in the supernatants of siRNA-transfected cell cultures was quantified and compared to that of control siRNA. This control siRNA had no viral or mammalian target sequence and did not decrease or increase hMPV replication in LLC-MK2 cells at all tested concentrations. The target sequences of these 57 siRNAs and their inhibitory activity against hMPV A1 are shown in Figure 2. Not all siRNAs predicted by the luciferase-based assay showed good inhibition activity against hMPV when tested by quantitative RT-PCR. At 10 nM, 20 (35%) of the 57 siRNAs inhibited hMPV replication by >50% and only 10 (17.5%) had inhibition activity >80% against hMPV A1. Also, some siRNAs showed reverse dose-response activity against hMPV when evaluated with the RT-PCR assay which could be possibly related to the variability seen in this assay.

50% inhibitory concentration of the most active siRNAs against hMPV. The 10 lead siRNAs showing >80% inhibitory activity at a 10 nM concentration were selected for

determination of 50% inhibitory concentration (IC_{50}) values using the quantitative RT-PCR assay. The same hMPV group A1 strain was initially tested against a more extensive array of siRNA concentrations, i.e., two-fold dilutions from 10 nM to 0.078 nM. Table 1 presents the IC_{50} values for the 10 most active siRNAs. Three siRNAs (siRNA45, siRNA60, and siRNA118) showed potent inhibition with IC_{50} values <0.078 nM against hMPV A1 while all other had intermediate activity. Four siRNAs were tested twice to assess the reproducibility of this assay: the three most active siRNAs (siRNA45, siRNA60, and siRNA118) and one siRNA with intermediate activity (siRNA1). Divergent values between both replicates were noted for siRNA118 (<0.078 and 0.141 nM). Such differences could be attributed to the transfection efficiency or the prolonged period of time (months) between initial siRNA resuspension and testing, which could have caused siRNA degradation.

The inhibitory activity of these four siRNAs was also evaluated against hMPV group B2 by quantitative RT-PCR. SiRNA1 had a lower IC_{50} value against the B2 strain compared to the A1 strain while siRNA118 showed no inhibition against the B2 strain (>10 nM). SiRNA45 and siRNA60 had IC_{50} values <0.078 nM against both hMPV A1 and B2 strains (Table 1).

The inhibitory activity of the 10 siRNAs was also evaluated using a plaque assay followed by immunostaining. Of note, six of the 10 siRNAs were unable to inhibit replication of hMPV A1 even at the highest tested concentration, i.e., 10 nM (Table 1). Two siRNAs remained very effective against hMPV A1 with IC_{50} values of 0.046 ± 0.027 nM for siRNA45 and 0.075 ± 0.068 nM for siRNA60 while two had intermediate activity with IC_{50} values of 0.473 ± 0.272 nM for siRNA33 and 0.377 ± 0.149 nM for siRNA59 (Table 1).

An infectious viral yield reduction assay was also performed for siRNA60 against hMPV A1 (in duplicate) to confirm its inhibitory activity. The progeny viral titer was determined by

titration of supernatant of transfected cells and results showed potent activity with mean IC_{50} values < 0.019 nM.

Effects of mismatches between the siRNA and its target. In the present study, the designed siRNAs were not 100% complementary to the various hMPV strains tested since siRNA sequences were selected using CAN98-75 as the consensus sequence. Sequence analysis based on the four hMPV genotypes showed that five different mismatches were found between siRNA1, siRNA45, siRNA60 and their respective targets; three were located in the 5' region of the siRNAs and two in the 3' region (Figure 3).

SiRNA1 had 100% complementarity with hMPV B2 and was indeed very effective against this strain (IC_{50} value of 0.080 ± 0.026 nM) while there was a mismatch with the A1 strain at position 2 (A to G) resulting in an IC_{50} value >10 nM against this strain (Figure 3B).

In contrast, two mismatches were found when siRNA45 was compared to the hMPV A1 strain, one at position 2 (U to C) and the other at position 18 (A to C) (Figure 3C). Surprisingly, siRNA45 remained fully active against this strain (IC_{50} value of 0.046 ± 0.027 nM). The same mismatch at position 18 was found between hMPV A2 and siRNA45 without any loss of activity (IC_{50} value <0.078 nM). hMPV B1 and B2 strains were 100% complementary to siRNA45 and, as expected, excellent inhibitory activity (IC_{50} value <0.078 nM) was observed.

Similarly to siRNA45, siRNA60 was very effective against the four hMPV strains tested (IC_{50} value of 0.075 ± 0.068 nM against hMPV A1, 0.090 ± 0.051 nM against hMPV A2 and <0.078 nM against hMPV B1 and B2) despite a single mismatch for two strains (Figure 3D). The hMPV A2 strain had a mismatch in the target region corresponding to position 5 of the siRNA (G to A) while the mismatch in hMPV B1 strain corresponded to position 17 (A to C).

Evaluation of siRNA cocktail efficiency. Simultaneous transfection of the two most active siRNAs (siRNA45 and siRNA60) was evaluated by plaque assay followed by

immunostaining. Equimolar concentrations of each siRNA (from 0.039 nM to 100 nM) were tested simultaneously. Such siRNA cocktail was as potent as individual siRNAs with an IC_{50} value against hMPV A1 of 0.039 ± 0.028 nM compared to 0.046 ± 0.027 nM for siRNA45 alone and 0.075 ± 0.068 nM for siRNA60 alone (Table 2).

Longer Dicer substrates versus shorter siRNAs. Longer siRNAs containing 25/27 bases, known as Dicer substrate siRNAs, were also evaluated against hMPV A1 by plaque assay followed by immunostaining. Because siRNA45 contains two mismatches compared to the reference hMPV A1 strain, we designed two different Dicer substrate siRNAs, i.e., one with the mismatch at position 18 but not at position 2 compared to the original siRNA45 sequence (siRNA45-Dicer), and another one fully complementary to the A1 strain (siRNA45-mut-Dicer). These two Dicer substrate siRNAs showed slightly better hMPV inhibition than the original 21-mer siRNA45 with IC_{50} values of 0.025 ± 0.023 nM, 0.018 ± 0.011 nM and 0.046 ± 0.027 nM for siRNA45-mut-Dicer, siRNA45-Dicer and siRNA45, respectively (Table 2). Another 19-mer siRNA was also designed from siRNA45 target sequence to correct the mismatches against hMPV A1, i.e., the mismatch at position 18 in siRNA45 was corrected and this shorter siRNA version (siRNA45-mut) did not contain the other mismatch (at position 2). This siRNA had decreased activity against hMPV A1 with an IC_{50} value of 0.476 ± 0.326 nM compared to 0.046 ± 0.027 nM for the original 21-mer siRNA (Table 2). Finally, another 25/27-mer siRNA was designed based on siRNA60 sequence (siRNA60-Dicer) and its activity against hMPV A1 seemed also slightly better than the corresponding 21-mer siRNA60 with IC_{50} values of 0.022 ± 0.00 nM for siRNA60-Dicer and 0.075 ± 0.068 nM for siRNA60 (Table 2).

Cytotoxicity associated with siRNA transfection. We used Lipofectamine 2000 to achieve siRNA transfection in cells and noticed that, in some experiments, Lipofectamine 2000 alone showed some toxicity compared to untransfected cells (data not shown). We also evaluated

the cytotoxicity of the cocktail and that of nine siRNAs, i.e., control siRNA, siRNA1, siRNA45, siRNA60, siRNA118, siRNA45-mut, siRNA-mut-Dicer, siRNA45-Dicer and siRNA60-Dicer. All but one siRNA had no impact on cell viability when compared to Lipofectamine 2000 alone at the highest tested concentration, i.e., 100 nM. SiRNA118 was cytotoxic at the two highest concentrations (100 and 10 nM).

Discussion

In this study, we demonstrated that hMPV can be successfully inhibited *in vitro* by specific siRNAs. From a starting pool of 200 siRNAs identified by computational analysis of the hMPV genome, we first selected 57 siRNAs using a luciferase-based assay which did not require infectious particles. We next screened the latter siRNAs at two concentrations (10 and 100 nM) against an hMPV group A1 strain by real-time quantitative RT-PCR. The top ten siRNAs were then evaluated against two to four hMPV subgroups by RT-PCR and plaque assay followed by immunostaining. We finally identified two highly efficient siRNAs (siRNA45 and siRNA60) that were similarly active against all four hMPV subgroups.

SiRNA activity against other paramyxoviruses such as hRSV, hPIV, and aMPV has also been reported. SiRNAs targeting aMPV phosphoprotein and nucleoprotein mRNAs, which are the closest genetic homologues to hMPV, have been successfully identified *in vitro* [33, 34]. Also, *in vivo* experiments have shown that hRSV and hPIV replication can be efficiently inhibited by siRNAs targeting their phosphoprotein mRNA, and that a cocktail of both siRNAs can inhibit a dual viral infection in mouse [28]. The hRSV NS1 gene (which is absent in hMPV) has also been successfully inhibited by siRNA *in vitro* and *in vivo* [35]. Moreover, Phase I and II trials of ALN-RSV01, a siRNA targeting the hRSV nucleoprotein mRNA delivered via nasal

spray and inhalation, have been recently completed in adults [37] (Alnylam Pharmaceuticals, press release, www.alnylam.com).

In our study, widely different inhibitory activities were sometimes obtained for some siRNAs depending on the evaluation method. For instance, some siRNAs showed good hMPV inhibition when evaluated by quantitative RT-PCR performed on cell culture supernatants but were not active ($IC_{50} > 10$ nM) when evaluated by plaque assay followed by immunostaining (Table 1). It is likely that PCR-based analyses are less representative of viable viral progeny production compared to plaque assays, which directly estimate the amount of infectious particles present in a sample. Incomplete viral genomes or viral mRNAs (for example, N or P mRNAs) could be present in cell culture supernatant and may have led to an overestimate of siRNA activity when evaluated by PCR. Consequently, plaque assay followed by immunostaining seems more accurate to assess siRNA potency in inhibiting hMPV replication although additional *in vitro* and *in vivo* evaluations are required. Also, transfection efficiency and other reasons besides intrinsic on-target siRNA activity can be responsible for the differences observed between evaluation methods and between replicates of the same experiment.

We cannot completely rule out the possibility that hMPV inhibition might be due to immune stimulation of LLC-MK2 cells following siRNA transfection. However, the absence of antiviral activity associated with the control siRNA and control Dicer substrate would suggest that IFN induction was not involved in hMPV inhibition.

SiRNA sequences were chosen from conserved regions of different hMPV genomes but the final sequences were selected based on hMPV B2, the consensus sequence. This approach resulted in a few mismatches between siRNAs and some of the strains used in subsequent evaluation. Among our top siRNA candidates, we found some mismatches with viral targets that were not always associated with a loss of activity. Most reports assessing the influence of target

mismatches on siRNA activity showed that a single nucleotide change can reduce or completely abolish siRNA silencing effect [27, 38]. According to studies on miRNA efficacy and tolerance to mismatches, the 5' region is critical for recognition and pairing to the target mRNA and does not usually accept major changes [25, 39]. The base at position 1 of the guide strand does not seem to pair with the mRNA target sequence but rather interacts with proteins from RISC. However, nucleotides 2-8, which are responsible for recognition of mRNA target, do not easily tolerate mismatches. On the other hand, the 3' region of miRNA allows for more base substitutions without drastically affecting its efficacy. It is believed that siRNA molecules follow the same rules as miRNA [40] but, according to our findings, some changes could be tolerated even in the 5' region of siRNAs. Figure 3A illustrates the position of the nucleotides forming the siRNA and the cleavage of target mRNA by RISC between positions 10 and 11 of the siRNA guide strand. Here, we report on two siRNAs (siRNA45 and siRNA60) for which mismatches in the 5' region (positions 2 and 5, respectively) did not abrogate their activity while a mismatch at position 2 of siRNA1 was indeed associated with loss of function (Figure 3). Also, as expected, mismatches located in the 3' region of siRNAs, i.e., at position 18 of siRNA45 and position 17 of siRNA60 did not affect their anti-hMPV potency. Furthermore, siRNA45 which presented simultaneously two mismatches when compared to hMPV A1 target sequence remained highly effective against this strain. The position of mismatch is important for siRNA activity but the type of substitution could also be a key element in siRNA tolerance to mismatches. Substitutions of U to C (at position 2), of G to A (at position 5), of A to C (at position 17) and of A to C (at position 18) were well tolerated while a substitution of A to G (at position 2) was deleterious for siRNA activity. This suggests that some mismatches can be tolerated in siRNA sequence but more detailed studies must be conducted to identify essential base-pairing positions and types of substitutions allowed for retaining siRNA activity.

We further demonstrated that a cocktail of two siRNAs (siRNA45 and siRNA60) can be successfully used to inhibit hMPV replication, at least as efficiently as individual siRNAs, without inducing cytotoxicity. The use of a cocktail of siRNAs might theoretically be helpful to prevent treatment failure if deleterious mutations do happen in the target mRNA. This is a possibility considering the number of variations reported in so-called conserved viral genes.

Our two best siRNA candidates target mRNA of essential structural proteins. SiRNA45 targets the N mRNA while siRNA60 targets the P mRNA. These proteins form the replication-transcription complex along with the polymerase (L) and are essential for viral replication [3]. Thus, silencing of these components leads to a nearly total loss of all RNA synthesis [16]. Moreover, *de novo* synthesis of N and P proteins following infection is essential for efficient viral replication of another paramyxovirus, e.g., the Sendai virus [41]. The N and P proteins are good targets because they are generally well conserved between all hMPV strains and less prone to immunological selective pressure than surface proteins [17-19]. Even though the N and P mRNAs are the two most frequent mRNAs produced in hMPV-infected cells [15], their cleavage induced by siRNA45 and siRNA60 transfection is highly effective in blocking replication, even at very low concentrations, i.e., in the subnanomolar range against all hMPV subgroups (Table 1 and Figure 3). Since these experiments involved transfection of cells in order to observe inhibition of hMPV replication, we cannot compare our siRNA IC₅₀ values to those of other antiviral compounds such as ribavirin [42].

In this study, we initially used 21-mer siRNAs and identified two highly potent siRNAs against hMPV. Since some reports demonstrated better activity associated with longer siRNAs known as Dicer substrate [43-47], we designed and evaluated 25/27-mer Dicer substrates corresponding to our top 21-mer siRNA candidates, i.e., siRNA45 and siRNA60. Two Dicer substrates derived from siRNA45 and one from siRNA60 were tested against hMPV A1 strain.

SiRNA45-mut-Dicer had two RNA bases modified from the original siRNA45 sequence to obtain perfect complementarity with the hMPV A1 strain while siRNA45-Dicer still contained the mismatch corresponding to position 18 in siRNA45. SiRNA60-Dicer had no modification compared to the original RNA bases and was fully complementary to the hMPV A1 strain. When evaluated by plaque assay followed by immunostaining, these three Dicer substrate siRNAs were at least as effective and possibly slightly more active against hMPV A1 than the 21-mer siRNAs (Table 2), which suggests that longer siRNAs can be an equal or even better option. Moreover, a gain in stability could be obtained with these longer siRNAs. A revised and shorter (19-mer) version of siRNA45 that contained no mismatches compared to hMPV A1 was also evaluated but showed decreased activity against this strain compared to the original 21-mer siRNA. Thus, both the length and sequence of siRNAs are important pre-requisite for effective viral inhibition.

As these siRNAs are highly potent in inhibiting hMPV replication *in vitro* and are not associated with cytotoxicity in LLC-MK2 cells, subsequent evaluation of their activity against hMPV in a small animal model in the presence or absence of delivery vehicles is extremely desirable. This will be further supplemented with the cytokine profiling from the bronchoalveolar lavage fluid of the siRNA treated mice. Considering that lung epithelial cells can be targeted by RNAi therapeutics following intranasal challenge with naked siRNAs or with the use of a carrier [28, 43, 48, 49], topical antiviral therapy based on RNAi appears a promising avenue for hMPV and other respiratory viral infections [26, 29].

Acknowledgments

G.B. is a national researcher scholar of “Le Fonds de la Recherche en Santé du Québec” (FRSQ) and the holder of the Canada Research Chair on Emerging Viruses and Antiviral Resistance. C.D. is a Ph.D. scholar from the FRSQ.

Financial support. This work was supported by Nastech Pharmaceutical Company Inc. and a grant from the Canadian Institute of Health Research (CIHR) to G.B.

Potential conflicts of interest. G.B., N.G., M-H.C. and C.D.: no conflicts. K.C., Q.G., S.S., M-V.T., S-C.Q. and P-H.J. are employees or former employees of Nastech.

References

1. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001; **7**:719-724.
2. Deffrasnes C, Hamelin ME, Boivin G. Human metapneumovirus. *Semin Respir Crit Care Med* 2007; **28**:213-221.
3. Broor S, Bharaj P. Avian and human metapneumovirus. *Ann N Y Acad Sci* 2007; **1102**:66-85.
4. Boivin G, Abed Y, Pelletier G, et al. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis* 2002; **186**:1330-1334.
5. Boivin G, De Serres G, Hamelin ME, et al. An outbreak of severe respiratory tract infection due to human metapneumovirus in a long-term care facility. *Clin Infect Dis* 2007; **44**:1152-1158.
6. Louie JK, Schnurr DP, Pan CY, et al. A summer outbreak of human metapneumovirus infection in a long-term-care facility. *J Infect Dis* 2007; **196**:705-708.
7. Hamelin ME, Prince GA, Gomez AM, Kinkead R, Boivin G. Human metapneumovirus infection induces long-term pulmonary inflammation associated with airway obstruction and hyperresponsiveness in mice. *J Infect Dis* 2006; **193**:1634-1642.
8. Garcia-Garcia ML, Calvo C, Casas I, et al. Human metapneumovirus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma at age 5. *Pediatr Pulmonol* 2007; **42**:458-464.
9. Boivin G, Mackay I, Sloots TP, et al. Global genetic diversity of human metapneumovirus fusion gene. *Emerg Infect Dis* 2004; **10**:1154-1157.
10. Mackay IM, Bialasiewicz S, Jacob KC, et al. Genetic diversity of human metapneumovirus over 4 consecutive years in Australia. *J Infect Dis* 2006; **193**:1630-1633.
11. Mackay IM, Bialasiewicz S, Waliuzzaman Z, et al. Use of the P gene to genotype human metapneumovirus identifies 4 viral subtypes. *J Infect Dis* 2004; **190**:1913-1918.
12. Manoha C, Espinosa S, Aho SL, Huet F, Pothier P. Epidemiological and clinical features of hMPV, RSV and RVs infections in young children. *J Clin Virol* 2007; **38**:221-226.
13. van den Hoogen BG, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology* 2002; **295**:119-132.
14. Cowton VM, McGivern DR, Fearn R. Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis. *J Gen Virol* 2006; **87**:1805-1821.
15. Easton AJ, Domachowske JB, Rosenberg HF. Animal pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 2004; **17**:390-412.
16. Barik S. Control of nonsegmented negative-strand RNA virus replication by siRNA. *Virus Res* 2004; **102**:27-35.
17. Skiadopoulos MH, Biacchesi S, Buchholz UJ, et al. Individual contributions of the human metapneumovirus F, G, and SH surface glycoproteins to the induction of neutralizing antibodies and protective immunity. *Virology* 2006; **345**:492-501.
18. Ulbrandt ND, Ji H, Patel NK, et al. Isolation and characterization of monoclonal antibodies which neutralize human metapneumovirus in vitro and in vivo. *J Virol* 2006; **80**:7799-7806.
19. Padhi A, Verghese B. Positive natural selection in the evolution of human metapneumovirus attachment glycoprotein. *Virus Res* 2008; **131**:121-131.

20. Baulcombe D. RNA silencing in plants. *Nature* 2004; **431**:356-363.
21. Wang MB, Metzloff M. RNA silencing and antiviral defense in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**:216-222.
22. de Fougères A, Vornlocher HP, Maraganore J, Lieberman J. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2007; **6**:443-453.
23. Anderson EM, Birmingham A, Baskerville S, et al. Experimental validation of the importance of seed complement frequency to siRNA specificity. *Rna* 2008; **14**:853-861.
24. Ui-Tei K, Naito Y, Zenno S, et al. Functional dissection of siRNA sequence by systematic DNA substitution: modified siRNA with a DNA seed arm is a powerful tool for mammalian gene silencing with significantly reduced off-target effect. *Nucleic Acids Res* 2008; **36**:2136-2151.
25. Yuan YR, Pei Y, Ma JB, et al. Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol Cell* 2005; **19**:405-419.
26. Barik S, Bitko V. Prospects of RNA interference therapy in respiratory viral diseases: update 2006. *Expert Opin Biol Ther* 2006; **6**:1151-1160.
27. Bitko V, Barik S. Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses. *BMC Microbiol* 2001; **1**:34.
28. Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, Barik S. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med* 2005; **11**:50-55.
29. Ge Q, Eisen HN, Chen J. Use of siRNAs to prevent and treat influenza virus infection. *Virus Res* 2004; **102**:37-42.
30. Ge Q, Filip L, Bai A, et al. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**:8676-8681.
31. Ge Q, McManus MT, Nguyen T, et al. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**:2718-2723.
32. Zhang W, Yang H, Kong X, et al. Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene. *Nat Med* 2005; **11**:56-62.
33. Munir S, Kaur K, Kapur V. Avian metapneumovirus phosphoprotein targeted RNA interference silences the expression of viral proteins and inhibits virus replication. *Antiviral Res* 2006; **69**:46-51.
34. Ferreira HL, Spilki FR, de Almeida RS, Santos MM, Arns CW. Inhibition of avian metapneumovirus (AMPV) replication by RNA interference targeting nucleoprotein gene (N) in cultured cells. *Antiviral Res* 2007; **74**:77-81.
35. Kong X, Zhang W, Lockey RF, et al. Respiratory syncytial virus infection in Fischer 344 rats is attenuated by short interfering RNA against the RSV-NS1 gene. *Genet Vaccines Ther* 2007; **5**:4.
36. Deffrasnes C, Hamelin ME, Prince GA, Boivin G. Identification and evaluation of a highly effective fusion inhibitor for human metapneumovirus. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**:279-287.
37. DeVincenzo J, Cehelsky JE, Alvarez R, et al. Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV). *Antiviral Res* 2008; **77**:225-231.
38. Jacque JM, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 2002; **418**:435-438.

39. Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 2004; **18**:504-511.
40. Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J* 2001; **20**:6877-6888.
41. Wiegand MA, Bossow S, Schlecht S, Neubert WJ. De novo synthesis of N and P proteins as a key step in Sendai virus gene expression. *J Virol* 2007; **81**:13835-13844.
42. Wyde PR, Chetty SN, Jewell AM, Boivin G, Piedra PA. Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin in vitro. *Antiviral Res* 2003; **60**:51-59.
43. Akinc A, Zumbuehl A, Goldberg M, et al. A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. *Nat Biotechnol* 2008; **26**:561-569.
44. Kim DH, Behlke MA, Rose SD, et al. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol* 2005; **23**:222-226.
45. Siolas D, Lerner C, Burchard J, et al. Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat Biotechnol* 2005; **23**:227-231.
46. Amarzguioui M, Lundberg P, Cantin E, et al. Rational design and in vitro and in vivo delivery of Dicer substrate siRNA. *Nat Protoc* 2006; **1**:508-517.
47. Kubo T, Zhelev Z, Ohba H, Bakalova R. Modified 27-nt dsRNAs with dramatically enhanced stability in serum and long-term RNAi activity. *Oligonucleotides* 2007; **17**:445-464.
48. de Fougères AR. Delivery vehicles for small interfering RNA in vivo. *Hum Gene Ther* 2008; **19**:125-132.
49. Novobrantseva TI, Akinc A, Borodovsky A, de Fougères A. Delivering silence: advancements in developing siRNA therapeutics. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2008; **11**:217-224.

Figure Legends

Figure 1. Activity of the siRNAs targeting hMPV genome. Percent inhibition of luciferase expression by 200 siRNAs. Percent inhibition was calculated as follows: a siRNA can inhibit Renilla luciferase expression but not Firefly luciferase expression, thus the percent of luciferase inhibition corresponds to the ratio of Renilla luciferase expression to Firefly luciferase expression in presence of the siRNA. In absence of siRNA, the ratio of Renilla luciferase expression to Firefly luciferase expression is 1, i.e., 0% inhibition. Blue columns represent siRNAs targeting the N gene; red, the P gene; pink, the M gene; green, the F gene; light blue, the M2-1 gene; yellow, the M2-2 gene; and black, the L gene.

Figure 2. Screening of 57 siRNAs at two concentrations (100 nM and 10 nM) using a real-time RT-PCR-based assay. Cells were first transfected with siRNAs then infected with hMPV. After three days, viral RNA was extracted, reverse transcribed and quantified by PCR. Target genes, sequences and siRNA numbers are indicated. Black bars represent percent hMPV inhibition by siRNAs using a 10 nM concentration; white bars represent percentage of hMPV inhibition by siRNAs using a 100 nM concentration. Ctl means control siRNA.

Figure 3. Nucleotide mismatches between siRNA1, siRNA45 and siRNA60 with their respective hMPV targets. **(A)** Illustration of a typical 21-mer siRNA duplex composed of a passenger strand (sense strand) and a guide strand (antisense strand), followed by pairing with its target mRNA and cleavage of mRNA between base positions 10 and 11. **(B)** Sequence of siRNA1 with location of mismatches for target mRNAs and corresponding IC_{50} values. **(C)** Sequence of siRNA45 with

location of mismatches for target mRNAs and corresponding IC_{50} values. **(D)** Sequence of siRNA60 with location of mismatches for target mRNAs and corresponding IC_{50} values.

Figure 1.

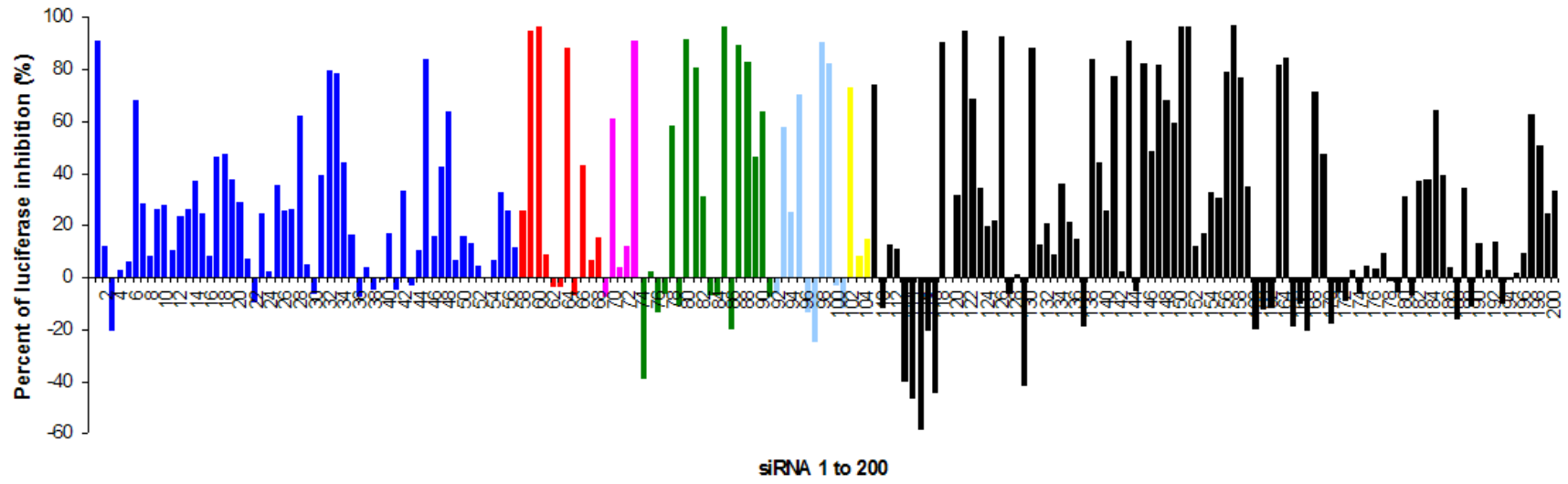
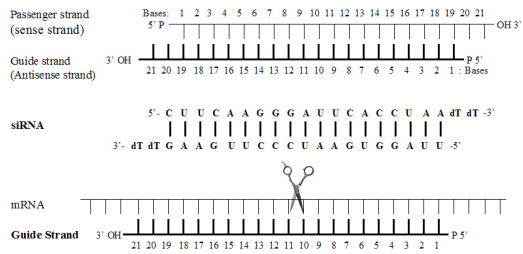


Figure 2.



Figure 3.

A



B

mRNA (N gene)	siRNA	IC ₅₀ value ^a by immunostaining
..... C U U C A A G G G A U U C A C C U A A	3'- dT dT G A A G U U C C C U A A G U G G A U U -5'	> 10 nM
..... C U U C A A G G G A U U C A C C U A A	3'- dT dT G A A G U U C C C U A A G U G G A U U -5'	ND ^b
..... C U U C A A G G G A U U C A C C U A A	3'- dT dT G A A G U U C C C U A A G U G G A U U -5'	ND
..... C U U C A A G G G A U U C A C C U A A	3'- dT dT G A A G U U C C C U A A G U G G A U U -5'	0.080 ± 0.026 nM

C

mRNA (N gene)	siRNA	IC ₅₀ value ^a by immunostaining
..... G A A G C A A A G C A G A A A G U U U	3'- dT dT C U U C G U U U C G U C U U U C A A A -5'	0.046 ± 0.027 nM
..... G ^C A G C A A A G C A G A A A G U U U	3'- dT dT C U U C G U U U C G U C U U U C A A A -5'	< 0.078 nM
..... G A A G C A A A G C A G A A A G U U U	3'- dT dT C U U C G U U U C G U C U U U C A A A -5'	< 0.078 nM
..... G A A G C A A A G C A G A A A G U U U	3'- dT dT C U U C G U U U C G U C U U U C A A A -5'	< 0.078 nM

D

mRNA (P gene)	siRNA	IC ₅₀ value ^a by immunostaining
..... G C A G A A G C U U U C C A G A A A U	3'- dT dT C G U C U U C G A A A G G U C U U U A -5'	0.075 ± 0.068 nM
..... G C A G A A G C U U U C C A A A A A U	3'- dT dT C G U C U U C G A A A G G U C U U U A -5'	0.090 ± 0.051 nM
..... G ^C G A A G C U U U C C A G A A A U	3'- dT dT C G U C U U C G A A A G G U C U U U A -5'	< 0.078 nM
..... G C A G A A G C U U U C C A G A A A U	3'- dT dT C G U C U U C G A A A G G U C U U U A -5'	< 0.078 nM

^a Values represent the means of two to four independent experiments, with errors expressed as standard deviations.

^b ND: not done.

Table 1. Inhibition data obtained for 10 siRNAs against hMPV group A1 and B2 with the quantitative real-time RT-PCR and against hMPV group A1 with the plaque assay followed by immunostaining.

siRNA	Target gene	siRNA sequence: sense strand 5'---3' antisense strand 3'---5'	IC ₅₀ value against hMPV A1 (nM)			IC ₅₀ value against hMPV B2 (nM)	
			RT-PCR First experiment	RT-PCR Second experiment	Plaque assay ^a	RT-PCR First experiment	RT-PCR Second experiment
1	N	5'-CUUCAAGGGAUUCACCUAAAdTdT-3' 3'-dTdTGAAGUCCCUAAGUGGAUU-5'	0.215	0.099	> 10	< 0.078	< 0.078
32	N	5'-GCCUUCAGCACCAGACACAAdTdT-3' 3'-dTdTTCGGAAGUCGUGGUCUGUGU-5'	0.459	ND ^b	> 10	ND	ND
33	N	5'-GCACCAGACACACCAAUAAdTdT-3' 3'-dTdTTCGUGGUCUGUGUGGUUAUU-5'	0.082	ND	0.473 ± 0.272	ND	ND
45	N	5'-GAAGCAAAGCAGAAAGUUUdTdT-3' 3'-dTdTTCUUCGUUUCGUCUUUCAA-5'	< 0.078	< 0.078	0.046 ± 0.027	< 0.078	< 0.078
59	P	5'-GGGUAUGAAGCAGCAAAAdTdT-3' 3'-dTdTCCCAUUACUUCGUCGUUUU-5'	0.084	ND	0.377 ± 0.149	ND	ND
60	P	5'-GCAGAAGCUUCCAGAAAUdTdT-3' 3'-dTdTTCGUCUUCGAAAGGUCUUUA-5'	< 0.078	< 0.078	0.075 ± 0.068	< 0.078	< 0.078
118	L	5'-CCAACUGUUAACAUGGAAAdTdT-3' 3'-dTdTGGUUGACAAUUGUACCUUU-5'	< 0.078	0.141	> 10	> 10	> 10
126	L	5'-GGGAAAGAAAGAGAAUUAAdTdT-3' 3'-dTdTCCCUUUCUUUCUCUUAUU-5'	0.130	ND	> 10	ND	ND
163	L	5'-GCAUGCCAUUGGUGUGGAAAdTdT-3' 3'-dTdTTCGUACGGUAACCACACCUU-5'	0.127	ND	> 10	ND	ND
164	L	5'-CCAUUGGUGUGGAAUUAUAdTdT-3' 3'-dTdTGGUAACCACACCUUAUAU-5'	0.087	ND	> 10	ND	ND

^a Results are a mean from two to four independent experiments.

^b ND: Not done.

Table 2. IC₅₀ values for a cocktail of two siRNAs (siRNA45 and siRNA60), individual siRNAs and Dicer substrate siRNAs against an hMPV group A1 strain by plaque assay.

siRNA	Length	Target gene	siRNA sequence ^a : sense strand 5'---3' antisense strand 3'---5'	IC ₅₀ (nM) ^b
Cocktail of siRNA45 + siRNA60	21-mer	N + P	5'-GAAGCAAAGCAGAAAGUUUdTdT-3' 3'-dTdTTCUUCGUUUCGUCUUUCAAA-5' + 5'-GCAGAAGCUUUCAGAAAUDTdT-3' 3'-dTdTTCGUCUUCGAAAGGUCUUUA-5'	0.039 ± 0.028 ^c
siRNA45	21-mer	N	5'-GAAGCAAAGCAGAAAGUUUdTdT-3' 3'-dTdTTCUUCGUUUCGUCUUUCAAA-5'	0.046 ± 0.027
siRNA45-mut	19-mer	N	5'-GCAGCAAAGCAGAAAGUdTdT-3' 3'-dTdTTCGUCGUUUCGUCUUUCA-5'	0.476 ± 0.326
siRNA45-mut-Dicer	25/27-mer	N	5'-GCAGCAAAGCAGAAAGUCU <u>AAUUU</u> dGdT-3' 3'-UCCGUCGUUUCGUCUUUCAGAUAAACA-5'	0.025 ± 0.023
siRNA45-Dicer	25/27-mer	N	5'-GAAGCAAAGCAGAAAGUCU <u>AAUUU</u> dGdT-3' 3'-UCCUUCGUUUCGUCUUUCAGAUAAACA-5'	0.018 ± 0.011
siRNA60	21-mer	P	5'-GCAGAAGCUUUCAGAAAUDTdT-3' 3'-dTdTTCGUCUUCGAAAGGUCUUUA-5'	0.075 ± 0.068
siRNA60-Dicer	25/27-mer	P	5'-GCAGAAGCUUUCAGAAAUCAUUdAdA-3' 3'-AUCGUCUUCGAAAGGUCUUUAGUAAUU-5'	0.022 ± 0.000

^a Shaded nucleotides represent change in siRNA sequence compared to the original siRNA45.

^b Means of two to four independent experiments.

^c Equal amount of each siRNAs (siRNA45 and siRNA60) were used in the cocktail

Chapitre V. Évaluation *in vivo* de l'efficacité de siRNAs modifiés et non modifiés à inhiber la réplication du hMPV

Ces résultats n'ont pas fait l'objet d'un article scientifique puisque les données sont encore incomplètes et que l'étude approfondie de ce sujet est toujours en cours. Seront donc ici présentés les résultats recueillis jusqu'à présent.

1. Résumé

Deux siRNAs de 19-21 bases dirigés contre les ARNm codant pour les protéines N (siRNA45) et P (siRNA60) du hMPV se sont révélés être de puissants inhibiteurs de la réplication virale *in vitro*. De même, deux substrats de Dicer (DsiRNA) correspondant à ces siRNAs ont démontré une activité légèrement supérieure à ceux-ci *in vitro*. Nous avons donc poursuivi l'évaluation de ces DsiRNAs dans un modèle d'infection de souris BALB/c par le hMPV. Toutefois, l'optimisation des DsiRNAs devait être réalisée pour contrer les différents problèmes associés à l'utilisation de ces molécules *in vivo*, tels qu'une susceptibilité aux nucléases, une modulation possible de la réponse immunitaire impliquant principalement l'induction d'IFN et la survenue d'effets non-spécifiques. Pour contrer l'instabilité des DsiRNAs lors de l'administration *in vivo*, différentes combinaisons de modifications chimiques ont tout d'abord été évaluées *in vitro* lors d'essais d'inhibition des géotypes A1 et B2 de hMPV. Ces modifications correspondent à l'ajout de groupement 2'O-méthyl sur certaines bases et/ou d'un lien phosphorothioate entre deux bases d'un des brins du DsiRNA. Les DsiRNAs contenant le plus de modifications se sont révélés inaptes à inhiber le hMPV *in vitro*, alors que les DsiRNAs peu modifiés sont demeurés efficaces. Nous avons ensuite évalué certains DsiRNAs *in vivo* chez la souris BALB/c. Dans un premier temps, trois DsiRNAs (DsiRNA60 non-modifié, DsiRNA60 modifié-6197 et DsiRNA45-mut non-modifié) ont été évalués à différentes concentrations, avec ou sans formulation liposomale, administrés aux jours 2, 1 et 0 pré-infection. Aucun de ces DsiRNAs ne s'est toutefois révélé efficace contre le hMPV dans les conditions expérimentales choisies. Dans un deuxième temps, quatre DsiRNAs ont été évalués (DsiRNA60 non-modifié, DsiRNA60 modifié-6197, DsiRNA60 modifié-6198 et DsiRNA45-mut modifié-6174) à 10 et/ou 25 mg/kg sans

formulation liposomale, administrés du jour 1 pré-infection au jour 2 post-infection. L'administration du DsiRNA60 non-modifié aux souris (10 mg/kg) a permis de diminuer les titres viraux pulmonaires lors d'une infection par le hMPV alors que l'utilisation du DsiRNA45-mut modifié-6174 (10 mg/kg) a entraîné une diminution des titres viraux pulmonaires de même qu'une protection contre la perte de poids normalement engendrée par l'infection par le hMPV. En conclusion, nous avons identifié deux siRNAs prometteurs pour la lutte aux infections causées par le hMPV et les études *in vivo* doivent assurément se poursuivre.

2. Contributions des auteurs

Cette étude a été réalisée en collaboration avec Nastech Pharmaceuticals (maintenant MDRNA).

- | | |
|---|---|
| Céline Deffrasnes | <ul style="list-style-type: none"> -Productions virales -Tests d'inhibition du hMPV par titration en plaque et marquage par anticorps -Analyses statistiques -Administration intranasale -Sacrifice des souris et prélèvement de poumons |
| Marie-Ève Hamelin | <ul style="list-style-type: none"> -Administration intranasale -Sacrifice des souris et prélèvement de poumons |
| Constance Gagnon | <ul style="list-style-type: none"> -Administration intranasale -Sacrifice des souris et prélèvement de poumons |
| Nos collaborateurs chez Nastech-MDRNA dont Shaguna Seth et Mike Templin | <ul style="list-style-type: none"> -Design des siRNAs modifiés -Tests de dégradation par les nucléases -Test d'induction d'IFNα <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> |
| Guy Boivin | <ul style="list-style-type: none"> -Supervision du projet de recherche |

3. Mise en contexte

Le hMPV est une importante cause d'infections respiratoires sévères chez les jeunes enfants, les personnes âgées et patients immunosupprimés. Ce virus a aussi été associé à des épidémies ayant provoqué des décès. De plus, des études récentes suggèrent que le hMPV, en causant des infections sévères chez de jeunes enfants, pourrait les prédisposer à développer de l'asthme [37, 91, 111, 170]. Il est donc primordial de mettre au point des traitements efficaces pour atténuer les conséquences à court et long terme des infections sévères et les décès associés.

Une nouvelle avenue prometteuse pour le contrôle des infections virales repose sur le principe de l'interférence à l'ARN et sur l'utilisation de siRNAs dirigés contre des gènes essentiels à la réplication virale. De nombreuses études démontrent d'ailleurs le fort potentiel inhibiteur des siRNAs sur la réplication virale *in vitro*. De plus, le hRSV, le PIV-3 ainsi que l'influenza ont pu être efficacement inhibés *in vivo* par l'administration de siRNAs [16, 27, 92, 105, 180].

Nous avons précédemment démontré que la réplication du hMPV pouvait être inhibée *in vitro* à l'aide de siRNAs ciblant les ARNm viraux codant pour la nucléoprotéine et la phosphoprotéine. Nous avons également rapporté une efficacité légèrement supérieure des substrats de Dicer (DsiRNAs) par rapport aux siRNAs de 19-21 bases (directement intégrés au RISC). Ces DsiRNAs doivent d'abord être reconnus par Dicer puis clivés avant d'être pris en charge par le RISC et ainsi induire la dégradation des ARNm cibles (figure 20). Des études démontrent d'ailleurs une supériorité des DsiRNAs comparativement aux siRNAs, les DsiRNAs étant hautement inhibiteurs à des concentrations plus basses que ces derniers [137]. Ces DsiRNAs contiennent entre 25 et 30 bases et peuvent être jusqu'à 100X plus efficaces que les siRNAs correspondants [137, 143]. De ce fait, les DsiRNAs identifiés *in vitro* présentent un potentiel thérapeutique qui mérite d'être approfondi *in vivo*. Par contre, bien que les DsiRNAs soient plus efficaces que les siRNAs, leur stabilité peut tout de même poser problème *in vivo* puisqu'ils se retrouvent rapidement en présence de nucléases, ce qui diminue grandement leur durée de vie et donc leur activité inhibitrice. Plusieurs modifications chimiques peuvent néanmoins être employées pour réduire la vulnérabilité des siRNAs aux endonucléases et exonucléases. Par exemple, l'ajout de groupements 2'-O-methyl, 2'-fluoro ou Fana sur le pentose et la création de liens phosphorothioates, boranophosphates ou morpholinos (phosphorodiamidates) au niveau du

squelette de phosphate peut améliorer la stabilité des siRNAs [55, 56, 202]. La modification chimique d'un siRNA peut toutefois entraîner une diminution de son activité inhibitrice. Une comparaison de l'activité des siRNAs modifiés et non-modifiés doit donc être réalisée, et ce, contre différents groupes de hMPV. De même, bien que les DsiRNAs ne semblent pas induire la voie de l'IFN en raison de leur grande efficacité à des concentrations très faibles, de l'ordre du picomolaire [137], il est nécessaire d'écarter la possibilité que leur potentiel antiviral soit relié à une induction d'IFN *in vitro* et chez l'animal. L'activation de la voie de l'IFN, qui résulte en un arrêt global de la synthèse protéique dans les cellules, correspondrait à un effet non-spécifique du siRNA plutôt qu'à une inhibition spécifique du gène viral ciblé.

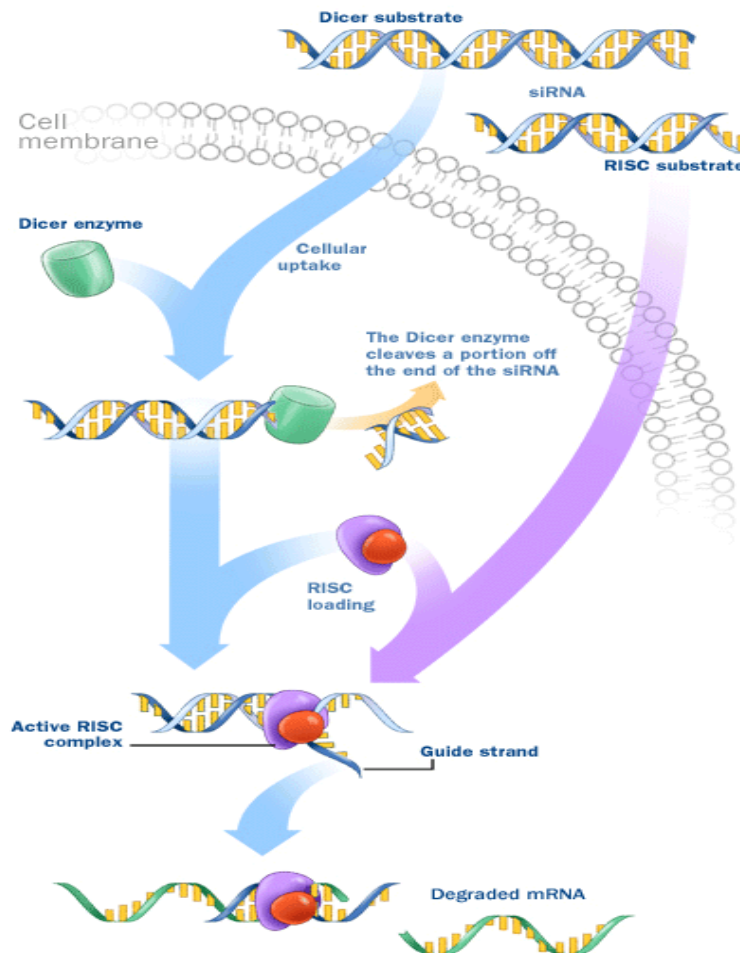


Figure 20. Prise en charge des substrats de Dicer (DsiRNAs) par Dicer et entrée dans la voie de l'interférence à l'ARN [173].

De plus, le modèle d'infection chez la souris BALB/c par le hMPV est maintenant bien établi et permet d'évaluer les propriétés antivirales de nombreux composés prometteurs tels que les siRNAs. À la suite de l'administration intranasale du hMPV, la réplication du virus dans les poumons des souris est associée à une perte de poids, des symptômes cliniques, une présence de virus infectieux dans les poumons, une forte inflammation pulmonaire ainsi qu'à l'obstruction des voies respiratoires. Les DsiRNAs les plus actifs contre les deux groupes de hMPV *in vitro* seront donc évalués à l'aide de ce modèle animal.

4. Matériel et méthode

Lignée cellulaire et virus. Les cellules LLC-MK2 ont été utilisées pour tous les essais d'inhibition par les siRNAs et pour amplifier les virus. Ces cellules sont maintenues dans un milieu minimal essentiel (MEM, Invitrogen, Burlington, ON) supplémenté de 10% de sérum foetal de veau (FBS). Les cellules mononucléées du sang périphérique humain (PBMC) ont été cultivées dans un milieu IMDM contenant du glutamax et du NEAA et supplémenté avec 10% de FBS. Deux souches de hMPV correspondant aux types A et B ont été employées pour évaluer l'efficacité des siRNAs. La souche clinique C-85473 représente le génotype A1 alors que la souche de référence CAN98-75 (GenBank AY297748) représente le génotype B2. Les cellules ont été incubées en présence de virus dans un milieu d'infection constitué d'Opti-MEM additionné de 2 µl/mL de trypsine (Sigma, Oakville, ON) jusqu'à l'obtention d'effets cytopathiques maximum, puis le surnageant est récolté et conservé à -80°C. La titration virale s'effectue telle que décrite au chapitre précédent (chapitre IV) (TCID₅₀/mL et titration par plaques).

SiRNAs. Les siRNAs et les DsiRNAs modifiés et non-modifiés nous ont été fournis par la compagnie Nastech Pharmaceuticals (maintenant MDRNA Inc, Bothell, WA). Les modifications consistent en l'ajout de groupement 2'-O-methyl aux bases d'ARN et/ou d'un lien phosphorothioate entre des bases d'ARN ou d'ADN à différentes positions sur les siRNAs. Le contrôle négatif (DX3413) utilisé dans toutes nos expériences correspond à un DsiRNA constitué d'un mélange aléatoire de bases et dont la séquence est la suivante : (brin sens) 5'-GGUCCUGGAACAAUUGCUUUUAdCdA-3' et (brin anti-sens) 5'-

GACCAAGGACCUUGUUAACGAAAAUGU-3'. Ce siRNA n'a aucune similarité de séquence avec les génomes viraux, murin et humain et n'induit aucune inhibition de la réplication du hMPV. La pureté des siRNAs variaient de 88 à 98 %.

Évaluation de l'activité des différents siRNAs. Les concentrations inhibitrices 50% (CI₅₀) sont déterminées par titration en plaque tel que décrit précédemment (chapitre IV). L'activité des siRNAs a été évaluée contre les groupes A1 et B2 du hMPV.

Évaluation de la stabilité des siRNAs. La stabilité des DsiRNAs a été évaluée par un test de dégradation en présence de plasma humain (Bioreclamation Inc, Liverpool, NY). Un mélange composé de 20 µL de siRNA (150 µM) et 40 µL de plasma ou d'eau (contrôle négatif) sans RNase est incubé durant 1 minute et/ou durant 15 minutes à 37°C. L'ARN est ensuite extrait avec du Trizol. L'ARN obtenu est ensuite desséché, dessalé puis analysé par spectrométrie de masse et chromatographie en phase liquide (LC-MS). Un contrôle positif de dégradation a été utilisé (DsiRNA3030). Les contrôles négatifs sont constitués des siRNAs incubés à 37°C durant 24 h en absence de plasma humain (eau).

Induction d'IFN α par les siRNAs *in vitro*. Des PBMC isolées de sang humain ont été distribuées à 200 000 cellules/puits dans une plaque de 24 puits. Le lendemain, les cellules ont été transfectées avec un mélange de 100 nM/puits de siRNA et 0.25 µL/puits de Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) puis incubées durant 24 h. L'induction d'IFN α a ensuite été évaluée par ELISA avec la trousse PBL Biomedical IFN alpha kit (R&D Systems, Minneapolis, MN). Un siRNA contrôle positif (DX3076) a été utilisé à 100 nM. Chaque échantillon a été évalué en triplicata.

Induction d'IFN α et autres cytokines par les siRNAs *in vivo*. Des souris BALB/c ont reçu trois doses de siRNA (jour 2, 1 et 0 pré-infection) à une concentration de 2 ou 10 mg/kg avec ou sans formulation liposomale (MF1312). Des sérums de souris ainsi que des lavages bronchoalvéolaires (BAL) ont été collectés 4 h suivant la dernière administration de siRNA. Les cytokines évaluées par ELISA étaient l'IFN α , l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-12 p40, l'IL12 p70, l'IFN γ , le TNF α , l'IL-4, le GM-CSF, l'IL-10, l'IL-2.

Première expérience animale. Cent cinquante-six souris BALB/c femelles âgées de quatre à six semaines ont été obtenues de Charles Rivers Laboratories (Wilmington, MA). Le poids de ces souris variait entre 16 et 19 g environ. Les souris ont été divisées en 26 groupes de six souris chacun. Différents traitements ont été administrés aux souris : DsiRNA60 non-modifié, DsiRNA60 modifié-6197, DsiRNA45-mut non-modifié, DsiRNA contrôle. Quatre doses de siRNA ont été choisies : 10 mg/kg sans formulation, 2 mg/kg sans formulation, 2 mg/kg avec formulation liposomale (MF1312) et 1 mg/kg avec la formulation liposomale (MF1312). Le tableau 3 illustre ces différents groupes de souris. Les séquences de ces DsiRNAs modifiés et non-modifiés sont présentées dans la section des résultats, tableau 5. Tous les traitements ont été administrés par voie intranasale à des souris anesthésiées à l'isoflurane. Les souris ont reçu des traitements aux jours 2 et 1 pré-infection ainsi que 4 h pré-infection. Seule la dose 10 mg/kg sans formulation a également été évaluée en traitement unique 4 h pré-infection. Les souris ont reçu 2.5×10^5 TCID₅₀ de hMPV groupe A1 (C-85473) par voie intranasale après anesthésie à l'isoflurane. Le poids des souris a été évalué tous les jours à partir du jour 2 pré-infection jusqu'au jour 5 post-infection. Les souris ont été euthanasiées au jour 5 post-infection par injection de 100 µl/souris d'euthanyl et leurs poumons ont été récoltés et rapidement congelés dans l'azote liquide. Ils ont ensuite été conservés à -80°C en vue de déterminer ultérieurement les titres viraux par infection de cellules LLC-MK2 et titration en TCID₅₀.

Deuxième expérience animale. Cinquante-deux souris BALB/c femelles âgées de quatre à six semaines ont été obtenues de Charles Rivers Laboratories. Le poids de ces souris variait entre 16 et 19 g environ. Les souris ont été divisées en neuf groupes de cinq à six souris chacun. Les différents traitements qui ont été administrés sont le DsiRNA60 non-modifié, 2 versions modifiées du DsiRNA60 (DsiRNA60 modifié-6197 et DsiRNA60 modifié-6198), une version modifiée du DsiRNA45-mut (DsiRNA45-mut modifié-6174) et le contrôle DsiRNA (DX3413). Ces DsiRNAs ont été évalués à 10 mg/kg et/ou 25 mg/kg sans formulation. Le tableau 4 illustre ces différents groupes de souris. Les séquences de ces DsiRNAs modifiés et non-modifiés sont présentées dans la section des résultats, tableau 5. Tous les traitements ont été administrés par voie intranasale à des souris anesthésiées à l'isoflurane aux jours 1 pré-infection, 0 (4 h pré-infection), 1 et 2 post-infection. Les souris ont reçu 1.7×10^5 PFU de hMPV groupe A1 (C-85473) par voie intranasale après anesthésie à l'isoflurane. Le poids des souris a été noté

quotidiennement jusqu'au jour 5 post-infection. Les souris ont ensuite été euthanasiées par injection de 100 µl/souris d'euthanyl et leurs poumons ont été récoltés et rapidement congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C en vue de déterminer les titres viraux par infection de cellules LLC-MK2 et titration en TCID_{50} et par RT-PCR quantitatif en temps réel.

Titres viraux pulmonaires. Les poumons de souris ont été pesés puis homogénéisés dans 1 mL d'Opti-MEM contenant 2 µg/ml de trypsine. Des dilutions en série ont ensuite été effectuées puis déposées sur les LLC-MK2. Deux µg/ml de trypsine ont été ajoutés aux deux jours et l'apparition des ECP a été observée régulièrement durant 14 jours. Les titres viraux pulmonaires sont rapportés par gramme de poumon.

Evaluation du nombre de copies d'ARN viral dans les poumons de souris. L'ARN viral a été extrait des poumons de souris à l'aide de la trousse Total Nucleic Acid utilisée dans le MagNA Pure LC (Roche). La transcription inverse et le PCR quantitatif en temps réel ont été réalisés tels que décrits précédemment [71]. Le nombre de copies d'ARN est rapporté par gramme de poumon.

Analyses statistiques. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prims 5 en utilisant le test de l'ANOVA (analyse des variances) et le test de comparaisons multiples de Tukey. Les données présentées sont des moyennes accompagnées d'écart-type ou d'erreur standard.

Tableau 3. Différents traitements de DsiRNAs administrés aux souris infectées par le hMPV lors de la première expérience.

Groupe	Type de groupe	DsiRNA	Dose de siRNA	Formulation	Traitement (prophylaxie)	Infection
1	Traitement	DsiRNA60 NM*	10 mg/kg	PBS	Jours 2, 1, 0 pré-infection	hMPV
2	Traitement	DsiRNA60 M #	10 mg/kg	PBS	Jours 2, 1, 0 pré-infection	hMPV
3	Traitement	DsiRNA45-mut NM†	10 mg/kg	PBS	Jours 2, 1, 0 pré-infection	hMPV
4	Traitement	Dicer contrôle DX3413	10 mg/kg	PBS	Jours 2, 1, 0 pré-infection	hMPV
5	Traitement	DsiRNA60 NM	2 mg/kg	PBS	Jours 2, 1, 0 pré-infection	hMPV
6	Traitement	DsiRNA60 M	2 mg/kg	PBS	Jours 2, 1, 0 pré-infection	hMPV
7	Traitement	DsiRNA45-mut NM	2 mg/kg	PBS	Jours 2, 1, 0 pré-infection	hMPV
8	Traitement	Dicer contrôle DX3413	2 mg/kg	PBS	Jours 2, 1, 0 pré-infection	hMPV
9	Traitement	DsiRNA60 NM	2 mg/kg	MF1312	Jours 2, 1, 0 pré-infection	hMPV
10	Traitement	DsiRNA60 M	2 mg/kg	MF1312	Jours 2, 1, 0 pré-infection	hMPV
11	Traitement	DsiRNA45-mut NM	2 mg/kg	MF1312	Jours 2, 1, 0 pré-infection	hMPV
12	Traitement	Dicer contrôle DX3413	2 mg/kg	MF1312	Jours 2, 1, 0 pré-infection	hMPV
13	Traitement	DsiRNA60 NM	1 mg/kg	MF1312	Jours 2, 1, 0 pré-infection	hMPV
14	Traitement	DsiRNA60 M	1 mg/kg	MF1312	Jours 2, 1, 0 pré-infection	hMPV
15	Traitement	DsiRNA45-mut NM	1 mg/kg	MF1312	Jours 2, 1, 0 pré-infection	hMPV
16	Traitement	Dicer contrôle DX3413	1 mg/kg	MF1312	Jours 2, 1, 0 pré-infection	hMPV
17	Évaluation de la toxicité	DsiRNA60 NM	10 mg/kg	PBS	Jours 2, 1, 0 pré-infection	PBS
18	Évaluation de la toxicité	DsiRNA60 M	10 mg/kg	PBS	Jours 2, 1, 0 pré-infection	PBS
19	Évaluation de la toxicité	DsiRNA45-mut NM	10 mg/kg	PBS	Jours 2, 1, 0 pré-infection	PBS
20	Évaluation de la toxicité	Dicer contrôle DX3413	10 mg/kg	PBS	Jours 2, 1, 0 pré-infection	PBS
21	Évaluation de la toxicité	Dicer contrôle DX3413	2 mg/kg	MF1312	Jours 2, 1, 0 pré-infection	PBS
22	Contrôle positif d'infection	PBS	0	PBS	Jours 2, 1, 0 pré-infection	hMPV
23	Contrôle négatif d'infection	PBS	0	PBS	Jours 2, 1, 0 pré-infection	PBS
24	Traitement	DsiRNA60 M	10 mg/kg	PBS	4 h pré-infection	hMPV
25	Évaluation de la toxicité	DsiRNA60 M	10 mg/kg	PBS	4 h pré-infection	PBS
26	Contrôle positif d'infection	PBS	0	PBS	4 h pré-infection	hMPV

* DsiRNA60 NM : DsiRNA60 non-modifié.

DsiRNA60 M : DsiRNA60 modifié-6197.

† DsiRNA45-mut NM : DsiRNA45-mut non-modifié.

Tableau 4. Différents traitements de DsiRNAs administrés aux souris infectées par le hMPV lors de la deuxième expérience.

Groupe	DsiRNA	Dose de siRNA	Traitement (siRNA ou PBS)	Infection Jour 0
1	DsiRNA60 NM *	10 mg/kg	Jours -1, 0 1, 2	hMPV
2	DsiRNA60 M1 #	10 mg/kg	Jours -1, 0 1, 2	hMPV
3	DsiRNA60 M2 †	10 mg/kg	Jours -1, 0 1, 2	hMPV
4	DsiRNA45-mut M □	10 mg/kg	Jours -1, 0 1, 2	hMPV
5	Dicer Contrôle DX3413	10 mg/kg	Jours -1, 0 1, 2	hMPV
6	DsiRNA60 NM	25 mg/kg	Jours -1, 0 1, 2	hMPV
7	Dicer Contrôle DX3413	25 mg/kg	Jours -1, 0 1, 2	hMPV
8	hMPV	0	Jours -1, 0 1, 2	hMPV
9	PBS	0	Jours -1, 0 1, 2	PBS

* DsiRNA60 NM : DsiRNA60 non-modifié.

DsiRNA60 M1 : DsiRNA60 modifié-6197.

† DsiRNA60 M2 : DsiRNA60 modifié -6198.

□ DsiRNA45-mut M : DsiRNA45-mut modifié-6174.

5. Résultats

Test de dégradation. (Ces tests ont été réalisés et analysés par nos collaborateurs chez MDRNA).

La stabilité de quatre siRNAs non-modifiés (siRNA45-mut, DsiRNA45-mut, DsiRNA45 et DsiRNA60, figure 21) a été évaluée par spectrométrie de masse et chromatographie en phase liquide (LC-MS) à la suite d'une incubation en présence de plasma humain. Les sites les plus vulnérables à une attaque par les endonucléases et les exonucléases humaines ont ainsi pu être identifiés. Les sites majoritairement ciblés sont les pyrimidines sur les brins sens et anti-sens. Lorsque incubé en présence de nucléases, le siRNA45-mut présentait peu de dégradation, la région centrale étant intacte et seule une faible dégradation aux extrémités a été notée (<2 % de la surface totale du siRNA). La version substrat de Dicer de ce siRNA était par contre moins stable en présence de plasma humain mais les sites de dégradation se situaient encore aux extrémités du DsiRNA, surtout à l'extrémité franche (14-15 % de la surface totale du DsiRNA susceptible à la dégradation). Le DsiRNA45-mut diffère du DsiRNA45 par une paire U-A remplacée par une paire G-C à l'extrémité cohésive (figure 21). Ce changement de bases a provoqué l'apparition d'un site mineur de dégradation pour le DsiRNA45-mut alors que pour le DsiRNA45, ce site n'était pas une cible de dégradation. Étonnamment, le DsiRNA45 semblait plus susceptible en général à la dégradation par les nucléases que le DsiRNA45-mut (16-27 % comparativement à 14-15 % de la surface totale du DsiRNA). Le DsiRNA60, qui n'a aucune homologie de séquence

avec les DsiRNAs précédents, étant dirigé contre l'ARNm codant pour la protéine P du hMPV alors que les autres siRNAs ciblent l'ARNm codant pour la protéine N du virus, s'est toutefois révélé le moins stable face aux nucléases. Des sites de dégradation majeurs par les exonucléases correspondent à >20% de la surface totale du DsiRNA. Bref, pour poursuivre nos études *in vivo*, ces DsiRNAs devaient donc être abondamment modifiés.

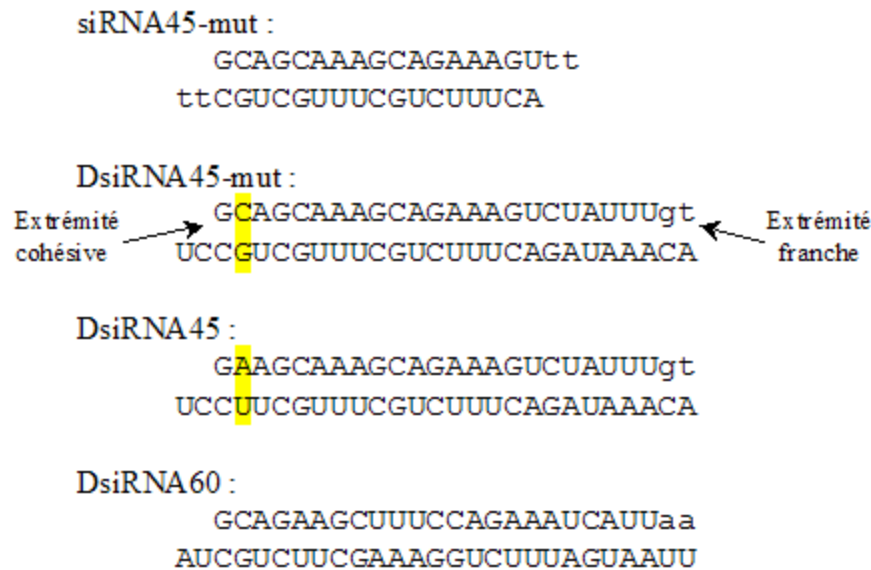


Figure 21. Séquence des siRNAs analysés par un test de dégradation. Les bases en jaune correspondent au changement d'une paire U-A dans le DsiRNA45 par une paire G-C dans le DsiRNA45-mut. Les lettres majuscules correspondent aux bases d'ARN, alors que les lettres minuscules représentent les bases d'ADN.

Modifications et activité des siRNAs *in vitro*. Les sites les plus sensibles à la dégradation étant maintenant identifiés, une modification chimique a pu être appliquée aux siRNAs pour leur conférer une meilleure résistance faces aux nucléases. Les modifications appliquées aux DsiRNAs sont constituées de bases auxquelles un groupement O-méthyl a été ajouté en position 2' du pentose (figure 22) pour contrer l'activité des endonucléases et des exonucléases. L'activité des exonucléases peut aussi être réduite par la formation d'un lien phosphorothioate (PS) entre les deux bases situées aux extrémités (un atome d'oxygène de la structure phosphate est remplacé par un atome de soufre) (figure 22) [48, 56]. Le tableau 5 présente les séquences des DsiRNAs

modifiés et non-modifiés qui ont été évalués contre les groupes A1 et B2 de hMPV. Deux des cinq DsiRNA60 modifiés ont conservé une activité inhibitrice contre le hMPV A1 et B2 comparable à la version non-modifiée de ce DsiRNA, avec des IC_{50} de 0.021 ± 0.019 nM pour le DsiRNA modifié-6197, 0.079 ± 0.005 nM pour le DsiRNA modifié-6198 et 0.022 ± 0.000 nM pour le DsiRNA60 non-modifié contre hMPV A1 et 0.022 ± 0.020 nM pour le DsiRNA modifié-6197, 0.038 ± 0.005 nM pour le DsiRNA modifié-6198 et 0.006 ± 0.004 nM pour le DsiRNA60 non-modifié contre hMPV B2. Les trois autres versions modifiées de ce DsiRNA étaient inactives ou présentaient une IC_{50} entre 10 et 100 nM et donc jugée insuffisante. Trois des six DsiRNA45-modifiés ont démontré une activité contre hMPV A1 et un seul siRNA a démontré une faible activité contre hMPV B2. Des trois DsiRNAs actifs contre hMPV A1, un seul présentait une IC_{50} similaire au DsiRNA45-modifié non-modifié : 0.056 ± 0.004 nM pour le DsiRNA-modifié-6174 comparativement à 0.025 ± 0.023 nM pour le DsiRNA45-modifié non-modifié. Aucun des cinq DsiRNA45 modifiés ne s'est avéré aussi inhibiteur que le DsiRNA45 non-modifié contre les deux groupes de hMPV et aucun ne présentait une valeur d' IC_{50} acceptable pour poursuivre l'investigation.

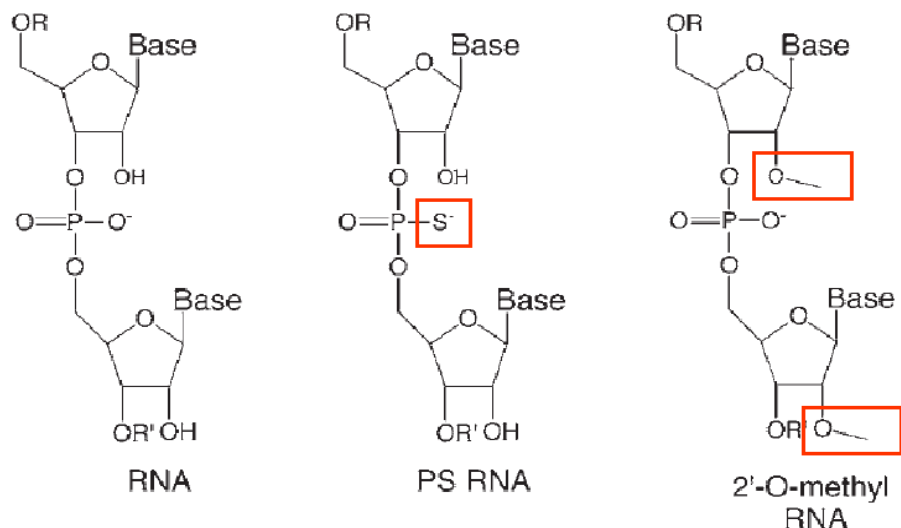


Figure 22. Modifications chimiques de l'ARN. «PS» correspond au lien phosphorothioate formé entre deux bases d'ARN lors du remplacement d'un atome d'oxygène par un atome de soufre sur le squelette de phosphate. «2'-O-methyl» correspond à l'ajout d'un groupement méthyl (CH₃) sur l'atome d'oxygène en position 2' du pentose. Adapté de [56].

Tableau 5. Résultats des essais d'inhibition pour chaque DsiRNA non-modifié et leurs versions modifiées évalués contre hMPV de type A1 et B2. Les séquences sont également fournies. Le « m » correspond à un groupement 2'-O-méthyl et le « s » correspond à un lien phosphorothioate entre deux bases d'ARN et/ou d'ADN. Les lettres majuscules précédées d'un « d » correspondent aux bases d'ADN.

DsiRNA	Séquence (5'-3')	IC ₅₀ Vs A1 (nM)	IC ₅₀ Vs B2 (nM)
60 [†]	GCAGAAGCUUCCAGAAAUCAUUDAdA UUA AUGAUUCUGGAAAGCUUCUGCUA	0.022 ± 0.000	0.006 ± 0.004
6193	mGsmCmA mGmA mAmGmCUmUmUmCmCmA mGmA mAmAmUmCAMUmUsdAsdA mUsmUmAmAmUGmAmUmUmUmCmUmGmGmA mAmGmCmUmUmCmUmGmCsUsA	Inactif *	— #
6195	mGsmCAMGAmAGmCUmUUmCCmAGmA mAUmCAMUmUsdAsdA mUsmU mA mUGmAmUmUUmCmUmGGmA mA mAGmCUmUCmUGmCsUsA	>10 *	—
6196	mGsmCAGAAGmCUmUmUmCmCAGAAAmUmCAMUmUsdAsdA mUsmU AA mUGAmUmUmUmCmUGGAAAGmCmUmUmCmUGmCsUsA	Inactif *	—
6197 [†]	mGsmCAGAAGCUUUCmCmAGAAAmUmCAUmUsdAsdA mUsmU AA AUGAUUCUGGAAAGCUUCUmGmCsUsA	0.021 ± 0.019	0.022 ± 0.020
6198 [†]	mGsmCAGAAGCUUCCAGAAAUCAUmUsdAsdA mUsmU AA AUGAUUCUGGAAAGCUUCUmCsUsA	0.079 ± 0.005	0.038 ± 0.005
45-mut [†]	GCAGCAAAGCAGAAAGUCUAUUUDGdT ACAAAUAGACUUUCUGCUUUGCUGCCU	0.025 ± 0.023	0.149 ± 0.120
6169	mGsmCmA mGmCmA mA mAGmCmA mGmA mA mA mGmUmCmUmAUmUmUsdGsT mAsmCmA mA mAUmAmGmA mCmUmUmUmCmUGmCmUmUmUmGmCmUmGmCsCsU	Inactif *	—
6170	mGsmCmA mGmCmA mA AAGCmA mGmA mA mA mGmUmCmUAUUmUsdGsT mAsmCmA mA AAUmGmA mCmUmUmUmCUGCmUmUmUmGmCmUmGmCsCsU	Inactif *	—
6171	mGsmCAMGCmA mA mAGmCAMGAA mA mGUmCUmAUmUmUsdGsT mAsmCmA mA mAUmAGmACmUUmUCmUGmCUmUUmGmCmUmGmCsCsU	1.244 *	—
6172	mGsmCAGmCAAAGmCAGAAAGmUmCmUAUmUmUsdGsT mAsmCAA AUAGAmCmUmUmUmCmUGmCmUmUmUGmCmUmGmCsCsU	Inactif *	—
6173	mGsmCAGCAAAGmCAGAAAmGmUCmUAUUmUsdGsT mAsmCAA AUAGACUmUUCUGCmUmUGCmUGmCsCsU	0.965 *	—
6174 [†]	mGsmCAGCAAAGCAGAAAGUCUAUUmUsdGsT mAsmCAA AUAGACUUUCUGCUUUGCUGmCsCsU	0.056 ± 0.004	7.019 ± 6.715

45	GAAGCAAAGCAGAAAGUCUAUUUdGdT ACAAAUAGACUUUCUGCUUUGCUUCCU	0.018 ± 0.011	0.026 ± 0.028
6181	mGsmAmAmGmCmAmAmAGmCmAmGmAmAmAmGmUmCmUmAUmUmUsdGsT mAsmCmAmAmAAUmAmGmAmCmUmUmUmCmUGmCmUmUmUmGmCmUmUmCsCsU	Inactif *	—
6182	mGsmAmAmGmCmAAGCmAmGmAmAmAmGmUmCmUAUUmUsdGsT mAsmCmAmAAUmAmGmAmCmUmUmUmCUGCmUmUmUmGmCmUmUmCsCsU	>10 *	—
6183	mGsmAAmGCmAAGmCmAmGAmAAmGUmCUmAUmUmUsdGsT mAsmCmAAMAUmAGmACmUUmUCmUGmCUmUUmGmCmUUmCsCsU	6.259 *	—
6184	mGsmAAGmCAAAGmCAGAAAGmUmCmUAUmUmUsdGsT mAsmCAAUAGAmCmUmUmUmCmUGmCmUmUmUGmCmUmUmCsCsU	>10 *	—
6185	mGsmAAGCAAAGmCAGAAAmGmUCmUAUUmUsdGsT mAsmCAAUmAGAmUmUmUCUGCUUUGCUUmCsCsU	2.784 *	—

* Ces expériences n'ont pas été répétées.

— : ces DsiRNAs n'ont pas été évalués.

† Ces DsiRNAs ont été évalués *in vivo*.

Induction d'IFN α par les siRNAs *in vitro*. (Ces tests ont été réalisés et analysés par nos collaborateurs chez MDRNA). L'induction d'IFN α par la transfection de siRNA dans des cellules humaines est peu fréquente mais demeure une possibilité. Nous avons donc quantifié l'induction d'IFN α chez des cellules mononucléées du sang périphérique humain (PBMC) par ELISA en présence de différents siRNAs. Les siRNAs non-modifiés DsiRNA60, DsiRNA45-mut, DsiRNA45 et siRNA45-mut ont été évalués et seul le DsiRNA45 présentait une augmentation significative bien que faible de la production d'IFN α (1.8X) par rapport au contrôle constitué de l'agent de transfection seul (RNAiMAX) mais l'augmentation d'IFN α demeurait significativement moins élevée que celle induite par le contrôle positif DsiRNA DX3076 (figure 23).

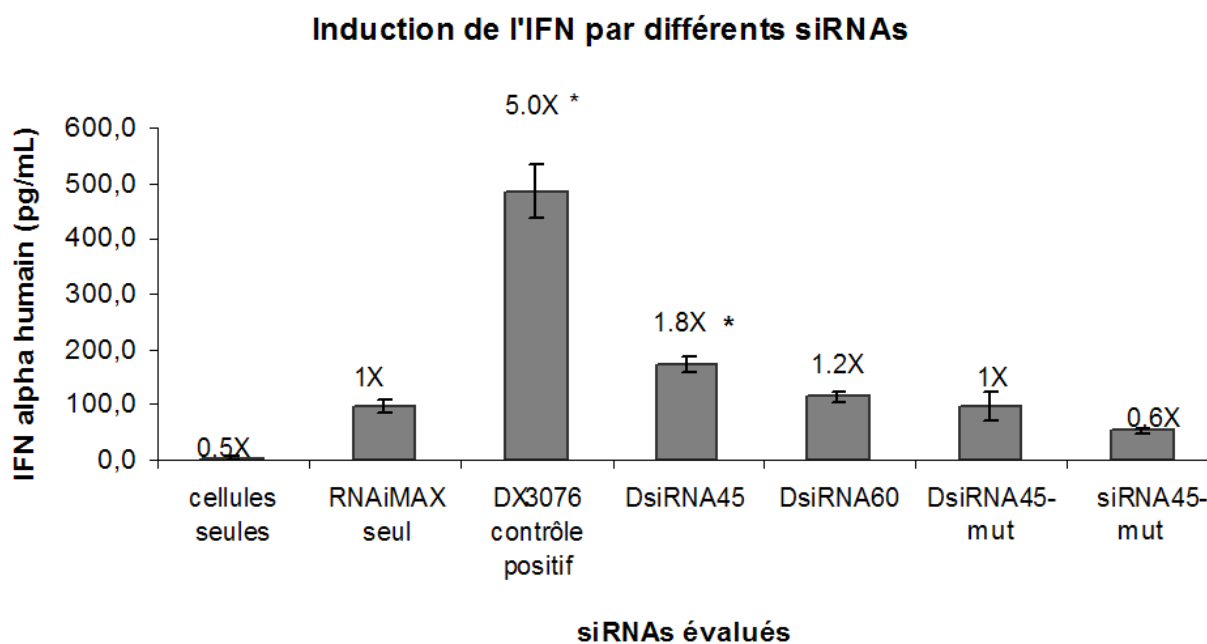


Figure 23. Induction d'IFN α humain par les différents siRNAs non modifiés chez des PBMC évaluée par ELISA. * Statistiquement significatif. Les chiffres au-dessus des colonnes représentent le ratio par rapport à l'agent de transfection RNAiMAX seul.

Induction d'IFN α par les siRNAs *in vivo*. (Ces tests ont été réalisés et analysés par nos collaborateurs chez MDRNA). De nombreux tests ont été réalisés mais, brièvement, l'induction de cytokines par le DsiRNA45-mut non-modifié est moins importante que par le DsiRNA60 non-modifié, quelque soit les concentrations évaluées, avec ou sans formulation, telle que mesurée dans les lavages bronchoalvéolaires. Les cytokines qui sont induites dans les poumons des souris (induction locale) à la suite de l'administration des DsiRNAs sont principalement l'IL-6, l'I-12 p40, l'IFN γ , le TNF α , l'IL-10 et le GM-CSF (tableau 6). La présence d'un complexe liposome-siRNA semble également augmenter l'induction de certaines cytokines (tableau 6). L'ajout de modifications chimiques (2'-O-méthyl et liens phosphorothioates) aux bases du DsiRNA60 réduit presque au niveau basal la concentration de cytokines détectée. La quantification des cytokines dans le sérum des souris (induction systémique) démontre que les niveaux de cytokines sont relativement faibles, puisque les seules cytokines détectables étaient l'IL-12 p40 et l'IL-10 avec seulement de 2 à 6 fois la concentration basale (non-illustré). De plus, le DsiRNA60 non-modifié semble induire l'IFN α lorsqu'il est administré aux souris à 10 mg/kg sans formulation et à 2 mg/kg avec formulation liposomale (MF1312) (figure 24). Le DsiRNA45-mut non-modifié et le contrôle Dicer (DsiRNA, DX3413) induisent également l'IFN α lorsqu'ils sont administrés à 2 mg/kg avec formulation. Toutefois, la présence de modifications dans le DsiRNA60 (DsiRNA60 modifié-6197) semble prévenir l'induction de cette cytokine (figure 24). Finalement, ces résultats d'induction d'IFN α par les DsiRNAs *in vivo* diffèrent des résultats obtenus par l'analyse *in vitro* (avec les PBMC) puisque le DsiRNA60 non-modifié n'avait pas démontré une capacité à induire la production d'IFN α .

Tableau 6. Augmentation de l'induction de cytokines par des DsiRNAs à 10 mg/kg sans formulation et à 2 mg/kg avec formulation liposomale MF1312 mesurée dans les lavages bronchoalvéolaires.

		hMPV60 NM [#] seul 10mg/kg	hMPV60 NM + MF1312 2 mg/kg	hMPV60 M1 [†] seul 10 mg/kg	hMPV60 M1 + MF1312 2 mg/kg	hMPV45 NM [□] seul 10 mg/kg	hMPV45 NM + MF1312 2 mg/kg	Contrôle DsiRNA (DX3413) 10 mg/kg seul	Contrôle DsiRNA (DX3413) 2 mg/kg + MF1312	Contrôle positif (DX3065) 10 mg/kg seul	MF1312 seul	
IL-6	Conc pg/mL * (fold increase)	1,33 (n/a)	109,45 (82)	66,59 (50)	5,06 (4)	4,31 (3)	26,53 (20)	41,42 (31)	9,46 (7)	86,68 (65)	288,78 (217)	305,81 (230)
IL-12 (p40)	Conc pg/mL (fold increase)	5,43 (n/a)	222,37 (41)	1874,11 (345)	14,11 (3)	65,08 (12)	149,40 (28)	186,94 (34)	24,53 (5)	995,98 (183)	6111,32 (1125)	40,09 (7)
IFN γ	Conc pg/mL (fold increase)	0,65 (n/a)	12,48 (19)	39,59 (61)	0,69 (1)	0,65 (1)	1,73 (3)	14,12 (22)	0,57 (1)	68,05 (106)	130,25 (202)	0,33 (1)
TNF α	Conc pg/mL (fold increase)	24,17 (n/a)	242,81 (10)	127,53 (5)	39,70 (2)	36,77 (2)	85,08 (4)	56,23 (2)	52,04 (2)	119,45 (5)	380,94 (16)	23,50 (1)
IL-10	Conc pg/mL (fold increase)	3,59 (n/a)	7,28 (2)	17,48 (5)	5,92 (2)	3,59 (1)	3,40 (1)	8,41 (2)	2,69 (1)	23,25 (6)	35,47 (10)	1,89 (1)
GM-CSF	Conc pg/mL (fold increase)	2,12 (n/a)	14,70 (7)	86,94 (41)	5,71 (3)	8,34 (4)	4,48 (2)	58,50 (28)	4,67 (2)	54,21 (26)	294,20 (139)	7,94 (4)

* Conc : concentration en pg/mL ; fold increase : augmentation par rapport au niveau de base (PBS).

DsiRNA60 NM : DsiRNA60 non-modifié.

† DsiRNA60 M1 : DsiRNA60 modifié-6197.

□ DsiRNA45 NM : DsiRNA45-mut non-modifié.

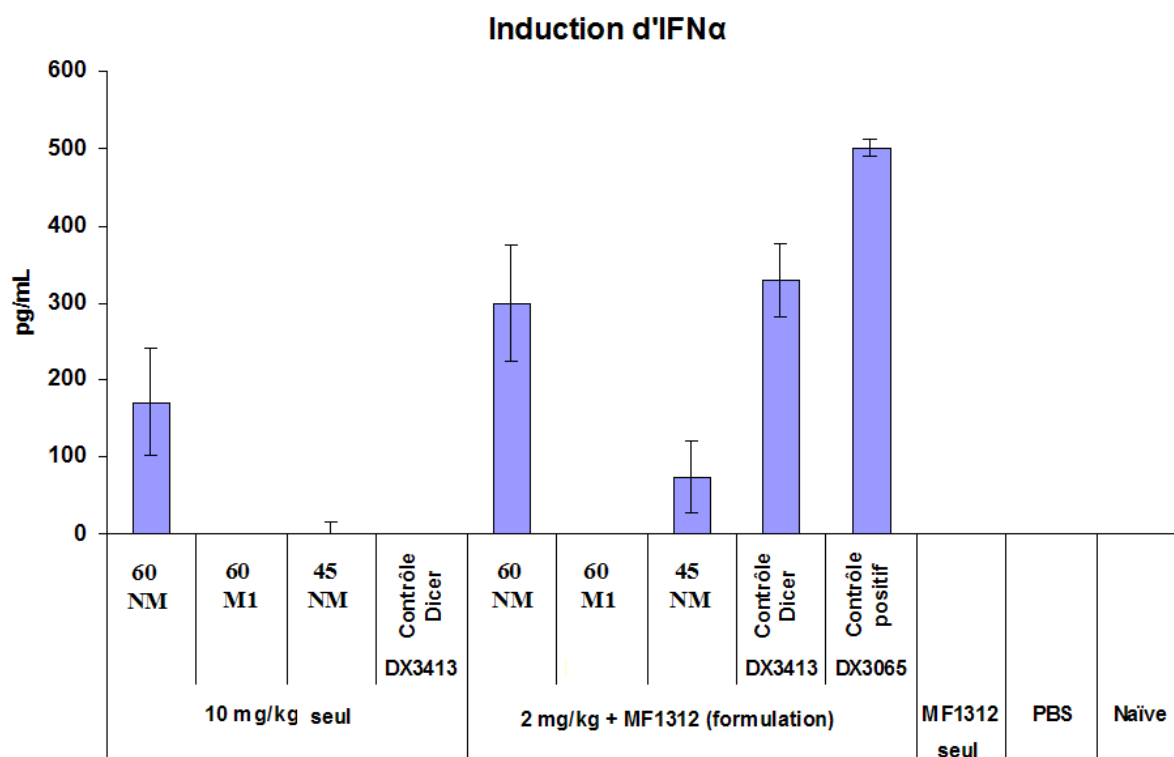


Figure 24. Induction d'IFN α par différents DsiRNAs *in vivo* mesurée dans les lavages broncho-alvéolaires par ELISA 4 h post-traitement.

Efficacité des siRNAs contre le hMPV *in vivo*, première expérience. Les différents traitements administrés aux souris sont illustrés dans le tableau 3. Trois siRNAs ont été choisis en plus d'un contrôle négatif (Dicer contrôle DX3413) : deux DsiRNAs non-modifiés (DsiRNA60 et DsiRNA45-mut) et un DsiRNA modifié (DsiRNA60 modifié-6197). Cinq types de traitement ont été analysés : administration de trois doses de DsiRNA 10 mg/kg sans formulation (PBS) (groupes 1-4); de trois doses de DsiRNA 2 mg/kg sans formulation (PBS) (groupes 5-8); de trois doses de DsiRNA 2 mg/kg avec formulation liposomale (MF1312) (groupes 9-12); de trois doses de DsiRNA 1 mg/kg avec formulation liposomale (MF1312) (groupes 13-16); et d'une dose de DsiRNA 10 mg/kg sans formulation (PBS) (groupes 25-27). La formulation liposomale MF1312 a été évaluée puisque l'utilisation d'un complexe siRNA-lipide pourrait améliorer l'efficacité du siRNA et donc diminuer la concentration requise *in vivo* pour obtenir une inhibition de la réplication virale (communication personnelle, MDRNA). Différents contrôles ont été choisis :

traitements sans infection pour évaluer la présence de toxicité associée aux siRNAs, contrôle positif d'infection traité avec du PBS et contrôle négatif d'infection (PBS) traité avec du PBS. Puisque l'infection des souris BALB/c par le hMPV entraîne une perte de poids et une réplication virale pulmonaire, l'inhibition de la réplication virale par un siRNA peut être rapidement évaluée *in vivo*. Le poids des souris a donc été noté du premier jour de traitement (jour 2 pré-infection) jusqu'au jour 5 post-infection. Malheureusement, la perte de poids maximale du contrôle d'infection (souris infectées par le hMPV mais traitées avec du PBS) s'est avérée faible, environ 5 % (au lieu de ~15 % attendu), ce qui pourrait avoir rendu impossible l'observation d'une différence significative entre les différents groupes. La figure 25 démontre l'effet des différentes concentrations de siRNA avec formulation liposomale (MF1312) ou sans formulation (seul) sur le poids des souris. Aucune des conditions évaluées durant ce protocole n'a semblé prévenir la perte de poids des souris dans ces conditions expérimentales. L'administration de trois doses par rapport à une seule dose n'a pas non plus permis de limiter la perte de poids associée à l'infection par le hMPV (figures 25 et 26).

Les groupes de souris contrôles ayant reçu les traitements mais non-infectées ont permis d'évaluer la toxicité potentielle associée à un traitement répété avec des DsiRNAs. Une perte de poids chez des souris traitées mais non infectées peut être un signe de toxicité. Puisque l'administration de nos différents DsiRNAs n'a provoqué aucune perte de poids chez les souris, cela laisse suggère une absence de toxicité systémique de ces composés (figure 27).

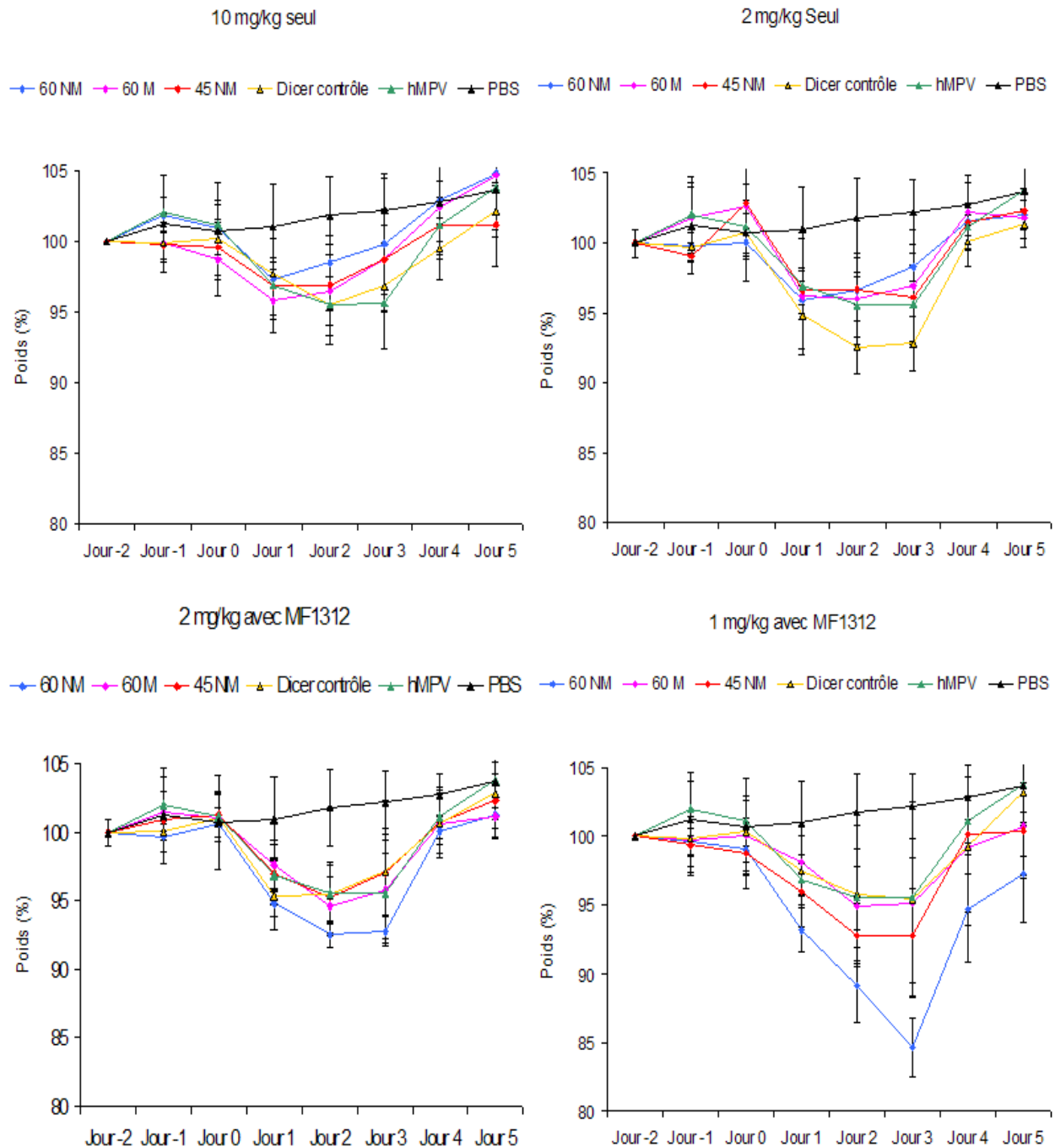


Figure 25. Poids (% par rapport au poids initial) des souris recevant différents traitements du jour 2 pré-infection au jour 5 post-infection par le hMPV. 60 NM : DsiRNA60 non-modifié; 60 M : DsiRNA60 modifié-6197; 45 NM : DsiRNA45-mut non-modifié; Dicer contrôle : DsiRNA contrôle négatif; hMPV: souris infectées ayant reçu du PBS comme traitement; PBS : souris ayant été traitées et infectées avec du PBS. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type.

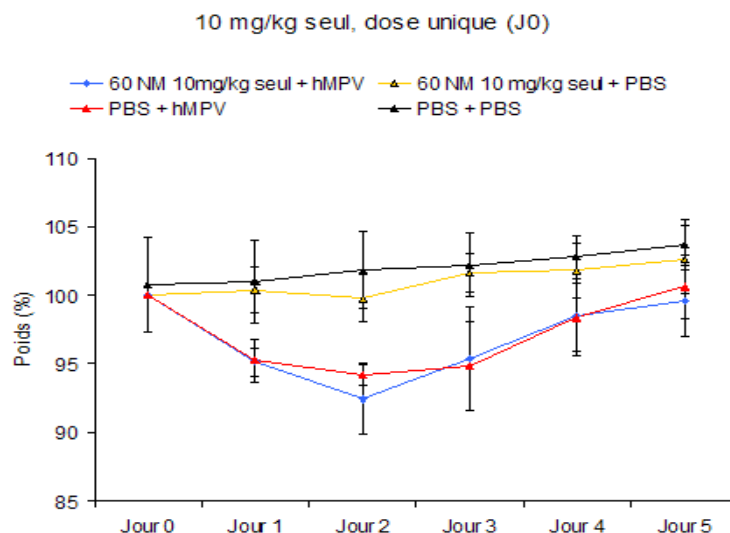


Figure 26. Poids (% par rapport au poids initial) des souris traitées avec une dose unique de siRNA 10 mg/kg 4 h avant l'administration intranasale de hMPV. 60 NM : DsiRNA60 non-modifié; PBS + hMPV : souris infectées ayant reçu du PBS comme traitement; PBS + PBS : souris ayant été traitées et infectées avec du PBS. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type.

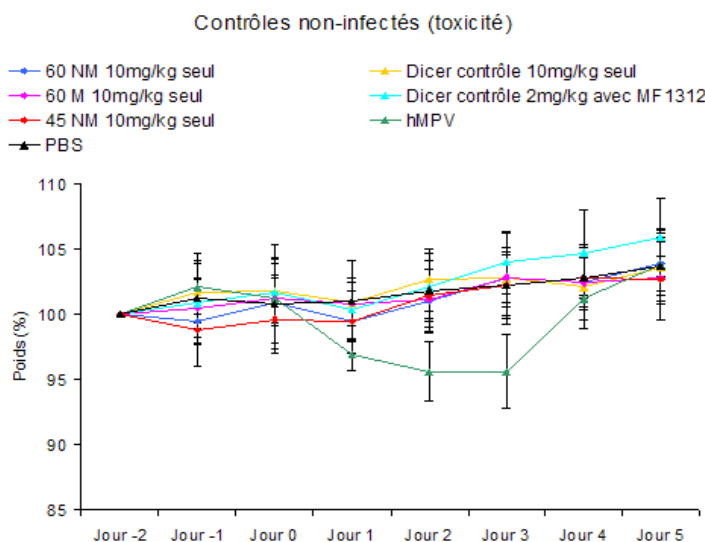


Figure 27. Poids (% par rapport au poids initial) des souris traitées non-infectées. 60 NM : DsiRNA60 non-modifié; 60 M : DsiRNA60 modifié-6197; 45 NM : DsiRNA45-mut non-modifié; Dicer contrôle : DsiRNA contrôle négatif; hMPV: souris infectées ayant reçu du PBS comme traitement; PBS : souris ayant été traitées et infectées avec du PBS. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type.

Efficacité des siRNAs contre le hMPV *in vivo*, deuxième expérience. Puisque le contrôle positif d'infection lors de la première expérience n'avait pas atteint la perte de poids de ~15 % recherchée et permettant d'observer une différence significative entre les traitements et le contrôle, une deuxième expérience a été réalisée avec un inoculum viral plus important. De plus, de nouveaux DsiRNAs et des conditions d'administration différentes ont été choisis pour cette nouvelle expérience. Les différents groupes de souris évalués lors de la deuxième expérience *in vivo* sont illustrés dans le tableau 4. Cette fois, les DsiRNA60 non-modifié, DsiRNA60 modifié-6197, DsiRNA60 modifié-6198, DsiRNA45-mut modifié-6174 ainsi que le contrôle Dicer DX3413 ont été administrés à 10 mg/kg au jour 1 pré-infection, 4 h pré-infection, au jour 1 post-infection et au jour 2 post-infection. Le DsiRNA60 non-modifié ainsi que le contrôle Dicer DX3413 ont également été administrés à 25 mg/kg selon le même horaire. Deux autres groupes contrôles ont été utilisés : des souris traitées au PBS selon le même horaire et infecté par le hMPV (contrôle positif d'infection), et un groupe de souris traitées au PBS et ayant reçu du PBS au lieu du virus. La perte de poids observée chez les souris faisant partie du groupe contrôle positif d'infection a atteint son maximum au jour 3 post-infection avec une perte de poids d'environ 12 %. Les souris ayant été traitées avec le DsiRNA45-mut modifié-6174 10 mg/kg ont démontré une perte de poids moins importante que le Dicer contrôle 10 mg/kg du jour 3 post-infection au jour 5 post-infection (figure 28) et cette différence était statistiquement significative ($P < 0.05$). D'ailleurs, ce groupe de souris n'était plus différent du groupe de souris non-infectées (PBS) à partir du jour 3 post-infection ($P < 0.05$). La quantification d'ARN viral dans les poumons de souris confirme également l'activité inhibitrice de ce DsiRNA *in vivo* avec 3.5×10^9 copies d'ARN par gramme de poumon comparativement à 6.2×10^9 copies d'ARN pour le contrôle Dicer (statistiquement significatif, $P < 0.05$) (figure 29). De plus, bien que les souris traitées avec le DsiRNA60 non-modifié n'aient pas été protégées contre la perte de poids associée à l'infection par le hMPV (figure 28), ce traitement a permis d'inhiber la réplication du virus tel que mesuré par RT-PCR quantitatif avec 3.3×10^9 copies d'ARN pour le DsiRNA60 non-modifié comparativement à 6.2×10^9 copies d'ARN pour le contrôle DsiRNA (statistiquement significatif, $p < 0.05$) (figure 29). Les titres viraux pulmonaires déterminés par culture virale sur cellules LLC-MK2 suggèrent également une inhibition de la réplication du hMPV par ces DsiRNA mais les résultats obtenus ne permettent pas de confirmer statistiquement les différences observées par RT-PCR (figure 29).

Activité des siRNAs dans un modèle murin d'infection par le hMPV

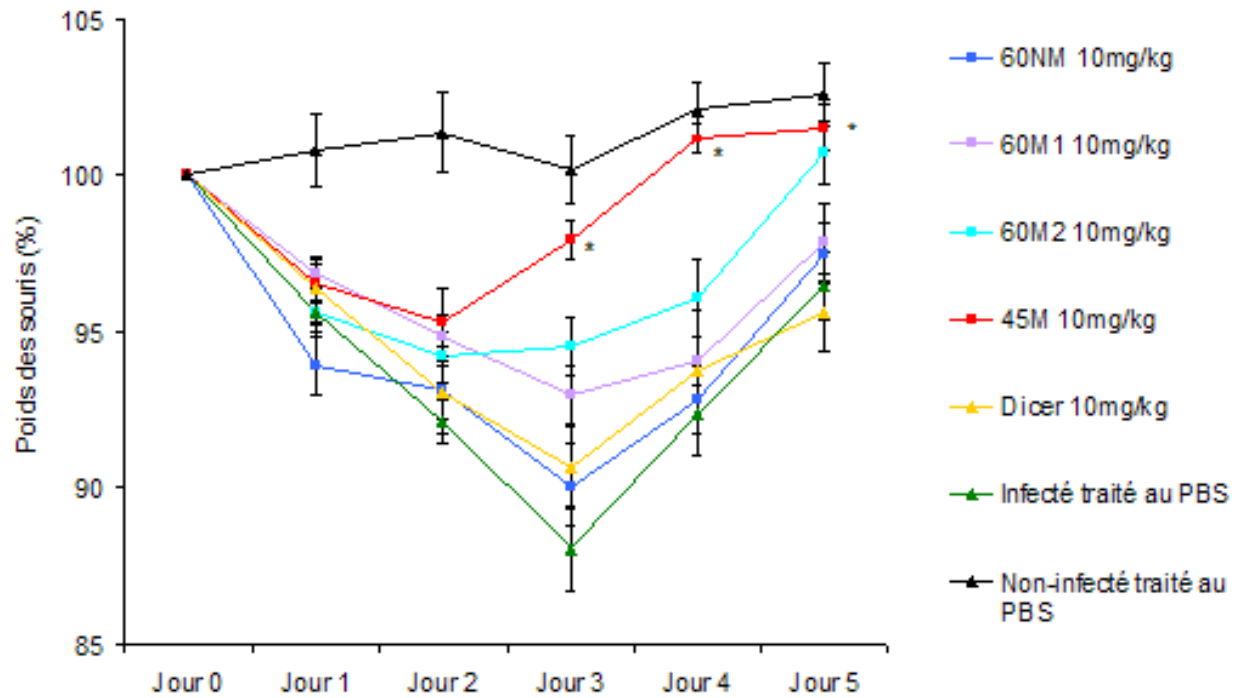


Figure 28. Poids (% par rapport au poids initial) des souris ayant reçu 10 mg/kg de DsiRNAs aux jours -1, 0, 1 et 2 de l'infection par le hMPV. 60NM : DsiRNA60 non-modifié; 60M1 : DsiRNA60 modifié-6197; 60M2 : DsiRNA60 modifié-6198; 45M : DsiRNA45-mut modifié-6174, Dicer : contrôle DsiRNA (DX3413). * Statistiquement différent de Dicer 10 mg/kg ($P < 0.05$). La barre d'erreur correspond à l'écart-type.

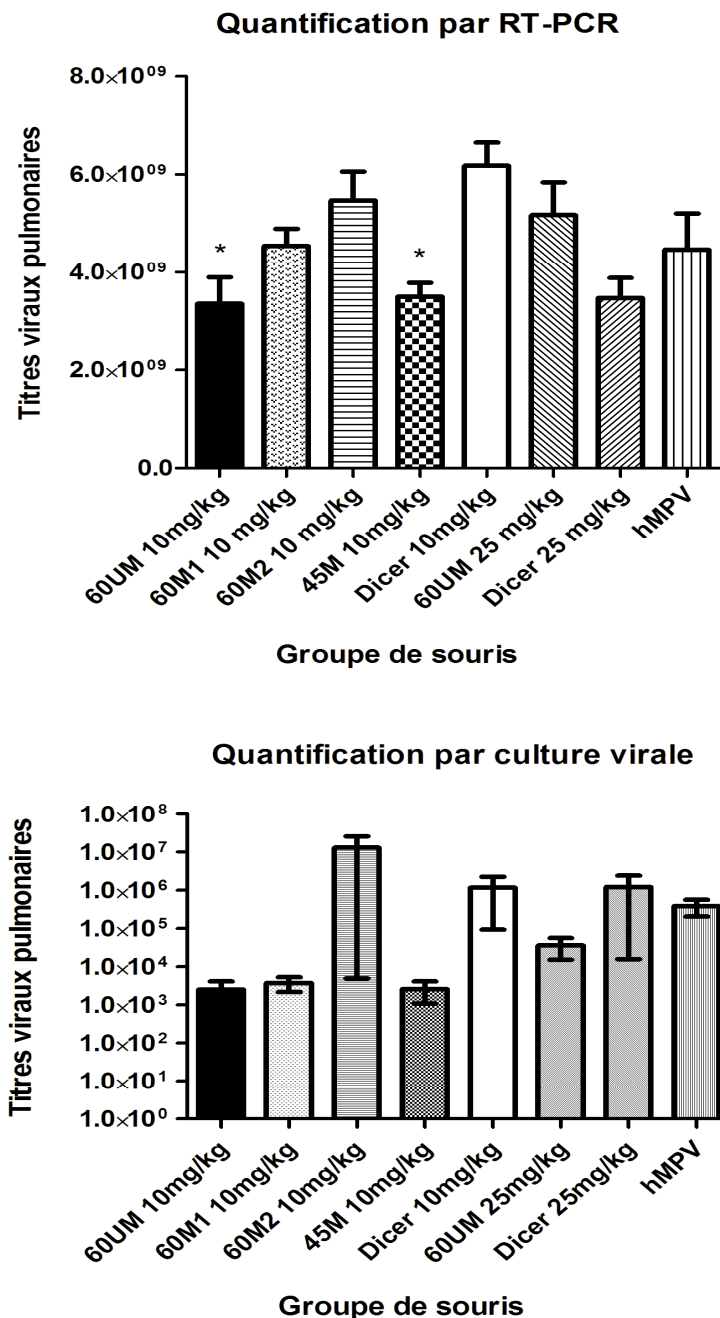


Figure 29. Titres viraux pulmonaires évalués par RT-PCR quantitatif (copies d'ARN viral par gramme de poumon) et culture virale (TCID₅₀/gramme de poumon) des différents traitements de DsiRNAs administrés aux souris aux jours -1, 0, 1 et 2 de l'infection par le hMPV. 60UM : DsiRNA60 non-modifié; 60M1 : DsiRNA60 modifié-6197; 60M2 : DsiRNA60 modifié-6198; 45M : DsiRNA45-mut modifié-6174; Dicer : contrôle DsiRNA (DX3413); hMPV : souris infectées par hMPV et traitées avec du PBS. * Statistiquement différent du groupe Dicer (P < 0.05). Les barres d'erreur correspondent à l'erreur-type.

En parallèle, l'activité inhibitrice *in vivo* du DsiRNA60 non-modifié a également été évaluée à une dose de 25 mg/kg administrée une fois par jour, du jour 1 pré-infection jusqu'au jour 2 post-infection. Tout comme à 10 mg/kg, l'administration de ce DsiRNA à une concentration de 25 mg/kg n'a pas permis d'empêcher la perte de poids associée à l'infection par le hMPV (figure 30). Toutefois le contrôle négatif DsiRNA utilisé à 25 mg/kg (Dicer 25 mg/kg) a entraîné une réduction statistiquement significative de la perte de poids des souris à partir du jour 3 jusqu'au jour 5 post-infection (figure 30). Cela pourrait s'expliquer entre autres par une induction d'IFN α lorsqu'une concentration aussi forte est utilisée. Par contre, les titres viraux pulmonaires de ce groupe ne sont pas statistiquement différents du groupe de souris infectées par le hMPV et traitées au PBS (figure 29). Davantage d'analyses seront donc requises pour mieux définir le potentiel antiviral de ces DsiRNAs ainsi que pour confirmer le choix du Dicer contrôle.

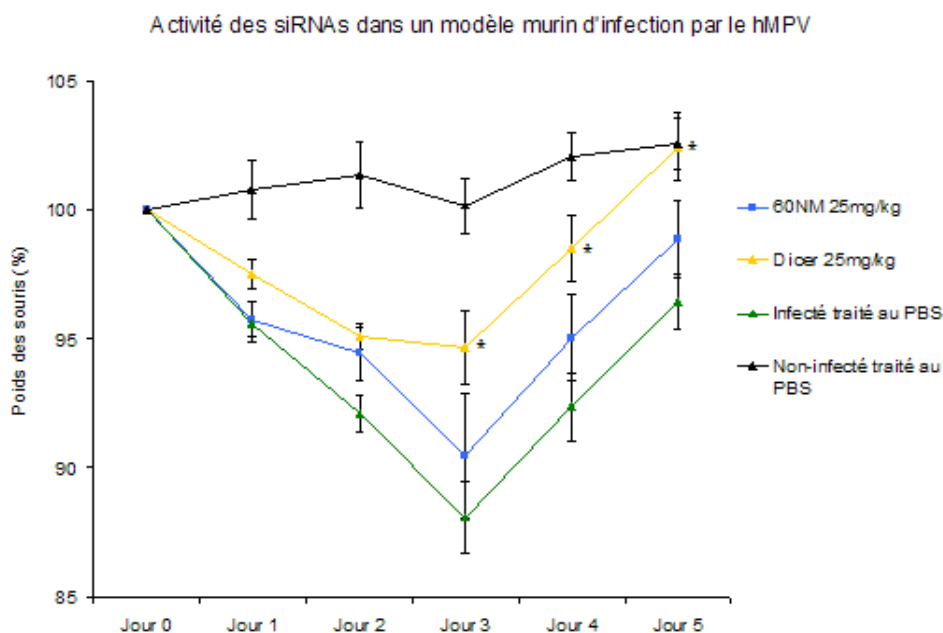


Figure 30. Poids (% par rapport au poids initial) des souris recevant différents DsiRNAs à 25 mg/kg aux jours -1, 0, 1 et 2 de l'infection par le hMPV. 60NM : DsiRNA60 non-modifié; Dicer : contrôle DsiRNA (DX3413). * Statistiquement différent de infecté traité au PBS ($P < 0.05$). Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type.

6. Discussion et conclusion

L'étude de l'activité antivirale de siRNAs de 21 bases et de substrats de Dicer (DsiRNAs) contre hMPV *in vitro* s'est avérée prometteuse. Nous avons donc entrepris de caractériser le pouvoir inhibiteur des DsiRNA45 et DsiRNA60 dans un modèle animal. L'utilisation de siRNA *in vivo* est toutefois associée à certaines limitations c'est-à-dire une susceptibilité des siRNAs aux nucléases, un besoin d'optimisation des doses de siRNAs à administrer et des voies d'administration, du choix d'un traitement unique par rapport à des traitements multiples, de l'utilisation d'une formulation, une induction potentielle d'IFN et autres cytokines, de la toxicité et des effets non-spécifiques, entre autres. De nombreux essais *in vivo* sont donc nécessaires pour déterminer la combinaison optimale.

Les siRNAs et les DsiRNAs sont susceptibles à la dégradation par les nucléases humaines. La dégradation des siRNAs par des endonucléases et exonucléases peut être évitée ou diminuée en modifiant chimiquement les molécules d'intérêt ou par l'utilisation d'une molécule de transport (formulation) [20]. Des modifications telles que l'ajout de groupement 2'-O-methyl sur certaines bases et d'un lien phosphorothioate entre deux bases d'un brin du siRNA peut améliorer la stabilité du duplex d'ARN *in vivo*. En plus de conférer une protection contre les nucléases, la modification chimique des siRNAs peut procurer d'autres avantages, notamment au niveau du système immunitaire en réduisant les risques d'induction d'IFN, mais aussi en améliorant leur biodistribution, le transport vers les cellules et la pharmacocinétique. De même, une stabilité accrue implique une durée de vie plus longue et donc une action prolongée de l'effet antiviral [20, 56]. La spécificité du siRNA pourrait aussi être améliorée puisqu'une modification en position 2 du brin guide semble réduire la survenue d'inhibition non-spécifique ou hors-cible (« off-target ») [202].

Certaines bases des siRNAs à l'étude (DsiRNA45-mut, DsiRNA45 et DsiRNA60) ont été modifiées par l'ajout d'un groupement 2'-O-methyl et/ou de liens phosphorothioates aux sites identifiés comme étant vulnérables aux nucléases. Ces siRNAs modifiés et non-modifiés ont été comparés *in vitro* contre des souches de hMPV représentant les groupes A et B. Bien que le groupement OH en position 2' des pentoses du siRNA ne semble pas impliqué dans la reconnaissance et le clivage du mRNA cible et que les modifications apportées à cette position ne

soient pas connues comme pouvant influencer l'activité du siRNA [48], notre étude démontre qu'un nombre élevé de modifications chimiques réduit considérablement l'activité inhibitrice des siRNAs dans un contexte d'infection *in vitro* par le hMPV (tableau 5).

L'ajout de modifications chimiques corrèle donc avec une diminution de leur activité contre hMPV. Il semble que cette relation entre le niveau de modifications et le niveau d'inhibition soit inversement proportionnelle c'est-à-dire que plus le nombre de bases modifiées est important, moins le siRNA semble inhiber la réplication du hMPV *in vitro*. Nous avons toutefois été en mesure d'identifier deux DsiRNAs faiblement modifiés (DsiRNA60 modifié-6197 et DsiRNA60 modifié-6198, tableau 5) qui sont demeurés efficaces contre les deux groupes de hMPV. Il existe également d'autres modifications chimiques pouvant être apportées aux acides nucléiques [48, 56] et une analyse plus exhaustive de différents types et emplacements de modifications chimiques sur les siRNAs pourrait permettre d'obtenir un siRNA à la fois stable et efficace contre le hMPV. De plus, les siRNAs évalués ici comportaient des modifications sur les brins sens et antisens, alors qu'une étude suggère que la présence de liens phosphorothioates sur les deux brins du duplex peut affecter son activité [48]. De plus, l'ajout de groupement 2'O-méthyl sur des bases d'un ou des deux brins du siRNA a été associé ou non à une perte d'activité [7, 48]. La structure de l'ARN en hélice-A est également une caractéristique importante dans l'activité du duplex d'ARN et la présence de modifications dans le sillon majeur peut inhiber sévèrement le processus d'interférence à l'ARN [202]. Le choix de l'emplacement des modifications devrait donc tenir compte de cette caractéristique.

De plus, bien que les modifications chimiques permettent de stabiliser les duplex et prolonger la survie des siRNAs dans un environnement riche en nucléases, la dégradation entraînée par le plasma peut être très rapide et l'emploi d'un véhicule de transport ou formulation peut en améliorer la pharmacocinétique [20]. Notre étude visait donc également à comparer l'efficacité d'une formulation lipidique par rapport à l'utilisation de DsiRNAs nus dans un contexte d'infection *in vivo* par le hMPV.

Néanmoins, puisque l'objectif ultime était de développer un siRNA efficace contre hMPV qui serait administré directement au niveau des voies respiratoires donc localement (aérosolisé ou nébulisé par exemple), le risque associé à la dégradation rapide par les nucléases est moins

présent que lors d'une administration systémique. Les modifications chimiques peuvent donc être bénéfiques mais ne semblent pas totalement essentielles. De même, l'identification d'un véhicule de transport tel qu'une formulation lipidique ou la liaison du siRNA avec un peptide, une molécule de cholestérol ou une nanoparticule peut s'avérer également très avantageuse. Un complexe siRNA-véhicule de transport peut faciliter l'introduction du siRNA dans des tissus ou des cellules normalement réfractaires aux siRNAs, en plus d'offrir une protection contre les nucléases [56, 64, 65].

Bien qu'une seule étude ait démontré la capacité des siRNAs à induire la voie de l'IFN [217], nous voulions évaluer l'impact de nos DsiRNAs sur la production d'IFN α . Lorsque transfecté dans des PBMC humains, seul le DsiRNA45 a démontré une augmentation de 1.8X la quantité d'IFN α comparativement à l'agent de transfection seul. Toutefois, l'expérience a été réalisée avec une concentration bien supérieure à la IC₅₀ (100 nM vs 0.018 nM contre hMPV A1); il est donc peu probable que l'induction d'IFN α soit responsable de l'activité antivirale *in vitro* de ce DsiRNA. De plus, ce DsiRNA n'a pas été sélectionné pour poursuivre l'analyse *in vivo* bien que l'ajout de modifications aurait pu être avantageuse et corriger le problème. Alors que trois des quatre siRNAs n'ont pas été associés à une induction d'IFN α *in vitro*, trois DsiRNAs (le DsiRNA60 non-modifié, le DsiRNA45 non-modifié et le contrôle DsiRNA) ont induit l'expression d'IFN α *in vivo* à certaines concentrations. Heureusement, l'ajout de modifications chimiques semble permettre de réduire presque entièrement l'induction d'IFN α [55] et c'est effectivement ce que nous avons observé. De même, ces essais soulignent le manque de corrélation entre l'analyse d'induction d'IFN α *in vitro* et l'évaluation de l'induction d'IFN α et de cytokines *in vivo*. Notre expérience démontre également que l'induction d'IFN α par un siRNA peut être dépendante de sa séquence mais aussi des concentrations de siRNA évaluées. Bien que l'utilisation d'une formulation liposomale permette de diminuer la concentration de siRNA requise pour obtenir un effet antiviral satisfaisant, le complexe liposome-DsiRNA évalué ici a démontré une certaine induction d'IFN α et autres cytokines *in vivo*. De plus, l'analyse de l'expression des cytokines au niveau pulmonaire a révélé une induction de l'IL-6, le TNF α , l'IL12 p40 et l'IFN γ par les DsiRNAs non-modifiés mais très peu par les DsiRNAs modifiés, alors que les concentrations de cytokines détectées dans le sérum étaient généralement faibles.

La sélection *in vitro* de DsiRNAs modifiés et non-modifiés efficaces contre le hMPV nous a permis de poursuivre l'étude de l'inhibition du hMPV médiée par l'interférence à l'ARN dans un modèle *in vivo*. Bien que cette étude chez la souris ne soit pas encore complétée, nous pouvons tout de même démontrer une activité de certains DsiRNAs *in vivo*.

La première expérience réalisée suggère l'absence de toxicité des DsiRNAs lorsque administrés à 10 mg/kg seul ou à 2 mg/kg avec formulation aux jours 2 et 1 pré-infection et 4 h pré-infection. Toutefois, l'analyse de la capacité antivirale des DsiRNAs n'avait pu être correctement évaluée dans les conditions expérimentales choisies puisque la réplication virale s'était avérée insuffisante (perte de poids maximale d'environ 5 % chez les souris infectées par hMPV et traitées au PBS). Cette expérience suggérait également l'absence d'activité inhibitrice pour les DsiRNA60 non-modifié, DsiRNA60 modifié-6197 et DsiRNA45-mut non-modifié, et ce, à toutes les concentrations évaluées.

L'éventail de concentrations de siRNAs évaluées *in vivo* ne semble pas être la cause de cet apparent échec thérapeutique. Les concentrations de 1 mg/kg, 2 mg/kg et 10 mg/kg choisies semblaient appropriées puisqu'une expérience similaire avec le siRNA ALN-RSV01 a démontré une forte activité antivirale *in vivo* à une concentration de 2 mg/kg lorsque administré 4 h avant ou 24 h après l'infection intranasale de hRSV [177]. Il est possible que les siRNAs sélectionnés ne soient pas suffisamment inhibiteurs à de telles concentrations et, dans ce cas, des siRNAs différents ou modifiés devront être évalués.

Il est également possible que les siRNAs utilisés ne soient pas optimaux en ce qui concerne la résistance aux nucléases puisque deux des siRNAs n'étaient pas modifiés et que le troisième siRNA ne l'était que légèrement. De même, le choix de la molécule de transport MF1312 pourrait être inapproprié. Cette formulation liposomale n'est peut-être pas suffisamment efficace pour se complexer au siRNA et l'acheminer jusqu'aux cellules cibles ou alors pour le protéger de la dégradation. D'autres formulations lipidiques ou peptidiques ainsi que des nanoparticules pourraient être utilisées comme alternatives et les siRNAs pourraient être évalués en remplacement des DsiRNAs.

Il est donc possible que les conditions expérimentales choisies aient été inadéquates pour observer une inhibition du hMPV par un de ces siRNAs. L'administration intranasale de 2.5 à 5×10^5 TCID₅₀ de hMPV provoque normalement une perte graduelle de poids chez les souris infectées pouvant atteindre ~15% au pic de réplication c'est-à-dire au jour 5. Malheureusement, notre inoculum dont le titre correspondait à 2.5×10^5 TCID₅₀ en culture cellulaire n'a pas semblé suffisamment infectieux pour reproduire le cours normal de l'infection par le hMPV chez des souris BALB/c et a induit une très faible perte de poids de l'ordre de 5% aux jours 2-3 suivie d'un regain presque total de poids au jour 4. De plus, les souris n'ont peu ou pas présenté les symptômes cliniques habituellement associés à une infection sévère par le hMPV c'est-à-dire un pelage hérissé, un dos voûté et une léthargie, entre autres.

Tous ces résultats suggéraient donc la nécessité de poursuivre notre évaluation de ces DsiRNAs *in vivo*. La deuxième expérience animale a permis de démontrer l'activité antivirale d'un DsiRNA qui n'avait pas été initialement évalué *in vivo*, le DsiRNA45-mut modifié-6174, en plus de suggérer une possible activité du DsiRNA60 non-modifié évalué précédemment. Le DsiRNA45-mut modifié-6174, administré à 10 mg/kg quotidiennement du jour 1 pré-infection au jour 2 post-infection, a permis de freiner la perte de poids des souris entre les jours 3 et 5 post-infection (statistiquement significatif) et de diminuer les titres viraux pulmonaires au jour 5 tels qu'évalués par RT-PCR quantitatif (statistiquement significatif). De plus, le DsiRNA60 non-modifié, administré à 10 mg/kg, a permis de diminuer les titres viraux pulmonaires au jour 5 évalués par RT-PCR quantitatif (statistiquement significatif) mais n'a pas permis de freiner la perte de poids associée à l'infection. Ce même DsiRNA, administré à 25 mg/kg, n'a pas non plus démontré d'activité antivirale suggérée par une diminution de la perte de poids et de la réplication virale pulmonaire. Étonnamment, le contrôle DsiRNA, lorsqu'administré à 25 mg/kg, a entraîné une diminution de la perte de poids des souris, bien que cela ne soit pas associée à une diminution des titres viraux pulmonaires par rapport aux souris infectées par le hMPV et traitées avec du PBS. Ceci pourrait suggérer une induction d'IFN ou d'autres cytokines lorsqu'une concentration aussi élevée de DsiRNA est employée *in vivo*. Cette concentration du contrôle DsiRNA n'a d'ailleurs pas été évaluée *in vivo* pour sa capacité à induire l'expression de cytokines et cette mesure devra être effectuée.

De plus, lors de cette deuxième expérience, la toxicité des DsiRNAs n'a pas été évaluée chez la souris. Bien que la première expérience ait démontré l'absence de toxicité des DsiRNAs, une étude plus approfondie devra être réaliée pour confirmer l'absence d'effet toxique associé à l'administration de DsiRNA. Lors de cette deuxième expérience, des DsiRNAs différents ont été utilisés ainsi qu'une concentration supérieure et des temps d'administration différents. L'évaluation de la toxicité dans ces conditions devra donc être réalisée. De même, la mesure de perte de poids des souris n'est qu'un indice de la présence de toxicité. L'évaluation du poids spécifique de différents organes (dont le foie) des souris traitées versus non-traitées, des analyses sanguines et des études de pharmacocinétique pourraient être réalisées pour confirmer l'absence d'effets indésirables associés à l'administration de ces DsiRNAs.

Il est également possible que la corrélation entre la perte de poids des souris et l'infection par le hMPV ne soit pas parfaite et que ce paramètre ne représente pas le choix idéal pour évaluer l'activité antivirale des DsiRNAs *in vivo*. De même, la corrélation imparfaite entre les titres viraux pulmonaires évalués par RT-PCR quantitatif et par culture virale démontre qu'il est primordial d'ajouter d'autres paramètres à une évaluation *in vivo*, tels qu'une mesure de la capacité respiratoire et de l'obstruction des voies respiratoires des souris infectées et traitées, une observation de l'inflammation pulmonaire et une évaluation de la susceptibilité des souris à une surinfection bactérienne (par le streptocoque par exemple).

Une étude plus poussée sera maintenant nécessaire pour déterminer la concentration optimale de DsiRNA permettant d'inhiber la réplication du hMPV *in vivo*, par l'utilisation d'un modèle létal d'infection et l'évaluation de paramètres supplémentaires. De même, l'activité antivirale du DsiRNA45-mut modifié-6174 devra être confirmée par l'infection de souris par un hMPV du groupe B puisque cet siRNA n'avait que faiblement inhibé la réplication du hMPV B2 *in vitro*. De nouvelles modifications chimiques pourraient également être apportées à ces DsiRNAs afin de réduire l'induction d'IFN α , tout en maintenant le pouvoir inhibiteur des DsiRNAs contre tous les groupes de hMPV *in vivo*. De même, différentes molécules de transport devraient être examinées. Malgré tout, l'interférence à l'ARN demeure une avenue extrêmement prometteuse pour le traitement des infections virales respiratoires.

Chapitre VI. Discussion générale

Le hMPV s'inscrit sur la liste des principaux virus responsables des infections des voies respiratoires. Les individus dont le système immunitaire est plus faible présentent davantage de risques de développer une infection sévère pouvant même causer la mort. Le hMPV semblerait également un facteur de risque pour le développement d'asthme chez les enfants. Actuellement, la ribavirine est la seule molécule antivirale potentiellement active contre le hMPV mais elle présente des inconvénients et risques majeurs. Il est donc primordial de mettre rapidement au point des antiviraux hautement efficaces contre le hMPV. Les chapitres III et IV représentent les efforts que nous avons mis pour développer des nouvelles molécules pour lutter contre le hMPV : un inhibiteur peptidique de la fusion du hMPV et des siRNA dirigés contre les protéines N et P de ce virus.

1. Cibler la première étape de l'infection par le hMPV par le développement d'un inhibiteur de fusion représente une bonne option prophylactique.

Lors de l'infection d'un individu sain par le hMPV, la première étape du cycle répliatif correspond à l'entrée du virus dans les cellules cibles par un mécanisme de fusion bien caractérisé chez les membres de la famille des *Paramyxoviridae*. Cette étape est réalisée par l'activation de la protéine de fusion qui se trouve à la surface du virion et qui s'insère dans la membrane de la cellule cible. Cela entraîne un repliement de la protéine F durant lequel les deux domaines essentiels HRA et HRB de la protéine F interagissent. Ces régions présentent une propriété fort intéressante : chaque région adopte une structure en hélice α capable de s'associer entre elles pour former une superhélice très stable. Cette particularité a déjà été exploitée avec succès pour combattre les infections par le VIH en produisant des peptides qui miment un de ces domaines. Nous avons donc adopté la même approche pour le hMPV telle que présentée au chapitre III.

Six peptides mimant le domaine HRB et trois peptides mimant la région HRA ont été produits. Plus de peptides ont été choisis à partir du domaine HRB puisque les études sur le VIH et sur de nombreux paramyxovirus ont démontré une supériorité des peptides issus de cette région [43,

148, 256, 258]. Étonnamment, notre étude a révélé que le peptide le plus efficace pour inhiber la réplication du hMPV provenait de la région HRA. L'équipe de Miller et al a également rapporté la supériorité d'un peptide mimant la région HRA par rapport à la région HRB pour une autre souche de hMPV [178]. De plus, c'est le peptide le plus long (HRA2) qui s'est avéré le plus inhibiteur. Toutefois, la longueur ne semble pas être la seule caractéristique impliquée dans l'activité du peptide puis qu'un peptide issu du HRB constitué de 43 acides aminés (comparativement à 48 acides aminés pour HRA2) était inactif. Par contre, le peptide identifié par Miller et al, qui comprend 43 acides aminés comparativement à 48 pour notre peptide HRA2, et qui correspond à la même région que le HRA2, présente une IC_{50} de 46 nM alors que notre peptide HRA2 a une valeur de IC_{50} de 2.1 nM. La séquence semble donc jouer un rôle très important puisque les trois peptides dérivés du HRA se sont montrés efficaces à différent degrés comparativement à deux des six peptides du HRB. La capacité du peptide à adopter une structure en hélice α au contact des domaines HRA et HRB pourrait toutefois être le facteur déterminant [178, 244] puisque, bien que le peptide HRA2 ne présente que 50% de similarité de séquence avec le domaine HRA du hRSV, ce peptide inhibe la réplication de ce virus. De même, bien que différentes souches de hMPV appartenant aux quatre sous-groupes présentent un polymorphisme dans la séquence de la protéine de F, le peptide HRA2 s'est révélé hautement actif contre toutes les souches testées *in vitro*. La supériorité de ce peptide dérivé de la région HRA par rapport aux peptides issus de la région HRB pourrait s'expliquer par une capacité accrue du peptide HRA2 à former une structure hélicoïdale, entre autres. Une analyse plus poussée de la structure secondaire du peptide HRA2 par l'étude du dichroïsme circulaire pourrait s'avérer fort utile pour comprendre de façon plus approfondie l'activité antivirale de ce peptide. La spectrophotométrie de dichroïsme circulaire permettrait de déterminer et de quantifier les structures secondaires de ces peptides.

De même, le peptide HRA2 représente une excellente molécule prophylactique *in vivo* tel que présenté au chapitre III. Notre étude *in vivo* de l'activité du peptide HRA2 s'est toutefois limitée à une seule concentration dans un modèle létal d'infection par une souche de hMPV très virulente chez la souris. Dans ces conditions expérimentales, le peptide HRA2 s'est avéré être efficace uniquement en prophylaxie puisque l'administration du peptide 24 h post-infection n'a pas

diminué la mortalité des souris traitées. Il faudrait donc tester d'autres concentrations du peptide HRA2 avant d'éliminer la possibilité d'obtenir une activité thérapeutique.

Il serait d'ailleurs avantageux de déterminer une corrélation entre l'activité inhibitrice du peptide et différentes doses testées à l'aide d'un modèle d'infection létale et non-létale. De même, des doses pourraient être administrées aux souris sur plusieurs jours en pré et/ou post-infection pour déterminer le régime optimal. L'utilisation d'une molécule de transport pourrait aussi améliorer l'efficacité du peptide HRA2 en augmentant sa biodistribution au niveau du poumon et en prolongeant sa demie-vie. Cependant, une molécule de transport pourrait également nuire à l'activité antivirale de ce peptide en enveloppant ce dernier et bloquant ainsi son accès à sa cible, c'est-à-dire les protéines de fusion présentes à la surface des cellules infectées ou à la surface des virions.

L'identification de cet inhibiteur peptidique de fusion ouvre donc la porte à de nombreuses expériences complémentaires. D'ailleurs, bien que cet inhibiteur soit efficace contre quatre souches de hMPV représentant les quatre principaux sous-groupes, il est possible que d'autres souches soient résistantes à ce peptide si la séquence de leur protéine de fusion diffère davantage des souches testées. De même, il serait souhaitable d'obtenir des virus présentant une résistance à ce peptide. Cela permettrait de mieux comprendre l'interaction entre le peptide HRA2 et la protéine de fusion du hMPV et d'identifier la région active. Un virus résistant à notre peptide inhibiteur pourrait être obtenu par passages répétés en présence de concentrations croissantes de l'inhibiteur. Il serait ainsi plausible de retrouver des mutations dans la région HRB ou encore dans la région HRA des virus résistants. Lorsque le peptide est ajouté aux cellules en présence du virus, il interagit possiblement avec la région HRB des protéines de fusion, empêchant ainsi l'accès aux HRA endogènes et, de ce fait, bloque le repliement de la protéine. La présence d'une mutation dans la région HRB pourrait rendre l'alliance entre le peptide HRA2 et les HRB instable et favoriser du même coup l'interaction naturelle entre les HRB et les HRA endogènes. L'apparition d'une mutation dans le domaine HRA de la protéine pourrait aussi donner lieu à une interaction plus forte entre les domaines endogènes de la protéine qu'entre le peptide HRA2 et les domaines HRB.

Toutefois, un virus présentant une résistance au peptide HRA2 et dont la séquence contient une mutation dans la séquence d'un de ces deux domaines devrait être étudié plus en profondeur. Plusieurs mutations pourraient être responsables du phénotype de résistance et certaines mutations pourraient être associées à du polymorphisme ou agir comme mutation compensatrice, et ce, même à l'intérieur d'une autre protéine potentiellement impliquée dans les étapes d'entrée du virus dans la cellule cible.

De même, la seule présence d'un changement d'acide aminé dans un des domaines HRA ou HRB ne signifie pas assurément qu'elle est la cause de la résistance. Les séquences HRB des différents sous-groupes de hMPV présentent d'ailleurs un certain niveau de divergence. Le rôle d'une telle mutation devra être confirmé à l'aide de virus recombinant généré par un système de génétique inverse par exemple [25, 115]. L'avantage d'un tel système est la constance du contexte génétique à l'étude, c'est-à-dire que la séquence complète d'un virus est connue et contrôlée. La génétique inverse permet de manipuler une séquence avec précision et de produire un virus présentant seulement les caractéristiques recherchées. Par exemple, si une mutation est identifiée dans la région HRB d'un virus résistant, cette mutation peut être introduite dans un virus dont le reste de la séquence demeure inchangé. Le virus sauvage et le nouveau virus mutant ainsi produit peuvent alors être comparés au niveau de leur résistance ou susceptibilité à l'inhibiteur de fusion, permettant ainsi de confirmer le rôle de la mutation obtenue par sélection d'un virus résistant *in vitro*. Les mutations ainsi identifiées permettent de mieux comprendre l'interaction entre le peptide inhibiteur et la protéine de fusion du hMPV. De même, différentes mutations choisies peuvent être incorporées par génétique inverse pour en étudier l'impact sur le niveau de résistance.

L'identification de virus résistants au peptide HRA2 et des mutations conférant cette résistance pourrait nous amener à produire de nouveaux peptides. De plus, un peptide contenant la même séquence que le HRA2 mais à l'intérieur d'une séquence plus longue pourrait favoriser une interaction plus forte entre ce peptide et les domaines HRB de la protéine F du fait d'une plus grande surface de contact. La séquence du peptide HRA2 pourrait aussi être modifiée selon les mutations obtenues. De même, un traitement efficace pourrait contenir un mélange de plusieurs peptides de séquences différentes.

Puisque nous avons démontré une activité du peptide HRA2 contre la souche A2 du hRSV, il serait possible d'optimiser la séquence de ce peptide pour obtenir une efficacité satisfaisante contre hMPV et hRSV avec un seul peptide. Un cocktail constitué de plusieurs peptides ciblant d'importants virus respiratoires comme hMPV et hRSV mais également PIV, l'influenza et certains coronavirus par exemple serait également fort intéressant puisqu'il est presque impossible de distinguer l'agent infectieux uniquement à partir des symptômes cliniques. Un peptide tel que le HRA2 pourrait s'avérer fort utile dans plusieurs situations. Lors d'une épidémie de hMPV, ce peptide pourrait être administré aux personnes les plus à risque telles que les personnes âgées, les très jeunes enfants et les personnes dont le système immunitaire est affaibli. De même, lorsque des membres d'une même famille sont exposés à un sujet infectieux, un traitement prophylactique pourrait leur être administré. Ce peptide pourrait également s'avérer une arme importante pour contrer le développement d'asthme qui survient possiblement suite à une infection respiratoire virale sérieuse en bas âge puisque ce peptide pourrait permettre de diminuer la sévérité de la maladie. L'administration de ce peptide pourrait également diminuer le taux d'infections bactériennes secondaires à une infection sévère par le hMPV mais aussi diminuer les cas d'exacerbation d'asthme et de MPOC. Bref, ce peptide pourrait permettre de contrôler les effets d'une infection grave par le hMPV et les conséquences néfastes qui lui sont associées.

Lors de mes études de doctorat, je me suis beaucoup intéressée à la protéine de fusion du hMPV qui est, selon moi, une protéine fascinante. Elle présente de nombreuses caractéristiques qui peuvent être approfondies à l'aide du système de génétique inverse entre autres. La protéine F est probablement en partie responsable de la différence d'infectivité entre plusieurs souches de hMPV. Cette protéine est assurément impliquée dans la formation de syncytia tel qu'observé en culture cellulaire. La protéine elle-même, mais également les séquences intergéniques situées de part et d'autre de ce gène, pourraient influencer la formation de syncytium. La séquence de cette protéine devrait donc être étudiée plus en détail et l'analyse de la structure 3D des protéines sauvages et mutantes pourraient fournir beaucoup d'informations essentielles au développement d'inhibiteurs de fusion toujours plus efficaces.

Bref, l'optimisation d'un inhibiteur de fusion en tant que modalité thérapeutique demeure un projet stimulant et prometteur.

2. L'étape de transcription et réplication du virus peut être inhibée *in vitro* par le mécanisme d'interférence à l'ARN.

Lorsque le virus parvient à pénétrer dans la cellule cible, il initie les étapes de transcription et de réplication de son génome. Ces étapes représentent des cibles thérapeutiques fort intéressantes puisqu'il est désormais possible de tirer avantage d'un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle récemment identifié : l'interférence à l'ARN.

Nous avons démontré au chapitre IV que l'interférence à l'ARN permet d'inhiber très efficacement l'infection *in vitro* de cellules par le hMPV par l'intermédiaire de petits ARNs interférants (siRNA). Des siRNAs ciblant la majeure partie du génome viral ont donc été examinés et des molécules très actives ont été sélectionnées notamment dans les gènes N, P et L. Il semblerait donc que les cibles virales idéales soient des protéines essentielles au complexe réplicatif du hMPV. Les deux siRNAs les plus inhibiteurs pour la réplication du hMPV sont d'ailleurs dirigés contre les protéines N (siRNA45) et P (siRNA60). En bloquant la production de nucléoprotéines et de phosphoprotéines, le complexe de la polymérase devient non fonctionnel et ne peut plus entreprendre la réplication du génome viral. L'absence de ces protéines virales rend également impossible la formation de nouveaux virions, limitant d'autant plus la propagation du hMPV aux cellules non-infectées.

Tel que présenté dans l'introduction, les souches de hMPV peuvent être réparties en un minimum de quatre sous-groupes. Nous avons donc évalué l'activité de deux candidats siRNAs envers quatre souches de hMPV représentant les sous-groupes A1, A2, B1 et B2 et confirmé par le fait même leur forte capacité inhibitrice (de l'ordre du nanomolaire). Les régions ciblées par les siRNA45 et siRNA60 présentent une certaine variabilité inter-souches sans que le potentiel inhibiteur des siRNAs n'en soit diminué. Cela démontre une certaine tolérance quant à la présence de non-appariements entre la séquence d'un siRNA et celle de l'ARNm correspondant. Nos essais ont démontré qu'un ou deux changements de nucléotides peuvent ainsi être tolérés. Une étude a proposé que la présence de paires U/G et C/U seraient moins dommageables pour

l'activité d'un siRNA comparativement aux paires A/G et C/A [113] alors qu'une autre équipe a démontré l'effet délétère de la présence d'une paire G/U dans un miRNA [73]. De notre côté, la présence de paires C/A et C/U n'a pas induit de perte d'activité alors que la présence d'une paire G/U a complètement aboli l'activité du siRNA. De même, notre étude démontre que des mutations pouvaient être tolérées en 3' mais aussi en 5' du brin guide à l'exception de la paire G/U en 5'. L'extrémité 5' du brin guide (antisens) est primordiale pour la reconnaissance de l'ARNm cible, majoritairement entre les positions 2 et 8 qui correspondent à une région appelée « seed region » (figure 31). Peu de non-appariements sont normalement tolérés dans cette région. L'extrémité 3' est beaucoup moins stricte au niveau de l'appariement des bases et accepte plus facilement des mutations. Le clivage de l'ARNm cible entraîné par un siRNA présentant des non-appariements semblent donc dépendre de la nature et de la position de ce non-appariement. De plus, la stabilité générale de l'appariement ARNm-siRNA ou des régions entourant le non-appariement, ainsi que la présence de liens G-C autour du non-appariement pourraient expliquer pourquoi certains non-appariements sont mieux tolérés que d'autres. Selon nos résultats, un siRNA peut être actif contre plusieurs souches de hMPV si la séquence cible ne varie que légèrement. L'idéal demeure tout de même l'emploi d'un cocktail constitué d'un minimum de deux siRNAs ciblant des protéines différentes comme c'est le cas pour le siRNA45 (nucléoprotéine) et le siRNA60 (phosphoprotéine). Un cocktail constitué de ces deux siRNAs s'est d'ailleurs révélé très efficace contre le hMPV avec une IC_{50} de 0.039 nM *in vitro*.

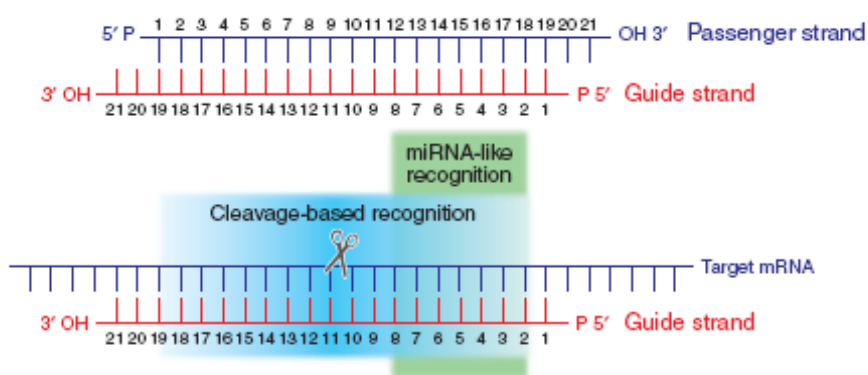


Figure 31. Illustration des points de contact importants entre le brin guide et l'ARNm cible [192]. La région « seed » correspond aux positions 2 à 8 nommé « miRNA-like recognition ». Le clivage de l'ARNm cible se fait entre les bases 10 et 11. La reconnaissance de l'ARNm cible par le siRNA se fait au niveau des bases 2 à 19 (« Cleavage-based recognition »).

De nouvelles études proposent également différentes améliorations pouvant être apportées aux siRNAs : l'utilisation de substrats de Dicer (DsiRNA) et des modifications chimiques des séquences entre autres [137, 204]. Les siRNAs synthétiques utilisés *in vitro* et *in vivo* sont couramment constitués de 21 nucléotides puisque cette longueur correspond aux fragments actifs associés au RISC. À l'origine, cette propriété était considérée comme un avantage, permettant d'éviter une étape du processus et d'obtenir une molécule intégrée directement dans le complexe effecteur [8]. Maintenant, il semble encore plus avantageux de tirer profit de l'implication de Dicer dans le complexe effecteur RISC [8, 189]. Des études suggèrent que l'extrémité protubérante à l'opposé de la boucle dans un miRNA est liée par Dicer et dirige le clivage du miRNA et le choix du brin incorporé au RISC. Cette caractéristique peut être imitée en créant une extrémité franche à l'emplacement naturel de la boucle et en introduisant deux bases d'ADN dans le brin sens (passager) du côté franc du duplex. L'ajout de nucléotides protubérants en 3' à une extrémité et de bases d'ADN à l'extrémité franche du duplex introduit une asymétrie qui oriente l'activité de Dicer et permet une utilisation optimale du brin conférant l'activité antivirale [8]. Les DsiRNAs évalués comme molécule anti-hMPV décrits au chapitre IV possèdent ces caractéristiques et se sont révélés équivalents ou légèrement plus efficaces que les siRNAs correspondant de 21 bases.

Nous avons donc décidé de poursuivre le développement de ces molécules antivirales à l'aide d'un modèle animal d'infection par le hMPV.

3. Une optimisation des siRNAs s'avère essentielle à la poursuite de l'étude *in vivo* de l'inhibition de la réplication du hMPV.

Notre connaissance du mécanisme de l'interférence à l'ARN est encore limitée et les études sur l'évaluation *in vivo* de siRNA en tant que molécule antivirale commencent seulement à s'accumuler [64, 105, 180]. Les modifications chimiques de certaines bases du siRNA ainsi que l'utilisation d'une molécule de transport semble favoriser l'obtention de candidats prometteurs pour une étude *in vivo*.

Les DsiRNAs identifiés au cours de notre étude *in vitro* ont donc été modifiés chimiquement par l'ajout de groupements 2'-O-méthyl sur le pentose et par la formation de liens phosphorothioates

au niveau du squelette de phosphate. Ces modifications sont rapportées comme pouvant améliorer la résistance des siRNAs face aux nucléases, abolir l'induction d'IFN et réduire les effets non-spécifiques indésirables. Notre étude révèle toutefois que de nombreuses modifications chimiques au sein d'un siRNA corrélaient avec une diminution de son efficacité, et ce, contre les deux souches de hMPV évaluées. La perte d'activité d'un siRNA ayant été chimiquement modifié pourrait être due à l'incapacité du RISC à reconnaître le siRNA ou à s'y lier et donc être activé.

Avant de débiter une expérience *in vivo*, l'induction d'IFN par nos siRNAs candidats était également un facteur à considérer. L'induction de la réponse IFN par des fragments d'ARN double brin de >30 bases peut provoquer un arrêt global de la synthèse des protéines ainsi qu'une dégradation non-spécifique des ARNm [221]. Bien que nos candidats DsiRNAs soient constitués d'un brin passager de 25 bases et d'un brin guide de 27 bases, nous avons évalué leur capacité à activer la voie de l'IFN *in vitro*. Un de nos candidats (DsiRNA45) s'est révélé être un inducteur potentiel de la réponse IFN dans des PBMC humains et l'étude de ce siRNA ne s'est pas poursuivie davantage. *In vivo*, certains DsiRNAs non-modifiés ont induit l'expression d'IFN et d'autres cytokines au niveau des poumons, majoritairement IL-6, le TNF α , l'IL12 p40 et l'IFN γ . De même, la formulation liposomale MF1312 a semblé induire certaines cytokines. Toutefois, la modification chimiques des bases d'ARN et des liens entre ces bases permet d'abolir cette induction.

L'utilisation de siRNAs contrôles permet d'évaluer dans une certaine limite la spécificité de l'activité des siRNAs c'est-à-dire une activité antivirale spécifique aux séquences choisies. Par contre, ce type de contrôle ne permet pas d'écarter totalement une stimulation immunitaire ou la survenue d'effets hors-cible (« off-target ») malgré l'utilisation de siRNAs ayant été modifiés chimiquement. Une étude par microarray des gènes affectés par la présence de ces siRNAs pourrait donc être envisagée [125, 224].

Le modèle d'infection de souris BALB/c par le hMPV est un outil supplémentaire et essentiel pour poursuivre l'évaluation de l'activité des siRNAs identifiés jusqu'à maintenant. Les caractéristiques associées à l'infection du hMPV chez la souris sont bien décrites [111, 112]. Tel que présenté au chapitre V, ce modèle nous a permis de confirmer l'activité antivirale de certains

DsiRNAs lors d'une infection par le hMPV. Dans un premier temps, différents DsiRNAs ont été évalués en prophylaxie (jour 2, 1 et 0 pré-infection) à différentes concentrations (1, 2 ou 10 mg/kg) avec ou sans formulation. Ces données préliminaires suggéraient une absence d'activité antivirale dans les conditions expérimentales évaluées. Toutefois, la faible perte de poids du groupe de souris contrôle positif d'infection (5% par rapport à ~15% attendu) ne permettait pas de conclure hors de tout doute que nos DsiRNAs étaient efficaces ou inefficaces. Cependant, lors de cet essai, aucune toxicité, telle qu'évaluée par une perte de poids chez une souris traitée mais non-infectée, n'avait été notée pour nos DsiRNAs. Bien entendu, d'autres tests plus spécifiques devront être réalisés pour confirmer l'absence de toxicité associée à ces DsiRNAs lorsqu'administrés chez l'animal. Une deuxième expérience a donc été entreprise avec d'autres DsiRNAs évalués dans des conditions expérimentales différentes, c'est-à-dire avec une administration quotidienne de 10 mg/kg (du jour 1 pré-infection au jour 2 post-infection) et dans un contexte de réplication virale plus importante (perte maximale de poids d'environ 12%). Nous avons ainsi pu démontrer une activité antivirale du DsiRNA45-mut modifié-6174 contre le hMPV puisque ce DsiRNA a permis de réduire la perte de poids des souris à partir du jour 3 post-infection, de diminuer les titres viraux et le nombre de copies d'ARN viral dans les poumons au jour 5 post-infection. De plus, le DsiRNA60 non-modifié a permis de réduire le nombre de copies d'ARN viral dans les poumons au jour 5 post-infection sans toutefois prévenir la perte de poids des souris. L'administration de ces DsiRNAs a été réalisée à la fois en prophylaxie et en traitement c'est-à-dire que les souris étaient traitées avec ces DsiRNAs au jour 1 pré-infection ainsi que 4 h avant l'infection par le hMPV mais également aux jours 1 et 2 post-infection. Ce type de traitement a d'abord été choisi pour démontrer une activité antivirale des DsiRNAs, c'est-à-dire établir une preuve de concept. Des expériences subséquentes permettront de mieux définir le régime idéal pour obtenir une inhibition optimale. Différents temps d'administration (prophylaxie, traitement précoce, traitement tardif) et une plus large sélection de concentrations pourront alors être évalués. De même, l'analyse d'une gamme de formulations différentes (PBS, liposome, nanoparticule, protéine de transport) sera importante pour déterminer le type de complexe le plus efficace *in vivo* contre le hMPV. Lors de notre étude *in vivo*, une seule voie d'administration a été évaluée (intranasale) mais d'autres options sont également envisageables telles que l'utilisation d'un nébulisateur ou d'un aérosol-doseur (pompe).

Une limite de l'interférence à l'ARN concerne l'activité transitoire des siRNAs au site d'administration. Toutefois, cette caractéristique, bien que désavantageuse pour les infections chroniques, ne constitue pas nécessairement un problème majeur pour les infections aiguës comme celles causées par le hMPV [76]. Les autres désavantages associés à l'interférence à l'ARN correspondent à l'induction potentielle d'IFN, la saturation de la machinerie cellulaire impliquée dans ce mécanisme de régulation, l'activité inhibitrice non-spécifique et la toxicité parfois reliée aux modifications chimiques, entre autres. Ce sont donc des facteurs qui devront être pris en compte lors des expériences *in vivo* subséquentes avec les DsiRNAs que nous avons identifiés.

Chapitre VII. Conclusions et perspectives

Bien que le hMPV ait été identifié en 2001, nos connaissances sur ce virus ont beaucoup évolué depuis huit ans. L'épidémiologie et les différentes manifestations cliniques associées aux infections par le hMPV sont de plus en plus connues. Le développement de systèmes de génétique inverse a fourni un outil supplémentaire pour comprendre la réplication de ce virus et ainsi mettre aux point des vaccins potentiels. Des modèles animaux fiables ont permis de mieux comprendre la pathogénèse du hMPV mais aussi d'évaluer différents candidats vaccinaux et molécules thérapeutiques et prophylactiques.

Mon projet de doctorat se situait dans la poursuite de ce dernier point c'est-à-dire d'identifier différentes modalités thérapeutiques *in vitro* et *in vivo* pour lutter contre les infections sévères causées par le hMPV.

Dans un premier temps, nous avons réussi à démontrer que l'étape de fusion du hMPV à la cellule cible pouvait être efficacement bloquée *in vitro* par un peptide inhibiteur de fusion mimant la région HRA. De même, l'analyse de ce peptide dans un modèle animal a permis de confirmer son potentiel antiviral lorsque administré en prophylaxie. Ces expériences représentent un premier grand pas vers le développement de cet inhibiteur de fusion et davantage d'études *in vivo* devront encore être réalisées. L'évaluation de plusieurs concentrations de peptide, de différents temps et modes d'administration et l'utilisation d'un transporteur permettront

d'identifier le régime optimal. Donc, avec un peu plus d'optimisation, il est possible que ce peptide devienne également une modalité thérapeutique fort intéressante.

Dans un deuxième temps, nous avons réussi à identifier deux siRNAs hautement efficaces pour inhiber la réplication de différentes souches de hMPV *in vitro*. Nous avons également démontré que des substrats de Dicer (DsiRNAs) peuvent être aussi efficaces et même potentiellement supérieurs aux siRNAs de 19-21 bases et qu'une certaine portion d'un siRNA peut être modifiée chimiquement tout en conservant son pouvoir inhibiteur. De plus, notre étude d'inhibition de l'infection chez la souris BALB/c nous a permis d'identifier au moins un candidat DsiRNA ayant une activité antivirale *in vivo*. De nombreuses analyses doivent maintenant être réalisées pour déterminer les conditions idéales pour un traitement optimal.

Nos nombreux efforts et nos partenariats avec l'industrie pharmaceutique se poursuivent et nous permettent d'espérer voir, un jour, une de ces molécules faire partie de l'arsenal thérapeutique contre le hMPV.

Bibliographie

1. **Abed Y., and Boivin G.** 2008. Human metapneumovirus infection in immunocompromised child. *Emerg Infect Dis* **14**:854-856.
2. **Abiko C., Mizuta K., Itagaki T., Katsushima N., Ito S., Matsuzaki Y., Okamoto M., Nishimura H., Aoki Y., Murata T., Hoshina H., Hongo S., and Ootani K.** 2007. Outbreak of human metapneumovirus detected by use of the Vero E6 cell line in isolates collected in Yamagata, Japan, in 2004 and 2005. *J Clin Microbiol* **45**:1912-1919.
3. **Agapov E., Sumino K. C., Gaudreault-Keener M., Storch G. A., and Holtzman M. J.** 2006. Genetic variability of human metapneumovirus infection: evidence of a shift in viral genotype without a change in illness. *J Infect Dis* **193**:396-403.
4. **Aguilar J. C., and Rodriguez E. G.** 2007. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine* **25**:3752-3762.
5. **Alnylam.** 2008. www.alnylam.com. [Online.]
6. **Alvarez R., Harrod K. S., Shieh W. J., Zaki S., and Tripp R. A.** 2004. Human metapneumovirus persists in BALB/c mice despite the presence of neutralizing antibodies. *J Virol* **78**:14003-14011.
7. **Amarzguioui M., Holen T., Babaie E., and Prydz H.** 2003. Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res* **31**:589-595.
8. **Amarzguioui M., Lundberg P., Cantin E., Hagstrom J., Behlke M. A., and Rossi J. J.** 2006. Rational design and in vitro and in vivo delivery of Dicer substrate siRNA. *Nat Protoc* **1**:508-517.
9. **Aslanzadeh J., Zheng X., Li H., Tetreault J., Ratkiewicz I., Meng S., Hamilton P., and Tang Y. W.** 2008. Prospective evaluation of rapid antigen tests for diagnosis of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus infections. *J Clin Microbiol* **46**:1682-1685.
10. **Bacq-Calberg C. M., Coyette J., Hoet P., and Nguyen-Distèche M.** 1995. *Microbiologie Prescott, Harrley, Klein. De Boeck Université, Bruxelles.*
11. **Baggiolini M.** 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* **392**:565-568.
12. **Bao X., Kolli D., Liu T., Shan Y., Garofalo R. P., and Casola A.** 2008. Human metapneumovirus small hydrophobic protein inhibits NF-kappaB transcriptional activity. *J Virol* **82**:8224-8229.
13. **Bao X., Liu T., Shan Y., Li K., Garofalo R. P., and Casola A.** 2008. Human metapneumovirus glycoprotein G inhibits innate immune responses. *PLoS Pathog* **4**:e1000077.
14. **Bao X., Liu T., Spetch L., Kolli D., Garofalo R. P., and Casola A.** 2007. Airway epithelial cell response to human metapneumovirus infection. *Virology* **368**:91-101.
15. **Bao X., Sinha M., Liu T., Hong C., Luxon B. A., Garofalo R. P., and Casola A.** 2008. Identification of human metapneumovirus-induced gene networks in airway epithelial cells by microarray analysis. *Virology* **374**:114-127.
16. **Barik S.** 2004. Control of nonsegmented negative-strand RNA virus replication by siRNA. *Virus Res* **102**:27-35.
17. **Barik S.** 2006. RNAi in moderation. *Nat Biotechnol* **24**:796-797.
18. **Bastien N., Liu L., Ward D., Taylor T., and Li Y.** 2004. Genetic variability of the G glycoprotein gene of human metapneumovirus. *J Clin Microbiol* **42**:3532-3537.

19. **Bastien N., Normand S., Taylor T., Ward D., Peret T. C., Boivin G., Anderson L. J., and Li Y.** 2003. Sequence analysis of the N, P, M and F genes of Canadian human metapneumovirus strains. *Virus Res* **93**:51-62.
20. **Behlke M. A.** 2006. Progress towards in vivo use of siRNAs. *Mol Ther* **13**:644-670.
21. **Biacchesi S., Murphy B. R., Collins P. L., and Buchholz U. J.** 2007. Frequent frameshift and point mutations in the SH gene of human metapneumovirus passaged in vitro. *J Virol* **81**:6057-6067.
22. **Biacchesi S., Pham Q. N., Skiadopoulou M. H., Murphy B. R., Collins P. L., and Buchholz U. J.** 2005. Infection of nonhuman primates with recombinant human metapneumovirus lacking the SH, G, or M2-2 protein categorizes each as a nonessential accessory protein and identifies vaccine candidates. *J Virol* **79**:12608-12613.
23. **Biacchesi S., Pham Q. N., Skiadopoulou M. H., Murphy B. R., Collins P. L., and Buchholz U. J.** 2006. Modification of the trypsin-dependent cleavage activation site of the human metapneumovirus fusion protein to be trypsin independent does not increase replication or spread in rodents or nonhuman primates. *J Virol* **80**:5798-5806.
24. **Biacchesi S., Skiadopoulou M. H., Boivin G., Hanson C. T., Murphy B. R., Collins P. L., and Buchholz U. J.** 2003. Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups. *Virology* **315**:1-9.
25. **Biacchesi S., Skiadopoulou M. H., Tran K. C., Murphy B. R., Collins P. L., and Buchholz U. J.** 2004. Recovery of human metapneumovirus from cDNA: optimization of growth in vitro and expression of additional genes. *Virology* **321**:247-259.
26. **Biacchesi S., Skiadopoulou M. H., Yang L., Lamirande E. W., Tran K. C., Murphy B. R., Collins P. L., and Buchholz U. J.** 2004. Recombinant human Metapneumovirus lacking the small hydrophobic SH and/or attachment G glycoprotein: deletion of G yields a promising vaccine candidate. *J Virol* **78**:12877-12887.
27. **Bitko V., Musiyenko A., Shulyayeva O., and Barik S.** 2005. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med* **11**:50-55.
28. **Boivin G., Abed Y., Pelletier G., Ruel L., Moisan D., Cote S., Peret T. C., Erdman D. D., and Anderson L. J.** 2002. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis* **186**:1330-1334.
29. **Boivin G., De Serres G., Cote S., Gilca R., Abed Y., Rochette L., Bergeron M. G., and Dery P.** 2003. Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerg Infect Dis* **9**:634-640.
30. **Boivin G., De Serres G., Hamelin M. E., Cote S., Argouin M., Tremblay G., Maranda-Aubut R., Sauvageau C., Ouakki M., Boulianne N., and Couture C.** 2007. An outbreak of severe respiratory tract infection due to human metapneumovirus in a long-term care facility. *Clin Infect Dis* **44**:1152-1158.
31. **Boivin G., Mackay I., Sloots T. P., Madhi S., Freymuth F., Wolf D., Shemer-Avni Y., Ludewick H., Gray G. C., and LeBlanc E.** 2004. Global genetic diversity of human metapneumovirus fusion gene. *Emerg Infect Dis* **10**:1154-1157.
32. **Bonroy C., Vankeerberghen A., Boel A., and De Beenhouwer H.** 2007. Use of a multiplex real-time PCR to study the incidence of human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus infections during two winter seasons in a Belgian paediatric hospital. *Clin Microbiol Infect* **13**:504-509.

33. **Bosis S., Esposito S., Niesters H. G., Crovari P., Osterhaus A. D., and Principi N.** 2005. Impact of human metapneumovirus in childhood: comparison with respiratory syncytial virus and influenza viruses. *J Med Virol* **75**:101-104.
34. **Branden C., and J. Tooze.** 1999. *Introduction to Protein Structure*, Second ed. Garland Publishing, New York.
35. **Brandtzaeg P.** 2007. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine* **25**:5467-5484.
36. **Broor S., and Bharaj P.** 2007. Avian and human metapneumovirus. *Ann N Y Acad Sci* **1102**:66-85.
37. **Broughton S., Sylvester K. P., Fox G., Zuckerman M., Smith M., Milner A. D., Rafferty G. F., and Greenough A.** 2007. Lung function in prematurely born infants after viral lower respiratory tract infections. *Pediatr Infect Dis J* **26**:1019-1024.
38. **Buchholz U. J., Biacchesi S., Pham Q. N., Tran K. C., Yang L., Luongo C. L., Skiadopoulos M. H., Murphy B. R., and Collins P. L.** 2005. Deletion of M2 gene open reading frames 1 and 2 of human metapneumovirus: effects on RNA synthesis, attenuation, and immunogenicity. *J Virol* **79**:6588-6597.
39. **Buchholz U. J., Nagashima K., Murphy B. R., and Collins P. L.** 2006. Live vaccines for human metapneumovirus designed by reverse genetics. *Expert Rev Vaccines* **5**:695-706.
40. **Cann A. J.** 1997. *Principles of Molecular Virology*, Second ed. Academic Press, San Diego.
41. **Caracciolo S., Minini C., Colombrita D., Rossi D., Miglietti N., Vettore E., Caruso A., and Fiorentini S.** 2008. Human metapneumovirus infection in young children hospitalized with acute respiratory tract disease: virologic and clinical features. *Pediatr Infect Dis J* **27**:406-412.
42. **Carr M. J., Waters A., Fenwick F., Toms G. L., Hall W. W., and O'Kelly E.** 2008. Molecular epidemiology of human metapneumovirus in Ireland. *J Med Virol* **80**:510-516.
43. **Cervia J. S., and Smith M. A.** 2003. Enfuvirtide (T-20): a novel human immunodeficiency virus type 1 fusion inhibitor. *Clin Infect Dis* **37**:1102-1106.
44. **Chan P. C., Wang C. Y., Wu P. S., Chang P. Y., Yang T. T., Chiang Y. P., Kao C. L., Chang L. Y., Lu C. Y., Lee P. I., Chen J. M., Shao P. L., Huang F. Y., Lee C. Y., and Huang L. M.** 2007. Detection of human metapneumovirus in hospitalized children with acute respiratory tract infection using real-time RT-PCR in a hospital in northern Taiwan. *J Formos Med Assoc* **106**:16-24.
45. **Chan P. K., Tam J. S., Lam C. W., Chan E., Wu A., Li C. K., Buckley T. A., Ng K. C., Joynt G. M., Cheng F. W., To K. F., Lee N., Hui D. S., Cheung J. L., Chu I., Liu E., Chung S. S., and Sung J. J.** 2003. Human metapneumovirus detection in patients with severe acute respiratory syndrome. *Emerg Infect Dis* **9**:1058-1063.
46. **Chano F., Rousseau C., Laferriere C., Couillard M., and Charest H.** 2005. Epidemiological survey of human metapneumovirus infection in a large pediatric tertiary care center. *J Clin Microbiol* **43**:5520-5525.
47. **Chin J., Magoffin R. L., Shearer L. A., Schieble J. H., and Lennette E. H.** 1969. Field evaluation of a respiratory syncytial virus vaccine and a trivalent parainfluenza virus vaccine in a pediatric population. *Am J Epidemiol* **89**:449-463.
48. **Chiu Y. L., and Rana T. M.** 2003. siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. *Rna* **9**:1034-1048.

49. **Christensen A., Nordbo S. A., Jeansson S., and Slordahl S.** 2003. Lower respiratory tract infection caused by human metapneumovirus in two children: the first report of human metapneumovirus infection in Norway. *Scand J Infect Dis* **35**:772-774.
50. **Chung J. Y., Han T. H., Kim B. E., Kim C. K., Kim S. W., and Hwang E. S.** 2006. Human metapneumovirus infection in hospitalized children with acute respiratory disease in Korea. *J Korean Med Sci* **21**:838-842.
51. **Cianci C., Genovesi E. V., Lamb L., Medina I., Yang Z., Zadajura L., Yang H., D'Arienzo C., Sin N., Yu K. L., Combrink K., Li Z., Colonno R., Meanwell N., Clark J., and Krystal M.** 2004. Oral efficacy of a respiratory syncytial virus inhibitor in rodent models of infection. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:2448-2454.
52. **Cianci C., Yu K. L., Combrink K., Sin N., Pearce B., Wang A., Civiello R., Voss S., Luo G., Kadow K., Genovesi E. V., Venables B., Gulgeze H., Trehan A., James J., Lamb L., Medina I., Roach J., Yang Z., Zadajura L., Colonno R., Clark J., Meanwell N., and Krystal M.** 2004. Orally active fusion inhibitor of respiratory syncytial virus. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:413-422.
53. **Cilla G., Onate E., Perez-Yarza E. G., Montes M., Vicente D., and Perez-Trallero E.** 2009. Hospitalization rates for human metapneumovirus infection among 0- to 3-year-olds in Gipuzkoa (Basque Country), Spain. *Epidemiol Infect* **137**:66-72.
54. **Clapham P. R., and McKnight A.** 2002. Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *J Gen Virol* **83**:1809-1829.
55. **Collingwood M. A., Rose S. D., Huang L., Hillier C., Amarzguioui M., Wiiger M. T., Soifer H. S., Rossi J. J., and Behlke M. A.** 2008. Chemical Modification Patterns Compatible with High Potency Dicer-Substrate Small Interfering RNAs. *Oligonucleotides* **18**:187-200.
56. **Corey D. R.** 2007. Chemical modification: the key to clinical application of RNA interference? *J Clin Invest* **117**:3615-3622.
57. **Cote S., Abed Y., and Boivin G.** 2003. Comparative evaluation of real-time PCR assays for detection of the human metapneumovirus. *J Clin Microbiol* **41**:3631-3635.
58. **Crowe J. E., Jr., and Williams J. V.** 2003. Immunology of viral respiratory tract infection in infancy. *Paediatr Respir Rev* **4**:112-119.
59. **Cseke G., Maginnis M. S., Cox R. G., Tollefson S. J., Podsiad A. B., Wright D. W., Dermody T. S., and Williams J. V.** 2009. Integrin alphavbeta1 promotes infection by human metapneumovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:1566-1571.
60. **Cseke G., Wright D. W., Tollefson S. J., Johnson J. E., Crowe J. E., Jr., and Williams J. V.** 2007. Human metapneumovirus fusion protein vaccines that are immunogenic and protective in cotton rats. *J Virol* **81**:698-707.
61. **Cuevas L. E., Nasser A. M., Dove W., Gurgel R. Q., Greensill J., and Hart C. A.** 2003. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brazil. *Emerg Infect Dis* **9**:1626-1628.
62. **Cullen B. R.** 2004. Derivation and function of small interfering RNAs and microRNAs. *Virus Res* **102**:3-9.
63. **Darniot M., Petrella T., Aho S., Pothier P., and Manoha C.** 2005. Immune response and alteration of pulmonary function after primary human metapneumovirus (hMPV) infection of BALB/c mice. *Vaccine* **23**:4473-4480.

64. **de Fougerolles A., Vornlocher H. P., Maraganore J., and Lieberman J.** 2007. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **6**:443-453.
65. **de Fougerolles A. R.** 2008. Delivery vehicles for small interfering RNA in vivo. *Hum Gene Ther* **19**:125-132.
66. **De Swart R. L., Kuiken T., Timmerman H. H., van Amerongen G., Van Den Hoogen B. G., Vos H. W., Neijens H. J., Andeweg A. C., and Osterhaus A. D.** 2002. Immunization of macaques with formalin-inactivated respiratory syncytial virus (RSV) induces interleukin-13-associated hypersensitivity to subsequent RSV infection. *J Virol* **76**:11561-11569.
67. **de Swart R. L., van den Hoogen B. G., Kuiken T., Herfst S., van Amerongen G., Yuksel S., Sprong L., and Osterhaus A. D.** 2007. Immunization of macaques with formalin-inactivated human metapneumovirus induces hypersensitivity to hMPV infection. *Vaccine* **25**:8518-8528.
68. **Debnath A. K.** 2006. Prospects and strategies for the discovery and development of small-molecule inhibitors of six-helix bundle formation in class 1 viral fusion proteins. *Curr Opin Investig Drugs* **7**:118-127.
69. **Deffrasnes C., Cote S., and Boivin G.** 2005. Analysis of replication kinetics of the human metapneumovirus in different cell lines by real-time PCR. *J Clin Microbiol* **43**:488-490.
70. **Deffrasnes C., Hamelin M. E., and Boivin G.** 2007. Human metapneumovirus. *Semin Respir Crit Care Med* **28**:213-221.
71. **Deffrasnes C., Hamelin M. E., Prince G. A., and Boivin G.** 2008. Identification and evaluation of a highly effective fusion inhibitor for human metapneumovirus. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:279-287.
72. **DeVincenzo J., Cehelsky J. E., Alvarez R., Elbashir S., Harborth J., Toudjarska I., Nechev L., Murugaiah V., Van Vliet A., Vaishnav A. K., and Meyers R.** 2008. Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV). *Antiviral Res* **77**:225-231.
73. **Doench J. G., and Sharp P. A.** 2004. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* **18**:504-511.
74. **Dorsett Y., and Tuschl T.** 2004. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **3**:318-329.
75. **Douglas J. L., Panis M. L., Ho E., Lin K. Y., Krawczyk S. H., Grant D. M., Cai R., Swaminathan S., Chen X., and Cihlar T.** 2005. Small molecules VP-14637 and JNJ-2408068 inhibit respiratory syncytial virus fusion by similar mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:2460-2466.
76. **Dykxhoorn D. M., Novina C. D., and Sharp P. A.** 2003. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:457-467.
77. **Easton A. J., Domachowske J. B., and Rosenberg H. F.** 2004. Animal pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **17**:390-412.
78. **Ebihara T., Endo R., Ishiguro N., Nakayama T., Sawada H., and Kikuta H.** 2004. Early reinfection with human metapneumovirus in an infant. *J Clin Microbiol* **42**:5944-5946.

79. **Ebihara T., Endo R., Kikuta H., Ishiguro N., Ishiko H., Hara M., Takahashi Y., and Kobayashi K.** 2004. Human metapneumovirus infection in Japanese children. *J Clin Microbiol* **42**:126-132.
80. **Ebihara T., Endo R., Kikuta H., Ishiguro N., Yoshioka M., Ma X., and Kobayashi K.** 2003. Seroprevalence of human metapneumovirus in Japan. *J Med Virol* **70**:281-283.
81. **Endo R., Ebihara T., Ishiguro N., Teramoto S., Ariga T., Sakata C., Hayashi A., Ishiko H., and Kikuta H.** 2008. Detection of four genetic subgroup-specific antibodies to human metapneumovirus attachment (G) protein in human serum. *J Gen Virol* **89**:1970-1977.
82. **Englund J. A., Boeckh M., Kuypers J., Nichols W. G., Hackman R. C., Morrow R. A., Fredricks D. N., and Corey L.** 2006. Brief communication: fatal human metapneumovirus infection in stem-cell transplant recipients. *Ann Intern Med* **144**:344-349.
83. **Esper F., Boucher D., Weibel C., Martinello R. A., and Kahn J. S.** 2003. Human metapneumovirus infection in the United States: clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children. *Pediatrics* **111**:1407-1410.
84. **Esper F., Martinello R. A., Boucher D., Weibel C., Ferguson D., Landry M. L., and Kahn J. S.** 2004. A 1-year experience with human metapneumovirus in children aged <5 years. *J Infect Dis* **189**:1388-1396.
85. **Falsey A. R., Erdman D., Anderson L. J., and Walsh E. E.** 2003. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. *J Infect Dis* **187**:785-790.
86. **Falsey A. R., and Walsh E. E.** 2006. Viral pneumonia in older adults. *Clin Infect Dis* **42**:518-524.
87. **Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., and Mello C. C.** 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**:806-811.
88. **Freymouth F., Vabret A., Legrand L., Eterradossi N., Lafay-Delaire F., Brouard J., and Guillois B.** 2003. Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J* **22**:92-94.
89. **Fulginiti V. A., Eller J. J., Sieber O. F., Joyner J. W., Minamitani M., and Meiklejohn G.** 1969. Respiratory virus immunization. I. A field trial of two inactivated respiratory virus vaccines; an aqueous trivalent parainfluenza virus vaccine and an alum-precipitated respiratory syncytial virus vaccine. *Am J Epidemiol* **89**:435-448.
90. **Galiano M., Videla C., Puch S. S., Martinez A., Echavarría M., and Carballal G.** 2004. Evidence of human metapneumovirus in children in Argentina. *J Med Virol* **72**:299-303.
91. **García-García M. L., Calvo C., Casas I., Bracamonte T., Rellan A., Gozalo F., Tenorio T., and Perez-Brena P.** 2007. Human metapneumovirus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma at age 5. *Pediatr Pulmonol* **42**:458-464.
92. **Ge Q., Filip L., Bai A., Nguyen T., Eisen H. N., and Chen J.** 2004. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:8676-8681.
93. **Gerna G., Sarasini A., Percivalle E., Campanini G., Rovida F., Marchi A., and Baldanti F.** 2007. Prospective study of human metapneumovirus infection: diagnosis, typing and virus quantification in nasopharyngeal secretions from pediatric patients. *J Clin Virol* **40**:236-240.

94. **Gerna G., Sarasini A., Percivalle E., Genini E., Campanini G., and Grazia Revello M.** 2006. Simultaneous detection and typing of human metapneumovirus strains in nasopharyngeal secretions and cell cultures by monoclonal antibodies. *J Clin Virol* **35**:113-116.
95. **Gillim-Ross L., and Subbarao K.** 2006. Emerging respiratory viruses: challenges and vaccine strategies. *Clin Microbiol Rev* **19**:614-636.
96. **Glaser C. A., Honarmand S., Anderson L. J., Schnurr D. P., Forghani B., Cossen C. K., Schuster F. L., Christie L. J., and Tureen J. H.** 2006. Beyond viruses: clinical profiles and etiologies associated with encephalitis. *Clin Infect Dis* **43**:1565-1577.
97. **Goldsby R. A., Kindt T. J., and Osborne B. A.** 2001. *Kuby Immunology*, Fourth Edition ed. W. H. Freeman and Company, New York.
98. **Graci J. D., and Cameron C. E.** 2006. Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Rev Med Virol* **16**:37-48.
99. **Grassmann R., and Jeang K. T.** 2008. The roles of microRNAs in mammalian virus infection. *Biochim Biophys Acta* **1779**:706-711.
100. **Gray G. C., Capuano A. W., Setterquist S. F., Erdman D. D., Nobbs N. D., Abed Y., Doern G. V., Starks S. E., and Boivin G.** 2006. Multi-year study of human metapneumovirus infection at a large US Midwestern Medical Referral Center. *J Clin Virol* **37**:269-276.
101. **Gray G. C., Capuano A. W., Setterquist S. F., Sanchez J. L., Neville J. S., Olson J., Lebeck M. G., McCarthy T., Abed Y., and Boivin G.** 2006. Human metapneumovirus, Peru. *Emerg Infect Dis* **12**:347-350.
102. **Groothuis J. R., and Nishida H.** 2002. Prevention of respiratory syncytial virus infections in high-risk infants by monoclonal antibody (palivizumab). *Pediatr Int* **44**:235-241.
103. **Guerrero-Plata A., Casola A., and Garofalo R. P.** 2005. Human metapneumovirus induces a profile of lung cytokines distinct from that of respiratory syncytial virus. *J Virol* **79**:14992-14997.
104. **Guerrero-Plata A., Casola A., Suarez G., Yu X., Spetch L., Peeples M. E., and Garofalo R. P.** 2006. Differential response of dendritic cells to human metapneumovirus and respiratory syncytial virus. *Am J Respir Cell Mol Biol* **34**:320-329.
105. **Haasnoot J., and Berkhout B.** 2006. RNA interference: its use as antiviral therapy. *Handb Exp Pharmacol*:117-150.
106. **Hamelin M. E., and Boivin G.** 2005. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for human metapneumovirus serology based on a recombinant viral protein. *Clin Diagn Lab Immunol* **12**:249-253.
107. **Hamelin M. E., Cote S., Laforge J., Lampron N., Bourbeau J., Weiss K., Gilca R., DeSerres G., and Boivin G.** 2005. Human metapneumovirus infection in adults with community-acquired pneumonia and exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Infect Dis* **41**:498-502.
108. **Hamelin M. E., Couture C., Sackett M., Kiener P., Suzich J., Ulbrandt N., and Boivin G.** 2008. The prophylactic administration of a monoclonal antibody against human metapneumovirus attenuates viral disease and airways hyperresponsiveness in mice. *Antivir Ther* **13**:39-46.

109. **Hamelin M. E., Couture C., Sackett M. K., and Boivin G.** 2007. Enhanced lung disease and Th2 response following human metapneumovirus infection in mice immunized with the inactivated virus. *J Gen Virol* **88**:3391-3400.
110. **Hamelin M. E., Prince G. A., and Boivin G.** 2006. Effect of ribavirin and glucocorticoid treatment in a mouse model of human metapneumovirus infection. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:774-777.
111. **Hamelin M. E., Prince G. A., Gomez A. M., Kinkead R., and Boivin G.** 2006. Human metapneumovirus infection induces long-term pulmonary inflammation associated with airway obstruction and hyperresponsiveness in mice. *J Infect Dis* **193**:1634-1642.
112. **Hamelin M. E., Yim K., Kuhn K. H., Cragin R. P., Boukhvalova M., Blanco J. C., Prince G. A., and Boivin G.** 2005. Pathogenesis of human metapneumovirus lung infection in BALB/c mice and cotton rats. *J Virol* **79**:8894-8903.
113. **Harborth J., Elbashir S. M., Vandenburgh K., Manninga H., Scaringe S. A., Weber K., and Tuschl T.** 2003. Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **13**:83-105.
114. **Hata M., Ito M., Kiyosawa S., Kimpara Y., Tanaka S., Yamashita T., Hasegawa A., Kobayashi S., Koyama N., and Minagawa H.** 2007. A fatal case of encephalopathy possibly associated with human metapneumovirus infection. *Jpn J Infect Dis* **60**:328-329.
115. **Herfst S., de Graaf M., Schickli J. H., Tang R. S., Kaur J., Yang C. F., Spaete R. R., Haller A. A., van den Hoogen B. G., Osterhaus A. D., and Fouchier R. A.** 2004. Recovery of human metapneumovirus genetic lineages A and B from cloned cDNA. *J Virol* **78**:8264-8270.
116. **Herfst S., de Graaf M., Schrauwen E. J., Sprong L., Hussain K., van den Hoogen B. G., Osterhaus A. D., and Fouchier R. A.** 2008. Generation of temperature-sensitive human metapneumovirus strains that provide protective immunity in hamsters. *J Gen Virol* **89**:1553-1562.
117. **Herfst S., de Graaf M., Schrauwen E. J., Ulbrandt N. D., Barnes A. S., Senthil K., Osterhaus A. D., Fouchier R. A., and van den Hoogen B. G.** 2007. Immunization of Syrian golden hamsters with F subunit vaccine of human metapneumovirus induces protection against challenge with homologous or heterologous strains. *J Gen Virol* **88**:2702-2709.
118. **Herfst S., and Fouchier R. A.** 2008. Vaccination approaches to combat human metapneumovirus lower respiratory tract infections. *J Clin Virol* **41**:49-52.
119. **Herfst S., Schrauwen E. J., de Graaf M., van Amerongen G., van den Hoogen B. G., de Swart R. L., Osterhaus A. D., and Fouchier R. A.** 2008. Immunogenicity and efficacy of two candidate human metapneumovirus vaccines in cynomolgus macaques. *Vaccine* **26**:4224-4230.
120. **Huck B., Scharf G., Neumann-Haefelin D., Puppe W., Weigl J., and Falcone V.** 2006. Novel human metapneumovirus sublineage. *Emerg Infect Dis* **12**:147-150.
121. **Hviid A., Rubin S., and Muhlemann K.** 2008. Mumps. *Lancet* **371**:932-944.
122. **Ingram R. E., Fenwick F., McGuckin R., Tefari A., Taylor C., and Toms G. L.** 2006. Detection of human metapneumovirus in respiratory secretions by reverse-transcriptase polymerase chain reaction, indirect immunofluorescence, and virus isolation in human bronchial epithelial cells. *J Med Virol* **78**:1223-1231.

123. **Ishiguro N., Ebihara T., Endo R., Ma X., Kawai E., Ishiko H., and Kikuta H.** 2006. Detection of antibodies against human metapneumovirus by Western blot using recombinant nucleocapsid and matrix proteins. *J Med Virol* **78**:1091-1095.
124. **Ishiguro N., Ebihara T., Endo R., Ma X., Shiotsuki R., Ochiai S., Ishiko H., and Kikuta H.** 2005. Immunofluorescence assay for detection of human metapneumovirus-specific antibodies by use of baculovirus-expressed fusion protein. *Clin Diagn Lab Immunol* **12**:202-205.
125. **Jackson A. L., Bartz S. R., Schelter J., Kobayashi S. V., Burchard J., Mao M., Li B., Cavet G., and Linsley P. S.** 2003. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* **21**:635-637.
126. **Janeway C., Travers P., Walport M., and Shlomchik M.** 2001. *Immunobiology*, Fifth ed. Garland Science.
127. **Jartti T., van den Hoogen B., Garofalo R. P., Osterhaus A. D., and Ruuskanen O.** 2002. Metapneumovirus and acute wheezing in children. *Lancet* **360**:1393-1394.
128. **Johnston S. L.** 2007. Innate immunity in the pathogenesis of virus-induced asthma exacerbations. *Proc Am Thorac Soc* **4**:267-270.
129. **Jun K. R., Woo Y. D., Sung H., and Kim M. N.** 2008. Detection of human metapneumovirus by direct antigen test and shell vial cultures using immunofluorescent antibody staining. *J Virol Methods* **152**:109-111.
130. **Kahn J. S.** 2006. Epidemiology of human metapneumovirus. *Clin Microbiol Rev* **19**:546-557.
131. **Kaida A., Iritani N., Kubo H., Shiomi M., Kohdera U., and Murakami T.** 2006. Seasonal distribution and phylogenetic analysis of human metapneumovirus among children in Osaka City, Japan. *J Clin Virol* **35**:394-399.
132. **Kamble R. T., Bollard C., Demmler G., Lasala P. R., and Carrum G.** 2007. Human metapneumovirus infection in a hematopoietic transplant recipient. *Bone Marrow Transplant* **40**:699-700.
133. **Kapikian A. Z., Mitchell R. H., Chanock R. M., Shvedoff R. A., and Stewart C. E.** 1969. An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. *Am J Epidemiol* **89**:405-421.
134. **Karagiannis T. C., and El-Osta A.** 2004. siRNAs: mechanism of RNA interference, in vivo and potential clinical applications. *Cancer Biol Ther* **3**:1069-1074.
135. **Kawai T., and Akira S.** 2006. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* **7**:131-137.
136. **Kikuta H., Ebihara T., Endo R., Ishiguro N., Sakata C., Ochiai S., Ishiko H., Gamo R., and Sato T.** 2007. Development of a rapid chromatographic immunoassay for detection of human metapneumovirus using monoclonal antibodies against nucleoprotein of hMPV. *Hybridoma (Larchmt)* **26**:17-21.
137. **Kim D. H., Behlke M. A., Rose S. D., Chang M. S., Choi S., and Rossi J. J.** 2005. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol* **23**:222-226.
138. **Kim H. W., Canchola J. G., Brandt C. D., Pyles G., Chanock R. M., Jensen K., and Parrott R. H.** 1969. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol* **89**:422-434.

139. **Kolli D., Bataki E. L., Spetch L., Guerrero-Plata A., Jewell A. M., Piedra P. A., Milligan G. N., Garofalo R. P., and Casola A.** 2008. T lymphocytes contribute to antiviral immunity and pathogenesis in experimental human metapneumovirus infection. *J Virol* **82**:8560-8569.
140. **Konig B., Konig W., Arnold R., Werchau H., Ihorst G., and Forster J.** 2004. Prospective study of human metapneumovirus infection in children less than 3 years of age. *J Clin Microbiol* **42**:4632-4635.
141. **Kotelkin A., Belyakov I. M., Yang L., Berzofsky J. A., Collins P. L., and Bukreyev A.** 2006. The NS2 protein of human respiratory syncytial virus suppresses the cytotoxic T-cell response as a consequence of suppressing the type I interferon response. *J Virol* **80**:5958-5967.
142. **Kovaiou R. D., Herndler-Brandstetter D., and Grubeck-Loebenstien B.** 2007. Age-related changes in immunity: implications for vaccination in the elderly. *Expert Rev Mol Med* **9**:1-17.
143. **Kubo T., Zhelev Z., Ohba H., and Bakalova R.** 2007. Modified 27-nt dsRNAs with dramatically enhanced stability in serum and long-term RNAi activity. *Oligonucleotides* **17**:445-464.
144. **Kuiken T., van den Hoogen B. G., van Riel D. A., Laman J. D., van Amerongen G., Sprong L., Fouchier R. A., and Osterhaus A. D.** 2004. Experimental human metapneumovirus infection of cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) results in virus replication in ciliated epithelial cells and pneumocytes with associated lesions throughout the respiratory tract. *Am J Pathol* **164**:1893-1900.
145. **Kukavica-Ibrulj I., and Boivin G.** 2009. Detection of human metapneumovirus antigens in nasopharyngeal aspirates using an enzyme immunoassay. *J Clin Virol* **44**:88-90.
146. **Kuypers J., Wright N., Corey L., and Morrow R.** 2005. Detection and quantification of human metapneumovirus in pediatric specimens by real-time RT-PCR. *J Clin Virol* **33**:299-305.
147. **Laham F. R., Israele V., Casellas J. M., Garcia A. M., Lac Prugent C. M., Hoffman S. J., Hauer D., Thumar B., Name M. I., Pascual A., Taratutto N., Ishida M. T., Balduzzi M., Maccarone M., Jackli S., Passarino R., Gaivironsky R. A., Karron R. A., Polack N. R., and Polack F. P.** 2004. Differential production of inflammatory cytokines in primary infection with human metapneumovirus and with other common respiratory viruses of infancy. *J Infect Dis* **189**:2047-2056.
148. **Lambert D. M., Barney S., Lambert A. L., Guthrie K., Medinas R., Davis D. E., Bucy T., Erickson J., Merutka G., and Petteway S. R., Jr.** 1996. Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:2186-2191.
149. **Landry M. L., Ferguson D., Cohen S., Peret T. C., and Erdman D. D.** 2005. Detection of human metapneumovirus in clinical samples by immunofluorescence staining of shell vial centrifugation cultures prepared from three different cell lines. *J Clin Microbiol* **43**:1950-1952.
150. **Lee N., Chan P. K., Yu I. T., Tsoi K. K., Lui G., Sung J. J., and Cockram C. S.** 2007. Co-circulation of human metapneumovirus and SARS-associated coronavirus during a major nosocomial SARS outbreak in Hong Kong. *J Clin Virol* **40**:333-337.
151. **Leung J., Esper F., Weibel C., and Kahn J. S.** 2005. Seroepidemiology of human metapneumovirus (hMPV) on the basis of a novel enzyme-linked immunosorbent assay

- utilizing hMPV fusion protein expressed in recombinant vesicular stomatitis virus. *J Clin Microbiol* **43**:1213-1219.
152. **Leysen P., Balzarini J., De Clercq E., and Neyts J.** 2005. The predominant mechanism by which ribavirin exerts its antiviral activity in vitro against flaviviruses and paramyxoviruses is mediated by inhibition of IMP dehydrogenase. *J Virol* **79**:1943-1947.
 153. **Liao S., Bao X., Liu T., Lai S., Li K., Garofalo R. P., and Casola A.** 2008. Role of retinoic acid inducible gene-I in human metapneumovirus-induced cellular signalling. *J Gen Virol* **89**:1978-1986.
 154. **Liu L., Bastien N., Sidaway F., Chan E., and Li Y.** 2007. Seroprevalence of human metapneumovirus (hMPV) in the Canadian province of Saskatchewan analyzed by a recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J Med Virol* **79**:308-313.
 155. **Liu X., Fortin K., and Mourelatos Z.** 2008. MicroRNAs: biogenesis and molecular functions. *Brain Pathol* **18**:113-121.
 156. **Ljubin-Sternak S., Santak M., Cepin-Bogovic J., Bace A., Vojnovic G., Mlinaric-Galinovic G., Forcic D., Drazenovic V., and Falsey A. R.** 2008. Detection of genetic lineages of human metapneumovirus in Croatia during the winter season 2005/2006. *J Med Virol* **80**:1282-1287.
 157. **Ljubin Sternak S., Vilibic Cavlek T., Falsey A. R., Walsh E. E., and Mlinaric Galinovic G.** 2006. Serosurvey of human metapneumovirus infection in Croatia. *Croat Med J* **47**:878-881.
 158. **Louie J. K., Schnurr D. P., Pan C. Y., Kiang D., Carter C., Tougaw S., Ventura J., Norman A., Belmusto V., Rosenberg J., and Trochet G.** 2007. A summer outbreak of human metapneumovirus infection in a long-term-care facility. *J Infect Dis* **196**:705-708.
 159. **Ludewick H. P., Abed Y., van Niekerk N., Boivin G., Klugman K. P., and Madhi S. A.** 2005. Human metapneumovirus genetic variability, South Africa. *Emerg Infect Dis* **11**:1074-1078.
 160. **Mackay I. M., Bialasiewicz S., Jacob K. C., McQueen E., Arden K. E., Nissen M. D., and Sloots T. P.** 2006. Genetic diversity of human metapneumovirus over 4 consecutive years in Australia. *J Infect Dis* **193**:1630-1633.
 161. **Mackay I. M., Bialasiewicz S., Waliuzzaman Z., Chidlow G. R., Fegredo D. C., Laingam S., Adamson P., Harnett G. B., Rawlinson W., Nissen M. D., and Sloots T. P.** 2004. Use of the P gene to genotype human metapneumovirus identifies 4 viral subtypes. *J Infect Dis* **190**:1913-1918.
 162. **MacPhail M., Schickli J. H., Tang R. S., Kaur J., Robinson C., Fouchier R. A., Osterhaus A. D., Spaete R. R., and Haller A. A.** 2004. Identification of small-animal and primate models for evaluation of vaccine candidates for human metapneumovirus (hMPV) and implications for hMPV vaccine design. *J Gen Virol* **85**:1655-1663.
 163. **Madhi S. A., Ludewick H., Abed Y., Klugman K. P., and Boivin G.** 2003. Human metapneumovirus-associated lower respiratory tract infections among hospitalized human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected and HIV-1-uninfected African infants. *Clin Infect Dis* **37**:1705-1710.
 164. **Madhi S. A., Ludewick H., Kuwanda L., van Niekerk N., Cutland C., and Klugman K. P.** 2007. Seasonality, incidence, and repeat human metapneumovirus lower respiratory tract infections in an area with a high prevalence of human immunodeficiency virus type-1 infection. *Pediatr Infect Dis J* **26**:693-699.

165. **Maertzdorf J., Wang C. K., Brown J. B., Quinto J. D., Chu M., de Graaf M., van den Hoogen B. G., Spaete R., Osterhaus A. D., and Fouchier R. A.** 2004. Real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of human metapneumoviruses from all known genetic lineages. *J Clin Microbiol* **42**:981-986.
166. **Maggi F., Pifferi M., Vatteroni M., Fornai C., Tempestini E., Anzilotti S., Lanini L., Andreoli E., Ragazzo V., Pistello M., Specter S., and Bendinelli M.** 2003. Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in a 3-year study of nasal swabs from infants in Italy. *J Clin Microbiol* **41**:2987-2991.
167. **Manoha C., Bour J. B., Pitoiset C., Darniot M., Aho S., and Pothier P.** 2008. Rapid and sensitive detection of metapneumovirus in clinical specimens by indirect fluorescence assay using a monoclonal antibody. *J Med Virol* **80**:154-158.
168. **Manoha C., Espinosa S., Aho S. L., Huet F., and Pothier P.** 2007. Epidemiological and clinical features of hMPV, RSV and RVs infections in young children. *J Clin Virol* **38**:221-226.
169. **Markosyan R. M., Ma X., Lu M., Cohen F. S., and Melikyan G. B.** 2002. The mechanism of inhibition of HIV-1 env-mediated cell-cell fusion by recombinant cores of gp41 ectodomain. *Virology* **302**:174-184.
170. **Martin J. G., Siddiqui S., and Hassan M.** 2006. Immune responses to viral infections: Relevance for asthma. *Paediatr Respir Rev* **7 Suppl 1**:S125-127.
171. **Martinello R. A., Esper F., Weibel C., Ferguson D., Landry M. L., and Kahn J. S.** 2006. Human metapneumovirus and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *J Infect* **53**:248-254.
172. **Matthews J. M., Young T. F., Tucker S. P., and Mackay J. P.** 2000. The core of the respiratory syncytial virus fusion protein is a trimeric coiled coil. *J Virol* **74**:5911-5920.
173. **MDRNA** 10 Août 2008. RNAi Therapeutics and Delivery. 2008. <http://www.mdrnainc.com/mdrna/delivery>. [Online.]
174. **Meister G., and Tuschl T.** 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**:343-349.
175. **Melendi G. A., Laham F. R., Monsalvo A. C., Casellas J. M., Israele V., Polack N. R., Kleeberger S. R., and Polack F. P.** 2007. Cytokine profiles in the respiratory tract during primary infection with human metapneumovirus, respiratory syncytial virus, or influenza virus in infants. *Pediatrics* **120**:e410-415.
176. **Mello C. C., and Conte D., Jr.** 2004. Revealing the world of RNA interference. *Nature* **431**:338-342.
177. **Meyers R., Alvarez R., Tripp R., Hadwiger P., Pandey R., Ge P., Constien R., Elbashir S., John M., Shanmugan S., and DeVincenzo J.** 2006. Design, Screening, and Evaluation of Small Interfering RNAs (siRNAs) for Prevention and Treatment of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infection. Presented at the Pediatric Academic Societies, E-PAS2006:59:4130.3, San Francisco, CA.
178. **Miller S. A., Tollefson S., Crowe J. E., Jr., Williams J. V., and Wright D. W.** 2007. Examination of a fusogenic hexameric core from human metapneumovirus and identification of a potent synthetic peptide inhibitor from the heptad repeat 1 region. *J Virol* **81**:141-149.
179. **Mirazo S., Ruchansky D., Blanc A., and Arbiza J.** 2005. Serologic evidence of human metapneumovirus circulation in Uruguay. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **100**:715-718.

180. **Morris K. V., and Rossi J. J.** 2006. Antiviral applications of RNAi. *Handb Exp Pharmacol*:105-116.
181. **Moss W. J., and Griffin D. E.** 2006. Global measles elimination. *Nat Rev Microbiol* **4**:900-908.
182. **Muller A., Tillmann R. L., Muller A., Simon A., and Schildgen O.** 2008. Stability of human metapneumovirus and human coronavirus NL63 on medical instruments and in the patient environment. *J Hosp Infect* **69**:406-408.
183. **Mullins J. A., Erdman D. D., Weinberg G. A., Edwards K., Hall C. B., Walker F. J., Iwane M., and Anderson L. J.** 2004. Human metapneumovirus infection among children hospitalized with acute respiratory illness. *Emerg Infect Dis* **10**:700-705.
184. **Nicholson K. G., McNally T., Silverman M., Simons P., Stockton J. D., and Zambon M. C.** 2006. Rates of hospitalisation for influenza, respiratory syncytial virus and human metapneumovirus among infants and young children. *Vaccine* **24**:102-108.
185. **Nissen M. D., Siebert D. J., Mackay I. M., Sloots T. P., and Withers S. J.** 2002. Evidence of human metapneumovirus in Australian children. *Med J Aust* **176**:188.
186. **Noyola D. E., Rodriguez-Moreno G., Sanchez-Alvarado J., Martinez-Wagner R., and Ochoa-Zavala J. R.** 2004. Viral etiology of lower respiratory tract infections in hospitalized children in Mexico. *Pediatr Infect Dis J* **23**:118-123.
187. **Ogra P. L.** 2004. Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. *Paediatr Respir Rev* **5 Suppl A**:S119-126.
188. **Ottolini M. G., Porter D. D., Hemming V. G., and Prince G. A.** 2000. Enhanced pulmonary pathology in cotton rats upon challenge after immunization with inactivated parainfluenza virus 3 vaccines. *Viral Immunol* **13**:231-236.
189. **Ouellet D. L., Perron M. P., Gobeil L. A., Plante P., and Provost P.** 2006. MicroRNAs in Gene Regulation: When the Smallest Governs It All. *J Biomed Biotechnol* **2006**:69616.
190. **Parker W. B.** 2005. Metabolism and antiviral activity of ribavirin. *Virus Res* **107**:165-171.
191. **Pavlin J. A., Hickey A. C., Ulbrandt N., Chan Y. P., Endy T. P., Boukhvalova M. S., Chunsuttiwat S., Nisalak A., Libraty D. H., Green S., Rothman A. L., Ennis F. A., Jarman R., Gibbons R. V., and Broder C. C.** 2008. Human metapneumovirus reinfection among children in Thailand determined by ELISA using purified soluble fusion protein. *J Infect Dis* **198**:836-842.
192. **Pei Y., and Tuschl T.** 2006. On the art of identifying effective and specific siRNAs. *Nat Methods* **3**:670-676.
193. **Peiris J. S., Tang W. H., Chan K. H., Khong P. L., Guan Y., Lau Y. L., and Chiu S. S.** 2003. Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong. *Emerg Infect Dis* **9**:628-633.
194. **Pelletier G., Dery P., Abed Y., and Boivin G.** 2002. Respiratory tract reinfections by the new human Metapneumovirus in an immunocompromised child. *Emerg Infect Dis* **8**:976-978.
195. **Percivalle E., Sarasini A., Visai L., Revello M. G., and Gerna G.** 2005. Rapid detection of human metapneumovirus strains in nasopharyngeal aspirates and shell vial cultures by monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* **43**:3443-3446.
196. **Peret T. C., Abed Y., Anderson L. J., Erdman D. D., and Boivin G.** 2004. Sequence polymorphism of the predicted human metapneumovirus G glycoprotein. *J Gen Virol* **85**:679-686.

197. **Peret T. C., Boivin G., Li Y., Couillard M., Humphrey C., Osterhaus A. D., Erdman D. D., and Anderson L. J.** 2002. Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. *J Infect Dis* **185**:1660-1663.
198. **Perron M. P., and Provost P.** 2008. Protein interactions and complexes in human microRNA biogenesis and function. *Front Biosci* **13**:2537-2547.
199. **Pham Q. N., Biacchesi S., Skiadopoulos M. H., Murphy B. R., Collins P. L., and Buchholz U. J.** 2005. Chimeric recombinant human metapneumoviruses with the nucleoprotein or phosphoprotein open reading frame replaced by that of avian metapneumovirus exhibit improved growth in vitro and attenuation in vivo. *J Virol* **79**:15114-15122.
200. **Pichlmair A., and Reis e Sousa C.** 2007. Innate recognition of viruses. *Immunity* **27**:370-383.
201. **Poutanen S. M., Low D. E., Henry B., Finkelstein S., Rose D., Green K., Tellier R., Draker R., Adachi D., Ayers M., Chan A. K., Skowronski D. M., Salit I., Simor A. E., Slutsky A. S., Doyle P. W., Kraiden M., Petric M., Brunham R. C., and McGeer A. J.** 2003. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *N Engl J Med* **348**:1995-2005.
202. **Rana T. M.** 2007. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**:23-36.
203. **Raza K., Ismailjee S. B., Crespo M., Studer S. M., Sanghavi S., Paterson D. L., Kwak E. J., Rinaldo C. R., Jr., Pilewski J. M., McCurry K. R., and Husain S.** 2007. Successful outcome of human metapneumovirus (hMPV) pneumonia in a lung transplant recipient treated with intravenous ribavirin. *J Heart Lung Transplant* **26**:862-864.
204. **Rose S. D., Kim D. H., Amarzguioui M., Heidel J. D., Collingwood M. A., Davis M. E., Rossi J. J., and Behlke M. A.** 2005. Functional polarity is introduced by Dicer processing of short substrate RNAs. *Nucleic Acids Res* **33**:4140-4156.
205. **Safdar A.** 2008. Immune modulatory activity of ribavirin for serious human metapneumovirus disease: early i.v. therapy may improve outcomes in immunosuppressed SCT recipients. *Bone Marrow Transplant* **41**:707-708.
206. **Schickli J. H., Kaur J., Macphail M., Guzzetta J. M., Spaete R. R., and Tang R. S.** 2008. Deletion of human metapneumovirus M2-2 increases mutation frequency and attenuates growth in hamsters. *Virol J* **5**:69.
207. **Schickli J. H., Kaur J., Ulbrandt N., Spaete R. R., and Tang R. S.** 2005. An S101P substitution in the putative cleavage motif of the human metapneumovirus fusion protein is a major determinant for trypsin-independent growth in vero cells and does not alter tissue tropism in hamsters. *J Virol* **79**:10678-10689.
208. **Schildgen O., Geikowski T., Glatzel T., Simon A., Wilkesmann A., Roggendorf M., Viazov S., and Matz B.** 2004. New variant of the human metapneumovirus (HMPV) associated with an acute and severe exacerbation of asthma bronchiale. *J Clin Virol* **31**:283-288.
209. **Schildgen O., Glatzel T., Geikowski T., Scheibner B., Matz B., Bindl L., Born M., Viazov S., Wilkesmann A., Knopfle G., Roggendorf M., and Simon A.** 2005. Human metapneumovirus RNA in encephalitis patient. *Emerg Infect Dis* **11**:467-470.
210. **Schildgen O., Muller A., and Simon A.** 2007. Human metapneumovirus and encephalitis. *J Clin Virol* **38**:366.

211. **Schildgen O., Simon A., and Williams J.** 2007. Animal models for human metapneumovirus (HMPV) infections. *Vet Res* **38**:117-126.
212. **Schlender J., Zimmer G., Herrler G., and Conzelmann K. K.** 2003. Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein subunit F2, not attachment protein G, determines the specificity of RSV infection. *J Virol* **77**:4609-4616.
213. **Schowalter R. M., Smith S. E., and Dutch R. E.** 2006. Characterization of human metapneumovirus F protein-promoted membrane fusion: critical roles for proteolytic processing and low pH. *J Virol* **80**:10931-10941.
214. **Seemungal T., Harper-Owen R., Bhowmik A., Moric I., Sanderson G., Message S., Maccallum P., Meade T. W., Jeffries D. J., Johnston S. L., and Wedzicha J. A.** 2001. Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **164**:1618-1623.
215. **Skiadopoulos M. H., Biacchesi S., Buchholz U. J., Amaro-Carambot E., Surman S. R., Collins P. L., and Murphy B. R.** 2006. Individual contributions of the human metapneumovirus F, G, and SH surface glycoproteins to the induction of neutralizing antibodies and protective immunity. *Virology* **345**:492-501.
216. **Skiadopoulos M. H., Biacchesi S., Buchholz U. J., Riggs J. M., Surman S. R., Amaro-Carambot E., McAuliffe J. M., Elkins W. R., St Claire M., Collins P. L., and Murphy B. R.** 2004. The two major human metapneumovirus genetic lineages are highly related antigenically, and the fusion (F) protein is a major contributor to this antigenic relatedness. *J Virol* **78**:6927-6937.
217. **Sledz C. A., Holko M., de Veer M. J., Silverman R. H., and Williams B. R.** 2003. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* **5**:834-839.
218. **Smith P. L., Lombardi G., and Foster G. R.** 2005. Type I interferons and the innate immune response--more than just antiviral cytokines. *Mol Immunol* **42**:869-877.
219. **Snove O., Jr., and Holen T.** 2004. Many commonly used siRNAs risk off-target activity. *Biochem Biophys Res Commun* **319**:256-263.
220. **Spann K. M., Tran K. C., Chi B., Rabin R. L., and Collins P. L.** 2004. Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages [corrected]. *J Virol* **78**:4363-4369.
221. **Stark G. R., Kerr I. M., Williams B. R., Silverman R. H., and Schreiber R. D.** 1998. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* **67**:227-264.
222. **Stockton J., Stephenson I., Fleming D., and Zambon M.** 2002. Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness. *Emerg Infect Dis* **8**:897-901.
223. **Sumino K. C., Agapov E., Pierce R. A., Trulock E. P., Pfeifer J. D., Ritter J. H., Gaudreault-Keener M., Storch G. A., and Holtzman M. J.** 2005. Detection of severe human metapneumovirus infection by real-time polymerase chain reaction and histopathological assessment. *J Infect Dis* **192**:1052-1060.
224. **Svoboda P.** 2007. Off-targeting and other non-specific effects of RNAi experiments in mammalian cells. *Curr Opin Mol Ther* **9**:248-257.
225. **Tang R. S., Mahmood K., Macphail M., Guzzetta J. M., Haller A. A., Liu H., Kaur J., Lawlor H. A., Stillman E. A., Schickli J. H., Fouchier R. A., Osterhaus A. D., and Spaete R. R.** 2005. A host-range restricted parainfluenza virus type 3 (PIV3) expressing

- the human metapneumovirus (hMPV) fusion protein elicits protective immunity in African green monkeys. *Vaccine* **23**:1657-1667.
226. **Tang R. S., Schickli J. H., MacPhail M., Fernandes F., Bicha L., Spaete J., Fouchier R. A., Osterhaus A. D., Spaete R., and Haller A. A.** 2003. Effects of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus antigen insertion in two 3' proximal genome positions of bovine/human parainfluenza virus type 3 on virus replication and immunogenicity. *J Virol* **77**:10819-10828.
227. **Thanasugarn W., Samransamruajkit R., Vanapongtipagorn P., Prapphal N., Van den Hoogen B., Osterhaus A. D., and Poovorawan Y.** 2003. Human metapneumovirus infection in Thai children. *Scand J Infect Dis* **35**:754-756.
228. **Tompkins S. M., Lo C. Y., Tumpey T. M., and Epstein S. L.** 2004. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:8682-8686.
229. **Traves S. L., and Proud D.** 2007. Viral-associated exacerbations of asthma and COPD. *Curr Opin Pharmacol* **7**:252-258.
230. **Ulbrandt N. D., Ji H., Patel N. K., Riggs J. M., Brewah Y. A., Ready S., Donacki N. E., Folliot K., Barnes A. S., Senthil K., Wilson S., Chen M., Clarke L., MacPhail M., Li J., Woods R. M., Coelingh K., Reed J. L., McCarthy M. P., Pfarr D. S., Osterhaus A. D., Fouchier R. A., Kiener P. A., and Suzich J. A.** 2006. Isolation and characterization of monoclonal antibodies which neutralize human metapneumovirus in vitro and in vivo. *J Virol* **80**:7799-7806.
231. **van den Hoogen B. G., Bestebroer T. M., Osterhaus A. D., and Fouchier R. A.** 2002. Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology* **295**:119-132.
232. **van den Hoogen B. G., de Jong J. C., Groen J., Kuiken T., de Groot R., Fouchier R. A., and Osterhaus A. D.** 2001. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* **7**:719-724.
233. **van den Hoogen B. G., Herfst S., de Graaf M., Sprong L., van Lavieren R., van Amerongen G., Yuksel S., Fouchier R. A., Osterhaus A. D., and de Swart R. L.** 2007. Experimental infection of macaques with human metapneumovirus induces transient protective immunity. *J Gen Virol* **88**:1251-1259.
234. **van den Hoogen B. G., Herfst S., Sprong L., Cane P. A., Forleo-Neto E., de Swart R. L., Osterhaus A. D., and Fouchier R. A.** 2004. Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. *Emerg Infect Dis* **10**:658-666.
235. **van den Hoogen B. G., van Doornum G. J., Fockens J. C., Cornelissen J. J., Beyer W. E., de Groot R., Osterhaus A. D., and Fouchier R. A.** 2003. Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients. *J Infect Dis* **188**:1571-1577.
236. **van Drunen Littel-van den Hurk S., Mapletoft J. W., Arsic N., and Kovacs-Nolan J.** 2007. Immunopathology of RSV infection: prospects for developing vaccines without this complication. *Rev Med Virol* **17**:5-34.
237. **Vance V., and Vaucheret H.** 2001. RNA silencing in plants--defense and counterdefense. *Science* **292**:2277-2280.
238. **Vargas S. O., Kozakewich H. P., Perez-Atayde A. R., and McAdam A. J.** 2004. Pathology of human metapneumovirus infection: insights into the pathogenesis of a newly identified respiratory virus. *Pediatr Dev Pathol* **7**:478-486; discussion 421.

239. **Varkey J. B., and Varkey B.** 2008. Viral infections in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med* **14**:89-94.
240. **Vicente D., Montes M., Cilla G., and Perez-Trallero E.** 2004. Human metapneumovirus and chronic obstructive pulmonary disease. *Emerg Infect Dis* **10**:1338-1339.
241. **Vicente D., Montes M., Cilla G., Perez-Yarza E. G., and Perez-Trallero E.** 2006. Differences in clinical severity between genotype A and genotype B human metapneumovirus infection in children. *Clin Infect Dis* **42**:e111-113.
242. **von Linstow M. L., Eugen-Olsen J., Koch A., Winther T. N., Westh H., and Høgh B.** 2006. Excretion patterns of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus among young children. *Eur J Med Res* **11**:329-335.
243. **von Linstow M. L., Henrik Larsen H., Eugen-Olsen J., Koch A., Nordmann Winther T., Meyer A. M., Westh H., Lundgren B., Melbye M., and Høgh B.** 2004. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus in hospitalized danish children with acute respiratory tract infection. *Scand J Infect Dis* **36**:578-584.
244. **Wang E., Sun X., Qian Y., Zhao L., Tien P., and Gao G. F.** 2003. Both heptad repeats of human respiratory syncytial virus fusion protein are potent inhibitors of viral fusion. *Biochem Biophys Res Commun* **302**:469-475.
245. **Waris M. E., Tsou C., Erdman D. D., Zaki S. R., and Anderson L. J.** 1996. Respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice previously immunized with formalin-inactivated virus induces enhanced pulmonary inflammatory response with a predominant Th2-like cytokine pattern. *J Virol* **70**:2852-2860.
246. **Weiss W. J., Murphy T., Lynch M. E., Frye J., Buklan A., Gray B., Lenoy E., Mitelman S., O'Connell J., Quartuccio S., and Huntley C.** 2003. Inhalation efficacy of RFI-641 in an African green monkey model of RSV infection. *J Med Primatol* **32**:82-88.
247. **Wild C. T., Shugars D. C., Greenwell T. K., McDanal C. B., and Matthews T. J.** 1994. Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:9770-9774.
248. **Williams I. G.** 2003. Enfuvirtide (Fuzeon): the first fusion inhibitor. *Int J Clin Pract* **57**:890-897.
249. **Williams J. V., Crowe J. E., Jr., Enriquez R., Minton P., Peebles R. S., Jr., Hamilton R. G., Higgins S., Griffin M., and Hartert T. V.** 2005. Human metapneumovirus infection plays an etiologic role in acute asthma exacerbations requiring hospitalization in adults. *J Infect Dis* **192**:1149-1153.
250. **Williams J. V., Harris P. A., Tollefson S. J., Halburnt-Rush L. L., Pingsterhaus J. M., Edwards K. M., Wright P. F., and Crowe J. E., Jr.** 2004. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med* **350**:443-450.
251. **Williams J. V., Wang C. K., Yang C. F., Tollefson S. J., House F. S., Heck J. M., Chu M., Brown J. B., Lintao L. D., Quinto J. D., Chu D., Spaete R. R., Edwards K. M., Wright P. F., and Crowe J. E., Jr.** 2006. The role of human metapneumovirus in upper respiratory tract infections in children: a 20-year experience. *J Infect Dis* **193**:387-395.
252. **Wolf D. G., Zakay-Rones Z., Fadeela A., Greenberg D., and Dagan R.** 2003. High seroprevalence of human metapneumovirus among young children in Israel. *J Infect Dis* **188**:1865-1867.

253. **Wyde P. R., Chetty S. N., Jewell A. M., Boivin G., and Piedra P. A.** 2003. Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin in vitro. *Antiviral Res* **60**:51-59.
254. **Wyde P. R., Moylett E. H., Chetty S. N., Jewell A., Bowlin T. L., and Piedra P. A.** 2004. Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by NMSO3 in tissue culture assays. *Antiviral Res* **63**:51-59.
255. **Yeung M. L., Bennasser Y., and Jeang K. T.** 2007. miRNAs in the biology of cancers and viral infections. *Curr Med Chem* **14**:191-197.
256. **Yu M., Wang E., Liu Y., Cao D., Jin N., Zhang C. W., Bartlam M., Rao Z., Tien P., and Gao G. F.** 2002. Six-helix bundle assembly and characterization of heptad repeat regions from the F protein of Newcastle disease virus. *J Gen Virol* **83**:623-629.
257. **Zhang W., Yang H., Kong X., Mohapatra S., San Juan-Vergara H., Hellermann G., Behera S., Singam R., Lockett R. F., and Mohapatra S. S.** 2005. Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene. *Nat Med* **11**:56-62.
258. **Zhu J., Jiang X., Liu Y., Tien P., and Gao G. F.** 2005. Design and characterization of viral polypeptide inhibitors targeting Newcastle disease virus fusion. *J Mol Biol* **354**:601-613.

Annexe. Articles supplémentaires

A. Article de revue de littérature.

Au cours de mes études de doctorat, j'ai eu la chance de rédiger un article de revue de littérature portant sur le hMPV qui a été publié en 2007 dans *Seminars in respiratory and critical care medicine*, volume 28, numéro 2, pages 213-221. Cette revue s'adresse plus particulièrement aux médecins.

Human Metapneumovirus

Céline Deffrasnes, M.Sc.^{1,2} Marie-Ève Hamelin, Ph.D.^{1,2} and Guy Boivin, M.D., M.Sc.,
F.R.C.P.C.^{1,2}

¹ Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Laval University, Quebec, Canada;

² Infectious Disease Research Center, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Quebec, Canada.

Corresponding author :

Guy Boivin M.D.

Professor, practicing physician and researcher, Department of medical biology, Faculty of
Medicine, Laval University

Infectious Disease Research Center

Centre Hospitalier Universitaire de Québec

CHUQ-CHUL, Room RC-709

2705 Blvd Laurier, Sainte-Foy,

Quebec, Canada G1V 4G2

Tel: 418-654-2705

Fax: 418-654-2715

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