

Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier

**Évaluation de nouvelles approches prophylactiques contre  
le virus de l'influenza**

Par  
Ronan Rouxel

Thèse présentée  
pour l'obtention  
du grade de Philosophiæ doctor (Ph.D.)  
en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Alain Lamarre
Examineurs externes	Carl A.Gagnon (Université de Montréal) Denis Leclerc (Université Laval)
Directrice de recherche	Veronika von Messling

Juillet 2012

© Droits réservés, Ronan Rouxel, 2012

Je m'efforcerai encore de poursuivre ces recherches,  
des recherches que je ne crois pas purement spéculatives,  
mais suffisamment importantes pour inspirer l'espoir qu'il,  
le virus Vaccinia, devienne un bénéfice essentiel pour l'humanité.

Dr Edward Jenner,  
(1749-1823)

Les espèces qui survivent ne sont pas les plus fortes,  
ni les plus intelligentes,  
mais celles qui s'adaptent le mieux aux changements.

Charles Darwin,  
Naturaliste  
(1809-1882)

Une mauvaise herbe est une plante dont on n'a pas encore trouvé les vertus.

R. W. Emerson  
(1803-1882)

La chance n'est qu'un mot pour désigner la ténacité dans les projets.

R. W. Emerson  
(1803-1882)

## RÉSUMÉ

Chaque année, la grippe est responsable d'environ 325,000 décès et engendre des pertes économiques élevées, malgré des programmes de vaccination et la disponibilité de traitements anti-grippaux. La grande majorité des vaccins disponibles sont des formulations inactivées, comprenant principalement les glycoprotéines virales, qui induisent une immunité humorale dirigée uniquement contre ces antigènes. Les vaccins de type vivant-atténués développés plus récemment sont capables d'induire une réponse immunitaire humorale et cellulaire dirigée contre l'ensemble des protéines du virus d'influenza mais l'efficacité de ces vaccins est amoindrie chez les individus ayant déjà été vaccinés ou infectés par le virus par le passé. En ce qui concerne les traitements antiviraux disponibles, on observe une augmentation continue des résistances. Le développement de nouveaux traitements antiviraux et de nouvelles approches vaccinales est donc nécessaire.

Dans le cadre de mes études de doctorat, nous avons émis les hypothèses suivantes :

a) l'utilisation de ribozymes ciblant des régions conservées dans le génome d'influenza administrés comme prophylaxie permettrait de limiter la propagation du virus d'influenza indépendamment de la souche

b) l'utilisation d'un morbillivirus recombinant comme plateforme vaccinale contre le virus d'influenza permettrait d'assurer une immunité humorale et cellulaire à large spectre contre ce virus.

Pour tester ma première hypothèse, j'ai, en collaboration avec les laboratoires des Drs Bisillon et Perreault de l'université de Sherbrooke, évalué le potentiel prophylactique de ribozymes à limiter la réplication du virus d'influenza. Les ribozymes sont des séquences d'ARN capables de reconnaître puis cliver spécifiquement des séquences d'ARN cibles. Pour augmenter la spécificité de ces ribozymes, nos collaborateurs ont développé un ribozyme ayant un mécanisme de double spécificité sur un principe d'activation successif, le module « specific on/off adapter » (SOFA-HDV-rz),

rendant son utilisation thérapeutique possible. L'évaluation des candidats les plus prometteurs *in vitro* et *in vivo* dans le modèle souris a démontré une capacité de certaines combinaisons de ribozymes à limiter la réplication du virus ainsi qu'un effet protecteur chez la souris.

Pour évaluer ma deuxième hypothèse, j'ai dans un premier temps mis en place un protocole de vaccination chez le furet lors d'une étude visant à évaluer l'efficacité d'un candidat vaccinale contre le virus de la maladie de Carré (canine distemper virus, CDV). Indépendamment de la voie d'inoculation, le vaccin induisait une immunité humorale protectrice qui se stabilisait après un mois sans causer des signes cliniques ou une suppression immunitaire caractéristique d'une infection au CDV. Par la suite, j'ai établi un protocole d'évaluation de la réponse immunitaire cellulaire chez le furet par un test d'ELISpot pour l'interféron gamma. Pour palier aux manques de réactifs pour cette espèce, j'ai produit un antisérum biotinylé dirigé contre l'interféron gamma de furet. J'ai finalement construit des virus CDV recombinants à partir de la souche vaccinale Onderstepoort, exprimant des gènes de la nucléoprotéine et/ou de la protéine de hémagglutinine d'une souche H1N1 saisonnière du virus d'influenza. L'expression des protéines d'influenza par les virus recombinants a été démontrée *in vitro*. La réponse immunitaire induite par cette approche vaccinale contre chacun des agents pathogènes sera maintenant à évaluer chez le furet.

L'ensemble de mes études met en évidence le potentiel d'une approche thérapeutique basée sur des petites molécules d'ARN et constitue une contribution importante au développement du modèle furet pour des études vaccinales.

---

Ronan Rouxel

---

Veronika von Messling,  
directrice de recherche

## **REMERCIEMENTS**

Je tiens tout d'abord à remercier le Dre Veronika von Messling, ma directrice de recherche, de m'avoir permis d'entreprendre cette thèse dans son laboratoire et surtout de m'avoir permis de l'achever. Sans son aide constante, son expérience, sa patience et son dévouement, je n'aurais pu venir à bout de ce projet. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude.

Je tiens également à remercier mes nombreux collègues de travail avec qui nous avons pu partager les bons moments propres à la recherche mais qui m'ont aussi permis de garder le moral lors des coups durs. Je remercie tout particulièrement Danielle pour sa sagesse, Christophe et Sébastien pour leurs humours, Xiao pour sa candeur et Isabelle pour ses connaissances. Je remercie également Nick, Penny, Louis, Alexandre, Éveline, Bevan et Stéphane pour leur aide. Je souhaite particulièrement remercier Chantal pour nous avoir toujours épaulé lorsque nous avons le moindre problème ainsi que Émilie qui, bien que ma stagiaire par alternance, m'a énormément appris sur la pédagogie.

En ce qui concerne la vie universitaire, la liste de mes remerciements serait trop longue pour être nominative et je le regrette, mais je tiens à remercier très particulièrement les étudiants de l'IAF ainsi que les membres de l'association étudiante qui ont cru en moi pour les représenter pendant ces deux dernières années. Je remercie également les directeurs de l'institut, Mrs Charles Dozois et Alain Fournier ainsi qu'Anne Phillipon pour leur écoute face aux nombreux problèmes étudiants qui se sont présentés et pour la confiance qu'ils ont eue en moi. Je remercie aussi mes compagnons du congrès Armand-Frappier pour la fantastique aventure que cela a été.

J'aimerais finalement remercier les membres de ma famille qui m'ont encouragé et soutenu durant mes études universitaires. Pour finir, je remercie infiniment Soizic, ma compagne, pour son aide, son soutien et sa patience. Elle a plus que quiconque cru en moi et a toujours su trouver les mots pour m'encourager à persévérer. Elle m'a été une source d'inspiration quotidienne. Cette thèse ne serait pas sans elle.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	iii
REMERCIEMENTS .....	v
TABLE DES MATIÈRES .....	vi
TABLE DES ILLUSTRATIONS .....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	xii
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION .....	1
<b>1. Le virus d'influenza</b> .....	2
1.1 Épidémiologie .....	2
1.2 Phylogénie .....	2
1.3 Structure du virion et protéines virales .....	2
a) Structure du virion .....	2
b) Protéines virales impliquées dans la réplication du virus.....	3
1.4 Réassortiment antigénique et dérive antigénique.....	7
1.5 Modèles animales pour les études du virus d'influenza.....	7
a) Le modèle souris .....	8
b) Le modèle furet .....	8
<b>2. Le virus d'influenza : Pathogénèse et réponse immunitaire induite</b> .....	10
2.1 Pathogénèse du virus d'influenza.....	10
2.2 Réponse immunitaire induite .....	11
a) Réponse immunitaire innée .....	11
b) Réponse immunitaire adaptative .....	11
1- La réponse immunitaire humorale .....	12
2- La réponse immunitaire cellulaire.....	12
3- La mémoire immunitaire et la protection croisée.....	13
<b>3. Mesure préventives et thérapeutiques contre le virus d'influenza</b> .....	15
3.1 Un siècle de lutte contre le virus d'influenza.....	15
3.2 Médicaments et traitements pharmacologiques anti-influenza .....	15
a) Les bloqueurs de canaux ioniques .....	15
b) Les inhibiteurs de neuraminidase .....	15
c) Autres traitements en voie de développement .....	16

3.3 Les ribozymes et leur potentiel comme traitement prophylactique .....	16
3.4 Approches vaccinales.....	19
a) Les vaccins inactivés .....	19
b) Les vaccins vivant-atténués .....	19
c) Immunité induite par les vaccins.....	20
d) Efficacité des vaccins LAIV et IV .....	21
e) Approches vaccinales en développement.....	21
<b>4. Les morbillivirus comme vecteur viraux vaccinaux .....</b>	<b>23</b>
4.1 Phylogénie .....	23
4.2 Structure du virion et rôle des protéines virales .....	25
4.3 Cycle de réplication des morbillivirus .....	27
4.4 Pathogénèse des morbillivirus.....	29
4.5 Réponses immunitaires induites par les morbillivirus .....	31
a) Réponse immunitaire innée .....	31
b) Réponse immunitaire adaptative .....	31
4.6 Vaccins contre les morbillivirus .....	32
4.7 Les morbillivirus comme vecteur thérapeutique oncolytique et comme vaccin multivalent .....	33
4.8 Modèles animaux d'infection morbillivirale.....	35
<b>5. Problématique, hypothèses et objectifs de travail .....</b>	<b>37</b>
 <b>CHAPITRE 2 : PUBLICATIONS .....</b>	<b>39</b>
<b>Publication no. 1 .....</b>	<b>40</b>
<i>A Novel Ribozyme-Based Prophylaxis Inhibits Influenza A Virus Replication and         Protects from Severe Disease.....</i>	40
Résumé .....	41
Abstract .....	42
Introduction .....	43
Materials and methods .....	45
Results .....	50
Discussion .....	64
Acknowledgments .....	67

References .....	68
<b>Publication no. 2</b> .....	72
<i>A Chimeric Measles Virus with Canine Distemper Envelope Protects Ferrets from Lethal Distemper Challenge</i> .....	72
Résumé .....	73
Abstract .....	74
Introduction .....	75
Materials and methods .....	77
Results .....	80
Discussion .....	89
Acknowledgments .....	92
References .....	93
<b>Publication no. 3</b> .....	96
<i>Generation and Characterisation of a Live-Attenuated Morbillivirus-Based Influenza Candidate Vaccine</i> .....	96
Résumé .....	97
Abstract .....	98
Introduction .....	99
Materials and methods .....	101
Results .....	106
Discussion .....	115
References .....	117
<b>CHAPITRE 3 : DISCUSSION</b> .....	120
<b>1. Limitations des traitements actuels contre le virus d'influenza</b> .....	121
<b>2. Les ribozymes comme traitement prophylactique contre le virus d'influenza</b> ..	123
<b>3. Les virus chimériques et leur potentiel vaccinal</b> .....	124
<b>4. Les <i>Mononegavirales</i> comme plateforme vaccinale</b> .....	126
<b>5. Les virus recombinants CDV-NP/HA comme modèles d'étude de la     plateforme vaccinale morbillivirus</b> .....	128



<b>6. Application de la plateforme morbillivirale dans un contexte de virus pandémique d'origine aviaire .....</b>	<b>129</b>
<b>7. Application du modèle CDV comme plateforme morbillivirus dans l'étude des traitements viraux oncolytiques .....</b>	<b>130</b>
<b>8. Conclusions et perspectives.....</b>	<b>131</b>
<b>RÉFÉRENCES... ..</b>	<b>132</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

<b>Figure 1</b> : Représentation schématique d'un virus d'influenza	4
<b>Figure 2</b> : Représentation schématique du réassortiment antigénique	9
<b>Figure 3</b> : Représentation schématique du ribozyme SOFA-HDV	18
<b>Figure 4</b> : Arbre phylogénique des morbillivirus	24
<b>Figure 5</b> : Représentation schématique d'un morbillivirus	26
<b>Figure 6</b> : Gradient de transcription des morbillivirus	28
<b>Figure 7</b> : Chronologie de la pathogénèse des morbillivirus	30

### CHAPITRE 2 : PUBLICATIONS

#### Publication no. 1

<b>Figure 1</b> : Representation of the conservation study performed on the viral mRNA fragments from human influenza A virus	51
<b>Tableau 1</b> : <i>In vitro</i> catalytic activity of the selected SOFA-HDV-Rz.	53
<b>Figure 2</b> : Schematic drawing of a SOFA-HDV-Rz	54
<b>Figure 3</b> : Catalytic activity of SOFA-HDV-Rz directed against influenza mRNAs	56
<b>Figure 4</b> : Antiviral activity of SOFA-HDV-Rz (A) in cells and (B and C) <i>in vivo</i>	60
<b>Figure S1</b> : Schematic representation of the plasmid designed to simultaneously express a SOFA-HDV-Rz and the corresponding target mRNA	62
<b>Tableau S1</b> : Predicted specificity of the selected SOFA-HDV-Rz	63

#### Publication no. 2

<b>Figure 1</b> : Generation and <i>in vitro</i> characterization of a chimeric MeV with CDV envelope	81
<b>Figure 2</b> : Infection and dissemination characteristics of the different viruses in ferret peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)	82
<b>Figure 3</b> : Immunization of ferrets with MVvac58Penv	84
<b>Figure 4</b> : Antibody response after immunization	85
<b>Figure 5</b> : Lethal challenge experiment	87
<b>Figure 6</b> : Antibody response after challenge	88

**Publication no. 3**

<b>Figure 1</b> : Production of biotinylated anti-ftIFN $\gamma$ antiserum	107
<b>Figure 2</b> : ELISpot assay optimisation.	109
<b>Figure 3</b> : Generation and <i>in vitro</i> characterization of recombinant viruses	110
<b>Figure 4</b> : Expression of HA and NP proteins in infected Vero cells	112
<b>Figure 5</b> : Immunofluorescence detection of NP and HA proteins in infected Vero cells	113
<b>Figure 6</b> : Analysis of HA and NP protein incorporation into viral particles	114

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

µg : microgramme  
µl : microlitre  
ADN : acide désoxyribonucléique  
ADCC : cytotoxicité cellulaire médiée par les anticorps  
ARN : acide ribonucléique  
ARNm : acide ribonucléique messenger  
ATCC : American Type Culture Collection  
ASPV : Paramyxovirus du saumon Atlantique  
BPIV3 : virus parainfluenza bovin de type 3  
°C : Celsius  
CEA : antigène carcino-embryonique  
CD : cluster of differentiation  
cDNA : complementary deoxyribonucleic acid  
CDV : canine distemper virus  
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité  
CNS : central nervous system  
C-terminal : carboxy-terminal  
CTR : control  
DEN : virus de la dengue  
DMV : dolphin morbillivirus  
EDTA : acide éthylène diamine tetra acétique  
eGFP : enhanced green fluorescent protein  
F : protéine de fusion  
FACS : Fluorescence-activated cell sorter  
FAO : Food and agriculture organisation  
Fc : fragment cristallisable  
FITC : fluorescéine isothiocyanate  
H : hémagglutinine  
h : heure  
HA : hémagglutinine du virus d'influenza  
HAI : anticorps inhibiteurs de l'hémagglutination  
HDV : virus de l'hépatite D

HDV rz : ribozyme du HDV  
HIV : human immunodeficiency virus  
HPIV : virus influenza hautement pathogène  
HPIV3 : virus parainfluenza human de type 3  
HRSV : virus respiratoire syncytial humain  
IFN : interféron  
IgA : immunoglobuline A  
IgG : immunoglobuline G  
IgM : immunoglobuline M  
IL : interleukine  
IV : vaccin inactivé  
JEV: virus de l'encephalite japonaise  
kb : kilobase  
kDa : kilodalton  
L : protéine large  
LAIV : vaccin influenza vivant-atténué  
M : protéine de la matrice  
MDCK : Madin–Darby Canine Kidney cells  
mg : milligramme  
ml : millilitre  
mM : millimolaire  
MeV : measles virus  
MOI : multiplicity of infection  
MVA : virus vaccinia Ankara modifié  
N : nucléocapside  
NA : neuraminidase  
NAI : inhibiteur de la neuraminidase  
NDV : New Castle disease virus  
NIS : symporter sodium iodide  
NK : cellule Natural-Killer  
N-terminal : amino-terminal  
NP : nucléoprotéine  
NS1, NS2: protéines non-structurales 1 et 2 du virus d'influenza  
OMS : organisation mondiale de la santé  
P : phosphoprotéine

PA, PB1, PB2 : polymerase A, B1 et B2 du virus d'influenza  
PBMC : peripheral blood mononuclear cells  
PBS : phosphate buffered saline  
pDNA : plasmide DNA  
PDV : phocine distemper virus  
PESS: panencéphalite sclérosante subaiguë  
pH: potential hydrogène  
PHA : phytohémagglutinine  
PPRV : peste-des-petits-ruminants virus  
PSPV : Paramyxovirus du saumon Pacifique  
RNA : ribonucleic acid  
RNAi : ARN interférence  
RNP : complexe ribonucléoprotéique  
RPV : rinderpest virus  
RT-PCR : Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction  
siRNA : small interfering RNA  
SLAM : signaling lymphocytic activation molecule  
SNC : Système nerveux central  
SNCI : souche non-circulante d'influenza  
SOFA : specific on/off adapter  
TCID<sub>50</sub> : tissue culture 50% infectious dose  
TCR : T-cell receptor  
TH : T-helper  
TLR : Toll-like receptor  
TNF : tumour necrosis factor  
VHC : virus de l'hépatite C  
VHSV : virus de la sépticémie hémorragique virale  
VHB : virus de l'hépatite B  
VHBsag : antigène de surface de l'HBV  
VIH : virus de l'immunodéficience humaine  
VIS : virus de l'immunodéficience simienne  
VNO : virus du Nil occidental  
VSV : Vesicular stomatitis virus  
WT : wild type  
YFV : virus de la fièvre jaune

# **CHAPITRE 1**

## **INTRODUCTION**

# **1 - Le virus de l'influenza :**

## **1.1 Épidémiologie**

Le virus de l'influenza A est l'agent pathogène responsable de la grippe. La grippe saisonnière se caractérise par de fortes fièvres, de la toux, un malaise général, des écoulements nasaux et des douleurs musculaires (Eccles 2005). Généralement les symptômes disparaissent après une semaine mais la grippe peut entraîner une maladie grave allant jusqu'au décès. Les épidémies de grippe saisonnière sont responsables annuellement de 3 à 5 millions de cas graves de la maladie et 250 000 à 500 000 décès principalement au sein des populations âgées (65 ans et plus). L'émergence d'une nouvelle souche d'influenza peut être la cause d'une pandémie de grippe dont l'incidence peut atteindre le million de décès mondial (W.H.O. 2009).

## **1.2 Phylogénie**

Le virus de l'influenza fait partie de la famille des *Orthomyxoviridae*. Il s'agit d'un virus à ARN simple brin de polarité négative au génome segmenté. Il existe trois types de virus d'influenza : A, B et C différenciés selon la structure antigénique de leurs protéines de nucléocapside (NP) et de matrice (M) (Lamb et Krug 1996). Seuls les virus d'influenza de type A seront discutés dans cette thèse. Les virus d'influenza de type A sont sous-catégorisés en sous-types en fonction de leurs protéines de surfaces hémagglutinine (HA) et neuraminidase (NA). Actuellement, ce sont les sous-types H1N1 et H3N2 qui sont retrouvés chez les humains et sont responsables des épidémies saisonnières de grippe (Palese et Shaw 2007).

## **1.3 Structure du virion et protéine virales**

### **a) Organisation génomique et structure du virion:**

La particule virale d'influenza est constituée de huit segments génomiques codant pour 12 protéines. Les segments 1,3, 4, 5 et 6 mènent à la synthèse d'un seul ARNm, respectivement de PB2, PA, HA, NP et NA. Le segment 2 code pour la polymérase PB1, le facteur de virulence proapoptotique PB1-F2, issu d'un cadre de lecture alternatif, ainsi que la protéine N40, une homologue de PB1 tronqué en N-terminal et dont la fonction reste à déterminer (Wise *et al.*,



2009). Les segments 7 et 8 donnent naissance aux protéines M1 et NS1 et, par épissages alternatifs, les protéines M2 et NS2 (Palese et Shaw 2007).

Une particule virale contient une seule copie de chaque sous forme de complexes ribonucléoprotéiques (RNP) (figure 1). Un complexe RNP est composé d'un segment du génome d'ARN virale simple brin de polarité négative encapsidé par des protéines de NP et maintenu sous la forme d'une double hélice (Compans, Content et Duesberg 1972). À chaque segment de génome est également associé un complexe d'ARN- polymérase constitué des protéines PA, PB1 et PB2 rattachées au génome par une interaction entre les extrémités 5' et 3' de l'ARN et la polymérase PB1 (Noda et Kawaoka 2010). L'enveloppe du virion est composée d'une bicouche lipidique issue de la membrane plasmique de la cellule infectée à laquelle est associée une couche de protéine de la matrice M1 sur la paroi intracellulaire de la cellule infectée. Des trimères d'HA, des tétramères de NA et des canaux ioniques sont incorporés dans la membrane (Palese et Shaw 2007). De plus, la présence de la protéine non-structurale 2 (NS2) en faible proportion a été démontrée dans le virion (Yasuda *et al.*, 1993).

#### **b) Protéines virales impliquées dans la réplication du virus:**

La protéine HA est responsable de la fixation du virion à la surface de la cellule ainsi que de l'entrée du virus par fusion des membranes virales et endosomales. HA est une protéine transmembranaire de type I synthétisée sous forme d'un précurseur HA0 qui nécessite une activation par des protéases cellulaires résultant en deux sous-unités HA1 et HA2 (Cross *et al.*, 2009). La sous-unité HA1 est liée à la sous-unité HA2 transmembranaire par un pont disulfure (Palese et Shaw 2007). Une fois lié à ses récepteurs cellulaires, les acides sialiques, le virion sera internalisé dans la cellule par la voie endosomale. La diminution du pH dans la vésicule endosomale va induire un changement conformationnel de la protéine HA qui conduira à l'exposition du domaine de fusion de la sous-unité HA2. Le peptide de fusion va ensuite s'intégrer dans la membrane endosomale et induire sa fusion avec l'enveloppe virale, libérant ainsi le complexe de réplication qui initialise par la suite le cycle de réplication dans le noyau de la cellule infectée (Harrison 2008).

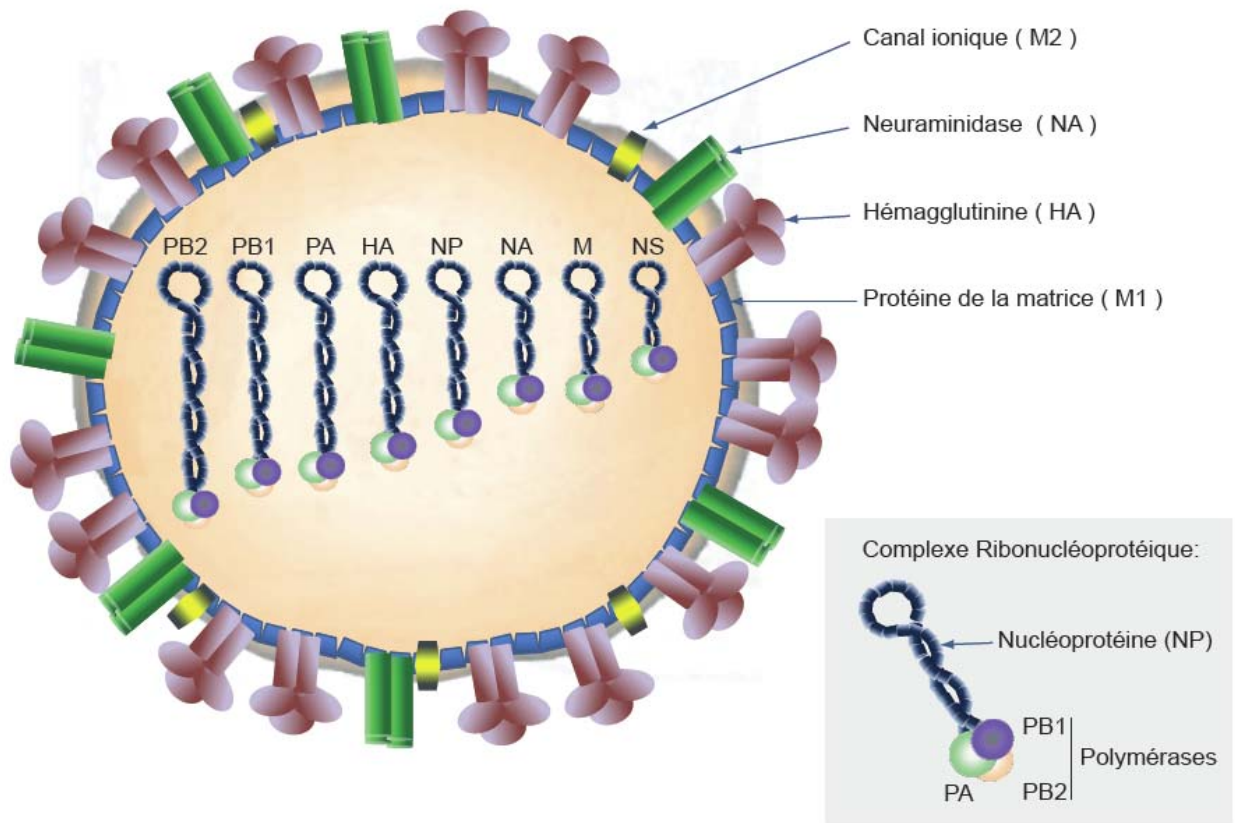


Figure 1 : Représentation schématique d'un virus d'influenza

Le canal ionique M2 est nécessaire à la libération des complexes RNP dans les cellules. Lors de l'acidification de l'endosome, le passage de protons par la protéine M2 entraîne une diminution du pH à l'intérieur du virion, ce qui diminue l'interaction entre les protéines M1 et NP du complexe RNP, permettant le relargage du génome virale dans le cytoplasme (Martin et Helenius 1991, Takeda *et al.*, 2002).

Les protéines PA, PB1 et PB2 forment le complexe de polymérase ARN-dépendante. Une fois dans le noyau, ce complexe assure la production d'ARN messagers du virus d'influenza par « Cap-snatching ». La polymérase PB2 se lie à la coiffe d'ARN messenger (ARNm) cellulaire, puis PA clive l'ARN cellulaire et se sert de sa coiffe comme amorce pour transcrire l'ARN messenger viral par la polymérase PB1 (Dias *et al.*, 2009). L'essentiel des ARNm issus de la transcription des huit ARN génomiques est exporté dans le cytoplasme pour être traduit en protéines par les ribosomes cellulaires à l'exception des ARNm issus de gènes NS et M qui subissent d'abord un épissage alternatif dans le noyau pour donner les ARNm NS1, NS2 et M1, M2 (Palese et Shaw 2007).

La protéine NP est une protéine produite en grande quantité par le virus de l'influenza et la seconde plus abondante dans le virion, après la protéine M1 (Lamb et Krug 1996). Elle assure le repliement et le maintien de l'ARN viral. La protéine NP contient un domaine de localisation nucléaire qui permet l'internalisation des complexes RNP dans le noyau de la cellule infectée afin d'initier la réplication du génome (Wu, Sun et Pante 2007). La transition de la transcription à la réplication est dépendante de la quantité de NP nouvellement synthétisés (Biswas, Boutz et Nayak 1998). Par l'intermédiaire d'un antigénome de polarité positive, de nombreuses copies d'ARN génomiques de polarités négatives seront transcrites. Le gène codant pour la protéine NP est hautement conservé entre les différentes souches de virus d'influenza (Motard *et al.*, 2011), et elle est la principale cible de la protection croisée induite par les lymphocytes T cytotoxiques (voir chapitre 2) (Taylor et Askonas 1986). Son haut degré de conservation en fait une cible de choix afin d'optimiser la protection à large spectre.

La protéine NS2 possède également un signal d'importation nucléaire. Elle assure l'entrée dans le noyau de la protéine M1 associée au complexe RNP. La protéine NS2, toujours fixée à

l'ensemble M1-RNP, permet également la sortie du complexe hors du noyau afin qu'il soit intégré dans des particules virales en formation (Shimizu *et al.*, 2011).

Les glycoprotéines de l'enveloppe HA, NA et M2 subissent des modifications post-traductionnelles dans le réticulum endoplasmique puis sont acheminées jusqu'à la surface de la cellule infectée. Elles s'accumulent dans des radeaux lipidiques d'où les domaines cytoplasmiques des protéines HA et NA vont servir de point d'ancrage aux protéines M1. L'accumulation sur le côté cytoplasmique de la membrane cellulaire de protéines M1 va induire le bourgeonnement de la particule virale (revue par Rossman et Lamb 2011). Bien qu'il ait été déterminé que c'est l'interaction du complexe RNP avec la protéine M1 qui permet l'intégration des huit gènes d'influenza dans la particule virale, le mécanisme permettant d'assurer la présence d'une seule copie de chaque gène dans le virion est inconnu. Finalement, la protéine NA par son activité enzymatique, permet le détachement des virions de la surface des cellules infectées. La protéine NA est retrouvée à la surface de la particule virale sous la forme d'un homotetramère (Palese et Shaw 2007). Son activité enzymatique lui permet de cliver les acides N-acetylneuraminiques des glycoprotéines et glycolipides à la surface de la cellule infectée. Les acides sialiques servant de récepteurs à la protéine HA sont ainsi également clivés, ce qui permet la libération des particules virales sans qu'il n'y ait re-fixation à la surface de la cellule productrice (Gamblin et Skehel 2010).

Durant la réplication du virus, des protéines virales aux fonctions pléiotropiques vont moduler l'activité de la cellule infectée. La protéine NS1 notamment régule l'exportation d'ARNm cellulaires en dehors du noyau, interfère avec les processus de maturation des ARNm cellulaires et bloque la mise en place de la cascade de signalisation antivirale telle que la voie des interférons de type I (IFN-I) afin de ralentir la réponse immunitaire de l'hôte ( revue par Hale *et al.*, 2008). Au contraire, dans certaines souches de virus d'influenza, la protéine virale PB1-F2 est un facteur de virulence impliqué dans la pathogenèse du virus en induisant l'apoptose de la cellule infectée, favorisant ainsi une inflammation locale et en promouvant des infections bactériennes secondaires (revue par Krumbholz *et al.*, 2011).

## **1.4 Réassortiment antigénique et dérive antigénique**

Bien qu'ayant déjà été infecté par un virus d'influenza par le passé, un même individu reste susceptible à une réinfection avec un virus d'un même sous-type si ce dernier a subi une dérive antigénique telle, que le système immunitaire n'est plus capable de reconnaître ses glycoprotéines de surface (Murphy et Webster 1996). La dérive antigénique est le résultat d'accumulation de mutations ponctuelles dans les gènes codant pour les protéines de l'enveloppe du virus, HA et NA. Ces mutations sont induites par l'ARN polymérase virale qui ne contient pas de mécanisme de vérification de transcription. Les changements entraînent une variation de la structure des protéines de l'enveloppe du virus qui échappe ainsi à la surveillance du système immunitaire. C'est ce mécanisme qui est responsable des épidémies saisonnières annuelles de grippe (Carrat et Flahault 2007).

Le réassortiment antigénique est le résultat d'un brassage de gènes entre plusieurs sous-types de virus d'influenza infectant une même cellule (figure 2). Il existe à ce jour dix-sept différents sous-types de HA (H1 à H17) et dix sous-types de NA (N1 à N10) (Palese et Shaw 2007, Tong *et al.*, 2012). Dû à son génome segmenté, une même cellule infectée par plusieurs sous-types de virus peut donner lieu à la production de virions qui contiennent une combinaison de segments génomiques des différents sous-types originaux (Carrat et Flahault 2007). Si un virus réassortant de cet échange conserve son potentiel infectieux pour une espèce donnée, il peut rapidement se disperser dans une population en absence d'une immunité préexistante. Ce mécanisme rare est à l'origine des pandémies de gripes des derniers siècles.

## **1.5 Modèles animaux pour l'étude du virus de l'influenza**

Selon l'axe de recherche abordé, plusieurs modèles animaux ont été étudiés. Les hôtes naturels du virus d'influenza sont les oiseaux aquatiques chez lesquels on retrouve tous les sous-types d'influenza répertoriés. Toutefois, le spectre d'hôtes du virus influenza est large et certains sous-types du virus peuvent affecter des oiseaux non-aquatiques ou des mammifères tels que les chiens, chevaux, porcs et furets. La capacité du virus à passer la barrière des espèces est due au

fait que le virus de l'influenza cible des récepteurs cellulaires présents chez une grande variété d'animaux (Suzuki 2005). Ce large éventail d'hôtes susceptibles permet d'avoir un vaste choix de modèles animaux bien que cela nécessite parfois une adaptation de la souche virale à l'hôte.

#### **a) Le modèle souris**

Le modèle souris est le modèle animal le plus fréquemment utilisé dans l'étude du virus influenza (Barnard 2009). Cependant, la souris n'est pas un hôte naturel et l'utilisation d'une nouvelle souche nécessite généralement une adaptation tel que ce fut le cas pour la souche A/H1N1/PR8/34 (Francis et Magill 1935, Narasaraaju *et al.*, 2009). Toutefois, il a été observé que des souches de virus d'influenza de type H5N1 d'isolats humains (Lu *et al.*, 1999) ou de souches hautement pathogènes tels que les souches pandémiques de 1918 (Medina *et al.*, 2010) ou 2009 (Manicassamy *et al.*, 2010) étaient naturellement pathogènes chez la souris. En revanche, la pathologie et la transmission du virus ne sont pas comparables à ce que l'on observe chez l'humain. Malgré tout, de par l'abondance des réactifs pour ce modèle, la souris reste le choix de prédilection pour l'étude des différents acteurs de la réponse immunitaire et le développement de traitements antiviraux.

#### **b) Le modèle furet**

Le furet (*Mustela putorius furo*) est naturellement susceptible aux souches influenza humaines, notamment dû à la distribution similaire des récepteurs dans les tractus respiratoires des deux espèces (van Riel *et al.*, 2007). Ainsi, contrairement au modèle souris, une adaptation au virus n'est pas nécessaire (Maher et DeStefano 2004). De ce fait, le modèle furet a largement été étudié en ce qui concerne la transmission (Maines *et al.*, 2009), la pathogenèse (Govorkova *et al.*, 2005, Munster *et al.*, 2009) et le développement de nouveaux traitements anti-grippaux (Mishin *et al.*, 2005). Cependant, le manque de disponibilité des réactifs pour le furet limite l'étude de la réponse immunitaire dans ce modèle. Il a cependant pu être récemment observé une similitude dans le profil de cytokines suite à l'infection entre le modèle furet et ce que l'on observe chez l'humain tel que l'augmentation des niveaux d'expression des interleukines 6 et 8 et la diminution des niveaux d'expression des interférons de types I et II (Svitek *et al.*, 2008, Lam *et al.*, 2010).

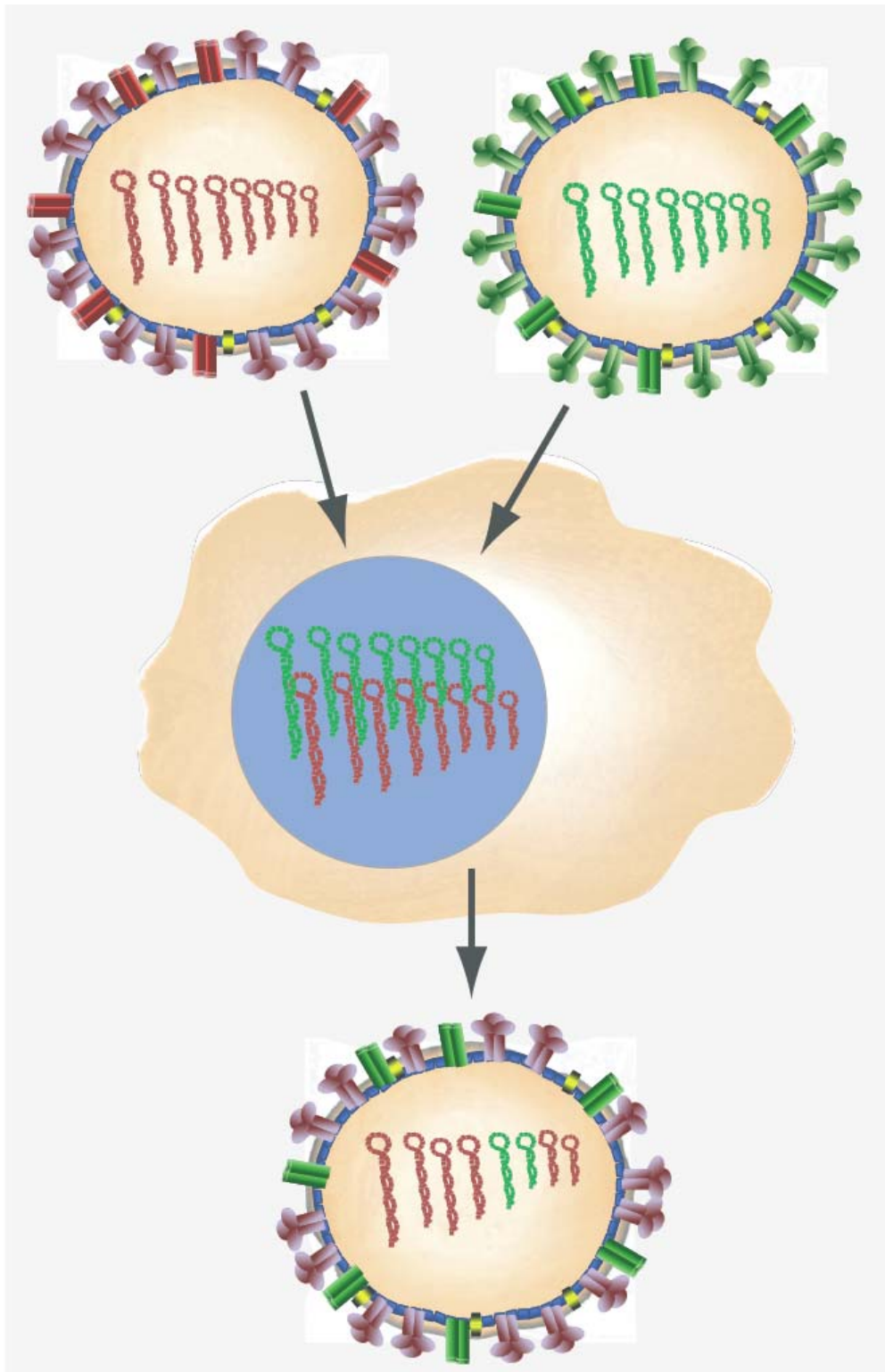


Figure 2 : Représentation schématique du réassortiment antigénique

## **2 – Le virus de l’influenza : pathogénèse et réponse immunitaire induite**

### **2.1 - Pathogénèse du virus de l’influenza**

Le virus de l’influenza est transmis par aérosols sous la forme de gouttelettes. Le site d’infection du virus est dépendant du type de récepteurs reconnu par le virus. Le récepteur cellulaire reconnu par la protéine HA des souches humaines est l’acide sialique  $\alpha$ 2-6 (Matrosovich *et al.*, 2004). L’expression conjointe de récepteurs de l’hémagglutinine et de sérines protéases nécessaires à la production d’hémagglutinine sous-forme active (Chen *et al.*, 1998) se retrouve seulement dans les cellules Clara chez l’humain, des cellules non-ciliées de l’épithélium bronchiale ( revu par (Steinhauer 1999) et la réplication du virus est donc limité à ces cellules. Plusieurs souches d’influenza aviaire hautement virulentes se lient préférentiellement aux acides sialiques  $\alpha$ 2-3 dans le tractus respiratoire inférieur et possèdent un site de clivage polybasique reconnu par des protéases ubiquitaires de telles sortes que ces virus peuvent se disséminer hors du tractus respiratoire (Thanh, van Doorn et de Jong 2008).

Un cycle de réplication du virus s’effectue en environ six heures et permet la production de milliers de particules virales en entraînant la mort de la cellule infectée (Baccam *et al.*, 2006, Kamps, Hoffmann et Preiser 2006). Les particules virales sont préférentiellement libérées à la surface apicale des cellules épithéliales, dans le lumen du tractus broncho-alvéolaire. Le virus de l’influenza libéré dans le tractus respiratoire peut par la suite être transmis sous forme d’aérosol à d’autres individus par la respiration, la toux et les éternuements (Kamps, Hoffmann et Preiser 2006, Lindsley *et al.*, 2010).

La rupture de la barrière épithéliale (Mori *et al.*, 1995), la diminution du mouvement mucociliaire (Pittet *et al.*, 2010) ainsi que l’altération des fonctions des neutrophiles (McNamee et Harmsen 2006) contribuent aux risques de surinfection bactérienne dans le tractus respiratoire associés aux cas de morbidité sévère et de mortalité observée chez les patients infectés par le virus de l’influenza (Morens, Taubenberger et Fauci 2008).



## 2.2 -Réponse immunitaire induite

### a) Réponse immunitaire innée

Le virus de l'influenza cause une infection aiguë qui initie des cascades de réponses immunitaires. La réponse immunitaire innée se caractérise par une libération massive de cytokines proinflammatoires tels que les Interleukines (IL) IL-1 $\alpha/\beta$ , IL-6, IL-8 ainsi que le tumor necrosis factor TNF- $\alpha$  et TNF- $\beta$  et les interférons de type I, IFN $\alpha$  et IFN $\beta$  (Piqueras *et al.*, 2006, Baskin *et al.*, 2009, Lam *et al.*, 2010). La production de ces cytokines va induire un influx massif de neutrophiles, de granulocytes et de cellules NK aux sites d'infection. L'IFN $\gamma$  notamment, synthétisé par les lymphocytes T cytotoxiques (CD8<sup>+</sup>), T « helper » (CD4<sup>+</sup>) et les cellules NK activées, va attirer les neutrophiles et les macrophages alvéolaires au site d'infection (Doherty *et al.*, 2006). La cascade signalétique va également conduire à la libération par l'hypothalamus de prostaglandine E2, à l'origine de la fièvre associée à l'infection, et de bradykinine responsable de la myalgie et du phénomène de toux (Eccles 2005).

Bien que la réponse immunitaire innée soit responsable de la majorité des signes cliniques associés à une infection par le virus de l'influenza, elle est nécessaire au contrôle et à l'élimination de l'infection. Afin de ralentir ce procédé, le virus de l'influenza a développé plusieurs mécanismes d'évasion du système immunitaire tels que ceux exploités par la protéine NS1 mentionnée dans le premier chapitre (Hale *et al.*, 2008).

### b) Réponse immunitaire adaptative

Les réponses immunitaires humorales et cellulaires contribuent à l'élimination du virus durant l'infection. Les cellules dendritiques résidentes des poumons vont s'activer en capturant des antigènes viraux. Une fois activées, ces cellules migrent jusqu'aux ganglions lymphatiques (Legge et Braciale 2003). Les antigènes viraux capturés sont présentés aux lymphocytes T des ganglions via les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH). Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et T CD4<sup>+</sup> vont s'activer et proliférer après reconnaissance de leur antigène spécifique présenté par les CMH de classe I ou de classe II, respectivement. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> vont ensuite stimuler

les lymphocytes B spécifiques pour l'antigène afin d'entraîner l'induction d'une réponse immunitaire humorale (Murphy *et al.*, 2008).

### 1) La réponse immunitaire humorale

La réponse immunitaire humorale via des anticorps de types IgA, IgG et IgM participe à la neutralisation des particules virales et à l'élimination des cellules infectées par cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (Jegerlehner *et al.*, 2004). Chez l'homme, les premiers anticorps inhibiteurs d'héماغglutination sont détectables à partir de 4 à 7 jours après infection. Ils présentent un pic de concentration entre 14 et 21 jours et persistent à un niveau détectable durant plusieurs mois voire plusieurs années (Potter et Oxford 1979, Kunzel *et al.*, 1996). Les anticorps anti-HA sont capables de neutraliser le virus, limiter la propagation du virus et donc d'empêcher une seconde infection avec un virus homologue. En effet, des souris déficientes en lymphocytes B et T auxquelles sont administrés des anticorps anti-HA survivent à une infection par un virus d'influenza (Palladino *et al.*, 1995, Mozdzanowska *et al.*, 1997). L'induction d'anticorps anti-HA est l'étalon-or recherché dans le développement de nouveaux vaccins anti-influenza (voir chapitre 5). Les anticorps anti-NA ne neutralisent pas l'entrée du virus mais limitent sa propagation en inhibant l'activité neuraminidase. L'ajout d'anti-NA et d'anti-M2 ne bloque pas l'infection mais permet une diminution de la charge virale dans les poumons (Mozdzanowska *et al.*, 1999).

Une infection par le virus de l'influenza va engendrer une réponse humorale à la fois mucoale et sérique. Il a été établi une concordance entre les niveaux d'IgG mucoaux et d'IgG sériques qui suggère une diffusion passive aux niveaux des épithéliums alvéolaires. Les IgA en revanche sont cantonnés aux muqueuses mais ils sont suffisants pour empêcher une réinfection avec la même souche du virus (Renegar *et al.*, 2004). Les anticorps mucoaux (IgG et IgA) seuls ou les anticorps sériques (IgG et IgM) seuls sont suffisants pour protéger contre une réinfection s'ils sont présents en concentrations suffisantes (Clements *et al.*, 1986, Renegar *et al.*, 2004).

### 2) La réponse immunitaire cellulaire

L'infection par le virus influenza entraîne un recrutement de cellules dendritiques aux poumons (McGill, Van Rooijen et Legge 2008). Les cellules dendritiques pulmonaires CD103<sup>+</sup>

CD11b<sup>low/neg</sup> acheminent les particules virales capturée depuis les poumons jusqu'aux ganglions lymphatiques médiastinaux (Ho *et al.*, 2011). Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> activés par les cellules dendritiques vont migrer vers le site d'infection afin d'éliminer les cellules infectées. Les cellules T CD8<sup>+</sup> éliminent les cellules infectées par l'intermédiaire de leur récepteur CD95 (FAS) et par exocytose de perforine/granzyme (Topham, Tripp et Doherty 1997). Il a été démontré chez des souris BALB/c que la protéine virale NP est la cible majeure des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Yewdell *et al.*, 1985). Bien qu'un rôle cytotoxique direct des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans l'élimination du virus de l'influenza par exocytose de perforine/granzyme à l'encontre des cellules infectés a été postulé récemment (Wilkinson *et al.*, 2012), la contribution principale des cellules T CD4<sup>+</sup> dans l'élimination du virus s'effectue via l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Topham et Doherty 1998), ainsi que dans le changement de classe et la mutation somatique de lymphocytes B (Scherle et Gerhard 1986). Des souris déplétées en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> éliminent le virus plus tardivement et subissent une augmentation de morbidité associée à l'infection (Riberdy *et al.*, 2000, Belz *et al.*, 2002). Inversement, le transfert adoptif de cellules T CD4<sup>+</sup> dans des souris déplétées en T CD4<sup>+</sup> amplifie la production d'anticorps neutralisants dirigés contre le virus influenza (Scherle et Gerhard 1986).

C'est l'ensemble des acteurs de la réponse immunitaire, humorale et cellulaire, travaillant de concert qui permettent l'élimination du virus de l'influenza. Des souris n'ayant ni lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ni possibilités d'induire la production d'anticorps ne parviennent pas à contenir et à éliminer le virus et décèdent suite à l'infection (Mozdzanowska *et al.*, 1997). Des souris déficientes en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> démontrent un retard dans l'élimination du virus et auront leur mécanisme de mémoire immunitaire affecté (Belz *et al.*, 2002).

### 3) La mémoire immunitaire et la protection croisée

Les protéines virales internes sont très conservées au sein des différents souches et sous-types du virus d'influenza (Motard *et al.*, 2011). Il y a donc possibilité de reconnaissance croisée du système immunitaire entre une souche d'influenza précédemment rencontrée et une nouvelle souche homotypique ou hétérotypique circulante. Il a été observé chez des souris immunisées une diminution du titre virale dans les poumons ainsi qu'une réduction de la pathologie associée à l'infection lors d'un défi avec une souche hétérologue d'influenza, des observations similaires ont été faites chez le furet (Schulman et Kilbourne 1965, Yetter, Barber et Small 1980). De plus, il a

été démontré que des souris infectées par un virus de type H3N2, puis par un virus de type H1N1, survivent par la suite à une infection par un virus influenza de type H7N7 principalement grâce à leurs lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Christensen *et al.*, 2000). Le transfert adoptif de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dirigés contre la protéine NP (Taylor et Askonas 1986) ou l'immunisation de souris avec un vecteur viral codant pour la protéine NP (Epstein *et al.*, 2005) protège les souris contre un défi avec des souches homotypiques ou hétérotypiques du virus d'influenza. Toujours chez la souris, la déplétion de cellules T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> avant un second défi diminue l'efficacité de la réponse hétéro-soustypique (Liang *et al.*, 1994). Le rôle des anticorps neutralisants, majoritairement dirigés contre HA et NA, est considéré comme inexistant dans la reconnaissance croisée puisque plusieurs études démontrent que des souris déficientes en anticorps conservent une réponse hétéro-soustypique (Epstein *et al.*, 1997, Benton *et al.*, 2001). Il est à noter toutefois que le site de rencontre de l'agent infectieux semble aussi avoir un rôle dans l'efficacité de la réponse hétéro-soustypique puisque il a été démontré qu'une infection s'initiant dans un site d'immunité mucoale induisait une plus forte immunité hétéro-soustypique (Nguyen *et al.*, 1999). Cette immunité croisée au niveau mucoale impliquerait les lymphocytes B (Tumpey *et al.*, 2001).

### **3 – Mesures préventives et thérapeutiques contre le virus de l'influenza**

#### **3.1 Un siècle de lutte contre le virus de l'influenza**

La nature virale de la grippe a été suspectée pour la première fois en 1918 suite à l'épidémie de grippe dite « espagnole » qui a décimé la population mondiale. Il faudra attendre les années 1930 pour que le virus de l'influenza soit isolé et cultivé (Potter 2001). Dès lors, plusieurs traitements, médicaments et vaccins, ont été développés afin de protéger les individus contre ce virus. Un premier vaccin inactivé a été mis en place dans les années 1940 et les premiers médicaments spécifiquement dirigés contre le virus de l'influenza ont été développés dans les années 1960 (Kamps, Hoffmann et Preiser 2006). La recherche et l'optimisation des traitements et des vaccins contre le virus de l'influenza se poursuivent en reflet de l'impact annuel de ce virus sur la population humaine.

#### **3.2 Médicaments et traitements pharmacologiques anti-influenza**

##### **a) Les bloqueurs de canaux ioniques**

Les premiers traitements anti-influenza ont été développés dans les années 1960. Il s'agit de composés chimiques de type adamantanes (e.g. Amantadine, Rimantadine) ayant la capacité de bloquer les canaux ioniques M2 du virus (Moss *et al.*, 2010). L'obstruction du canal ionique bloque l'acidification de la particule virale ce qui empêche l'entrée du génome viral dans la cellule hôte et donc l'initialisation de la réplication. Toutefois, rapidement des souches résistantes à ces composés sont apparues (Suzuki *et al.*, 2003).

##### **b) Les inhibiteurs de neuraminidase**

Une autre classe de médicaments efficace contre le virus influenza sont les inhibiteurs de neuraminidase (NAI) tels que le Zanamivir et l'Oseltamivir. Les NAI inhibent le détachement du virion depuis la cellule infectée (Moscona 2005, Moss *et al.*, 2010). Les NAI limitent donc la propagation du virus et diminuent la durée de l'infection mais ces médicaments ne bloquent pas

l'initiation de l'infection. Comme pour les adamantanes, des souches résistantes à ces médicaments ont émergé et ont diffusé de manière prépondérante dans la population (Dharan *et al.*, 2009).

### **c) Autres traitements en voie de développement**

De nombreux autres médicaments anti-influenza sont en développement et en essais cliniques. Certains visent à améliorer l'efficacité des traitements actuels par exemple en prolongeant la demi-vie des réactifs, alors que d'autres visent à inhiber d'autres voies de la réplication du virus tels que les inhibiteurs de ARN-polymérase ou l'utilisation de sialidases capables de cliver les récepteurs du virus influenza à la surface des cellules cibles (revu par (Moss *et al.*, 2010)). Une autre approche pour lutter contre les infections par le virus influenza est l'utilisation d'ARN interférants (RNAi). Les RNAi sont des séquences d'ARN spécifiquement dirigés contre une séquence choisie et qui, une fois fixés à l'ARNm cible, vont induire la dégradation de cet ARNm via des complexes protéiques cellulaires (Semizarov *et al.*, 2003). Le potentiel des RNAi comme traitement prophylactique contre le virus influenza a déjà été démontré dans des études chez la souris. L'utilisation de petits ARN interférants (ou small interfering RNA, siRNA) ciblés contre les gènes NP et PA du virus influenza permet d'améliorer la survie de souris et de diminuer la charge virale dans les poumons lors de défi avec des souches d'influenza de sous-type H1N1, H5N1 et H7N7 (Tompkins *et al.*, 2004). Cependant, l'utilisation d'RNAi à des fins thérapeutiques ou prophylactiques est confrontée à deux problèmes majeurs : la stabilité de l'ARN dans un milieu cellulaire et sa spécificité.

### **3.3 Les ribozymes et leur potentiel comme traitement prophylactique**

Les ribozymes sont des séquences d'ARN ayant des capacités catalytiques. Depuis leur découverte dans les années 1980, plusieurs types de ribozymes ont été caractérisés dans de nombreuses espèces tels que les ribozymes « hammer-head » que l'on retrouve dans des virus satellites de plantes, des salamandres et des criquets (Doherty et Doudna 2000). Tous les types de ribozymes caractérisés jusqu'à présent tels que les ribozymes de types Hairpin, Hammer-head et riboswitch, fonctionnent de manière comparable à la RNase A en ce qui concerne la réaction chimique de type ribonucléase (Cochrane et Strobel 2008). Dans le cas de la RNase A, un échange de proton entre deux histidines stabilisé par un groupement lysine entraîne le clivage de

la séquence d'ARN cible en deux fragments aux extrémités 5'hydroxyle et 2'3' cyclique phosphate. Dans le cas des ribozymes, la source d'avidité protonique est jouée par des ions métalliques divalents tels que le magnésium ( $Mg^{2+}$ ), le calcium ( $Ca^{2+}$ ), la manganèse ( $Mn^{2+}$ ) ou le plomb ( $Pb^{2+}$ ). Un ion entraîne le clivage de la séquence d'ARN et le second stabilise la réaction (Doherty et Doudna 2000). Les ribozymes possèdent un site de clivage ainsi qu'un site de reconnaissance spécifique par appariement nucléique. En ciblant les ribozymes contre des séquences spécifiques et conservés d'ARN d'agent pathogènes tels que les virus, les ribozymes pourraient être utilisés comme approches thérapeutiques.

Le virus de l'hépatite delta (HDV) est un virus satellite du virus de l'hépatite B (HBV). Il s'agit d'un virus à ARN circulaire de simple brin négatif. Le génome du HDV code pour un ribozyme (HDV-rz) d'environ 80 à 90 nucléotides qui intervient dans la réplication du génome viral (Been et Wickham 1997). Contrairement aux autres ribozymes caractérisés, le HDV-rz ne nécessite qu'un seul ion divalent lors de la réaction ribonucléique. Cet ion peut indifféremment être un  $Mg^{2+}$ , un  $Ca^{2+}$  ou un  $Mn^{2+}$  et la stabilisation chimique de la réaction est assurée par une cytosine en position 57 (C57) (Perrotta et Been 1990). Le HDV-rz constitue le seul ribozyme actuellement identifié capable de fonctionner dans l'environnement physiologique de cellule humaine. Sa conformation tridimensionnelle et sa capacité de clivage avec seulement un ion divalent lui permettent d'être actif et stable dans des conditions très variées de température, de pH et avec des concentrations d'ions métalliques très faibles et variées comparativement aux autres ribozymes. De plus le HDV-rz est le catalyseur naturel d'ARN le plus rapide identifié (revu par (Doherty et Doudna 2000).

Les HDV-rz, contrairement aux RNAi, démontrent une excellente stabilité dans des lignées cellulaires humaines (Levesque, Choufani et Perreault 2002). Un ribozyme modifié à partir du HDV avec un mécanisme de double spécificité sur un principe d'activation successif, le module « specific on/off adapter » (SOFA-HDV-rz), augmente la spécificité au point de devenir thérapeutiquement applicable (figure 3). L'évaluation de ces ribozymes comme agents prophylactiques contre le virus de l'influenza en collaboration avec le laboratoire des Dr Perreault et Bisailon constitue un des objectifs de cette thèse.

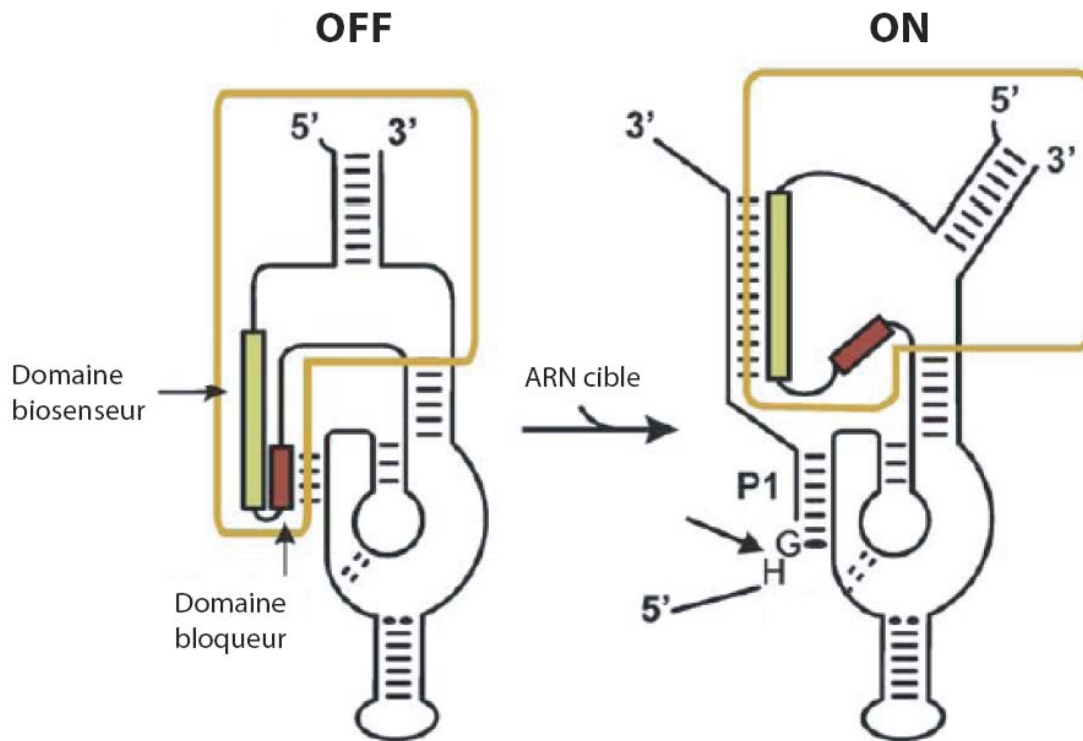


Figure 3 : Représentation schématique du ribozyme SOFA-HDV

Sous la forme « Off », le site catalytique du ribozyme est masqué par un domaine bloqueur (rouge). Lorsque le domaine biosenseur (vert) reconnaît sa séquence d'ARN spécifique (10-12 nucléotides), leur appariement va induire un changement conformationnel du ribozyme en position « On » où le site catalytique P1 est accessible. Si la seconde séquence d'ARN apparié correspond au site catalytique du ribozyme (6-7 nucléotides), le ribozyme clivera l'ARN cible.



### **3.4 Approches vaccinales**

Il existe deux approches vaccinales contre le virus de l'influenza, les vaccins inactivés et les vaccins vivants atténués. Ces vaccins sont trivalents, constitués de trois souches circulantes de virus influenza : une souche A/H1N1, une souche A/H3N2 et une souche d'influenza de type B (Wareing et Tannock 2001, Couch 2008). Les variants qui constituent les vaccins sont sélectionnés selon les recommandations de l'organisation mondiale de la santé (OMS) qui se réunit deux fois par an afin d'anticiper les futures souches circulantes (Barr *et al.*, 2010). La composition des vaccins est renouvelée chaque année pour s'adapter aux modifications du virus, mais en cas d'écart de prédiction entre les anticipations de l'OMS et les souches circulantes, ou en cas d'émergence de nouveaux variants ou de nouveaux sous-types, l'efficacité de la protection peut s'en trouver amoindrie (de Jong *et al.*, 2000, Carrat et Flahault 2007, Monto *et al.*, 2009).

#### **a) Les vaccins inactivés**

Les vaccins inactivés (IV) comprennent des protéines HA et NA purifiées. Les virus réassortants, produits dans des œufs de poule, sont constitués de la souche influenza A/Puerto Rico/8/34 (A/PR/8/34) auxquelles les gènes HA et NA ont été substitués pour ceux de la souche ciblée. Les virus réassortants sont amplifiés dans des œufs, puis inactivés avant purification des protéines HA et NA (Gerdil 2003). Ces protéines constituent la base des vaccins auxquels des adjuvants peuvent être ajoutés tel que le CpG, l'alum ou plus récemment le MF59 (Novartis<sup>®</sup>) et l'AS03 (GSK<sup>®</sup>) afin d'assurer une meilleure séroconversion (Morel *et al.*, 2011, van den Brand *et al.*, 2011) (Ansaldi *et al.*, 2009, McKee *et al.*, 2009). Les vaccins inactivés sont administrés par voie intramusculaire.

#### **b) Les vaccins vivant-atténués**

Le vaccin vivant-atténué contre le virus de l'influenza (LAIV) disponible actuellement est basé sur un virus atténué adapté pour se répliquer à des températures avoisinant les 32°C, limitant sa réplication au tractus respiratoire supérieur. Comme pour les vaccins inactivés, les virus qui constituent ces vaccins sont des virus réassortants, produits soit selon le même principe que pour les virus inactivés soit par génétique inverse mais à partir de la souche adaptée au froid (cold

adapted ou *ca*) *ca* A/Ann Arbor/6/60 auxquels les gènes HA et NA ont été substitués pour les gènes de la souche ciblée. Les virus sont amplifiés dans des œufs et purifiés mais ne sont pas inactivés (Wareing et Tannock 2001). Les vaccins LAIV sont administrés par voies intranasales sous la forme de pulvérisateurs nasaux.

### c) **Immunité induite par les vaccins**

Suite à une vaccination avec un vaccin LAIV, il y a production d'anticorps dirigés contre toutes les protéines virales, ergo production d'anticorps contre les protéines de l'enveloppe, HA et NA, ainsi que contre toutes les autres protéines structurales (Dowdle, Downie et Laver 1974, Rimmelzwaan et McElhaney 2008). De plus, la vaccination avec un vaccin LAIV engendre une réponse humorale mucoale et systémique alors que la vaccination avec un vaccin IV entraîne principalement une immunité humorale sérique avec uniquement une production d'anticorps anti-HA et anti-NA (Clements *et al.*, 1986, Belshe *et al.*, 2000, Ichinohe *et al.*, 2005). L'immunité induite suite à une vaccination par un vaccin LAIV est ainsi comparable à l'immunité induite suite à une infection par un virus influenza sauvage.

Les anticorps anti-HA comprennent des anticorps neutralisants et des anticorps inhibant l'hémagglutination (HAI). L'induction d'anticorps HAI est l'étalon-or recherché lors de vaccination contre le virus de l'influenza. Des niveaux d'anticorps HAI supérieurs à 1:40 ont été corrélés avec une protection efficace de l'individu (Potter et Oxford 1979, Cox et Subbarao 1999). Les anticorps anti-NA comprennent des anticorps capables de limiter la propagation du virus (Tamura, Webster et Ennis 1994, Marcelin *et al.*, 2011). Les anticorps dirigés contre les autres protéines structurales du virus n'empêchent pas l'infection mais participent à son élimination (Zhirnov *et al.*, 2007).

En ce qui a trait à la réponse immunitaire cellulaire, la vaccination avec un vaccin LAIV génère une réponse immunitaire impliquant les cellules T CD8<sup>+</sup> et T CD4<sup>+</sup> (Reiss et Schulman 1980, Powell *et al.*, 2007). Une corrélation a été établie entre l'efficacité de la réponse CTL induite suite à la vaccination et la diminution de la morbidité associée au virus d'influenza (Moskophidis et Kioussis 1998, Forrest *et al.*, 2008). Le rôle des cellules T CD4<sup>+</sup> suite à une vaccination dans l'élimination de l'infection virale a également été démontré (Eichelberger *et al.*, 1991).

Comme mentionné dans le chapitre 2.2, la protection croisée s'effectue par la reconnaissance d'épitopes conservées sur les protéines virales. Étant donné que seul le vaccin vivant-atténué peut engendrer des réponses immunitaires cellulaires (Hoft *et al.*, 2011) et humorales, à la fois muco-sale et systémique (Moldoveanu *et al.*, 1995, Nguyen *et al.*, 1999), dirigées contre l'ensemble de protéines virales, il est considéré que l'utilisation d'un vaccin LAIV est le plus prometteur pour induire une protection croisée (Clements *et al.*, 1986, Liang *et al.*, 1994, Benton *et al.*, 2001).

#### **d) Efficacité des vaccins LAIV et IV**

Des études cliniques ont démontré que les vaccins LAIV et les vaccins IV sont tous les deux capables de protéger contre une infection par le virus de l'influenza, toutefois l'efficacité de la protection est dépendante de l'âge des patients de l'étude, de la divergence génétique entre les souches vaccinales et circulantes ainsi que du passé immunologique du patient (Belshe *et al.*, 2000, Monto *et al.*, 2009, Hoft *et al.*, 2011). La comparaison de nombreux essais cliniques d'infection et vaccination chez des enfants et des adultes a démontré que chez les enfants de 6 mois à 17 ans, le vaccin LAIV est plus efficace à induire une protection que le vaccin IV (Ambrose, Levin et Belshe 2010). Cette efficacité comparative est accrue en cas de divergence du vaccin avec la souche circulante. En revanche, chez les adultes de 17 à 49 ans, le vaccin IV est généralement plus efficace à induire une protection immunitaire chez l'individu sauf, encore une fois, en cas de divergence entre les souches où là encore, c'est le vaccin LAIV qui est le plus efficace. Ces différences d'efficacité sont attribuées à l'immunité préexistante. Il est supposé que les vaccins LAIV sont plus efficaces comme premiers vaccins lorsqu'aucune immunité spécifique n'empêche le virus atténué d'initier l'infection. En revanche, si une immunité anti-influenza existe déjà, elle inhibe la réplication du virus atténué ce qui limite son immunogénicité et diminue l'efficacité du vaccin. Par contre, le vaccin IV serait plus efficace à stimuler l'immunité préexistante, d'où sa meilleure efficacité chez les adultes ayant un passé immunologique (Treanor *et al.*, 1999, Ambrose, Levin et Belshe 2010).

#### **e) Approches vaccinales en développement**

Plusieurs approches vaccinales sont en cours de développement afin d'améliorer ou d'optimiser l'étendue de la protection des vaccins contre les virus d'influenza. Une des approches consiste à administrer par voie intranasale ou intramusculaire des pseudoparticules virales (VLP)

contenant uniquement les protéines de l'enveloppe du virus HA, NA et M1 dans le but de mimer une infection virale. Il a été observé dans les modèles souris (Quan *et al.*, 2007) et furet (Mahmood *et al.*, 2008), que l'injection de VLP d'influenza induisait une réponse immunitaire humorale et cellulaire menant à une protection croisée homo-soustypique contre le virus de l'influenza et représente donc une alternative attrayante aux vaccins inactivés. Une autre approche vaccinale consiste en l'injection de plasmide (pDNA) codant pour différentes protéines d'influenza. L'utilisation de tels vaccins à ADN est déjà en application contre d'autres pathogènes (revue par Kutzler et Weiner 2008). Il a été démontré que l'injection de pDNA codant pour les protéines HA, NP et M2 du virus d'influenza pouvait induire une immunité protectrice chez le furet (Lalor *et al.*, 2008). Cette approche permet d'induire une immunité spécifique sans être dépendant du long processus de manufacture des vaccins traditionnels.

En ce qui concerne les virus vivant-atténués, l'atténuation du virus d'influenza via la protéine NS1 a également été envisagée. Il a ainsi été démontré que l'utilisation d'une souche d'influenza dont le génome codait pour une protéine NS1 tronquée était capable d'induire une immunité protectrice dans les modèles souris et furet (Mueller *et al.*, 2010, Zhou *et al.*, 2010). Cette approche représente donc une alternative aux LAIV actuels mais nul ne peut exclure le risque de réassortiments entre la souche vaccinale et une souche circulante.

Finalement, une autre approche vaccinale envisagée est l'utilisation de vecteurs viraux. Ces plateformes vaccinales permettent l'induction d'une réponse immunitaire similaire à celle développée lors d'une infection virale mais diminuent ou éliminent les risques associés. Les adénovirus ont été largement étudiés dans un contexte de vaccination contre le virus de l'influenza (revue par Vemula et Mittal 2010). Des adénovirus exprimant la protéine HA sont capables d'induire une immunité protectrice contre ce dernier chez la souris (Steitz *et al.*, 2010). Les poxvirus, des virus enveloppés à ADN double brin, tel que le virus vaccinia ont également été envisagés comme vecteur vaccinaux. Il a été démontré que des virus vaccinia exprimant la protéine NP pouvaient induire une immunité protectrice homo-soustypique et hétéro-soustypique dans le modèle souris (Altstein *et al.*, 2006). L'utilisation de virus de la souche modifiée non-répliquative Ankara du virus vaccinia (MVA) exprimant la protéine HA sont également capables d'induire une immunité protectrice lors d'un défi avec des souches hautement pathogènes d'influenza dans les modèles furet et macaque (Kreijtz *et al.*, 2009, Kreijtz *et al.*, 2010). L'utilisation de vecteurs viraux représente donc une voie de développement attrayante dans la recherche de nouvelles techniques de vaccination contre le virus de l'influenza.

## 4 – Les morbillivirus comme vecteur viraux vaccinaux

### 4.1 Phylogénie

Le genre *Morbillivirus* fait partie de la famille *Paramyxoviridae* et de l'ordre *Mononegavirales*. Il s'agit de virus enveloppés à ARN non-segmenté et de polarité négative (Griffin 2001). Dans le genre *Morbillivirus*, on retrouve le virus de la rougeole (measles virus, MeV) qui infecte les humains et certaines espèces de primates ainsi que le virus de la maladie de Carré (canine distemper virus, CDV) qui infecte une large variété d'espèces appartenant à l'ordre des *Carnivora*. Le virus de la peste des petits ruminants, le virus de la peste bovine ainsi que des morbillivirus spécifiques aux mammifères aquatiques tels que le dolphin morbillivirus, le porpoise morbillivirus et le phocine distemper virus font partie du genre. L'analyse génomique des morbillivirus semble indiquer que l'ancêtre commun de ces virus serait apparenté au virus de la peste bovine (Norrby *et al.*, 1985), qui a été éradiqué en 2010 (FAO media center May 2011) (figure 4). L'archétype morbillivirale serait à l'origine du CDV et MeV suite à la domestication des cheptels et à leur proximité avec l'homme (Norrby *et al.*, 1985, Griffin 2001). Seul les virus de la rougeole et de la maladie de Carré seront discutés dans cette thèse.

L'ARN génomique des morbillivirus est d'environ 16 000 nucléotides et est encapsidé par des nucléoprotéines (N) qui forment avec les protéines de la polymérase (L) et des phosphoprotéines (P) des complexes ribonucléoprotéiques (RNP) (Griffin 2001, Longhi 2009, Liljeroos *et al.*, 2011). Les virions ont une structure pléomorphique dont la taille varie entre 120 et plus de 300 nm (Nakai et Imagawa 1969). L'enveloppe virale est constituée d'une bicouche lipidique consolidée par des protéines de la matrice (M) sur laquelle sont ancrés des dimères de protéines d'hémagglutination (H) et des trimères de protéines de fusion (F) (Griffin 2001).

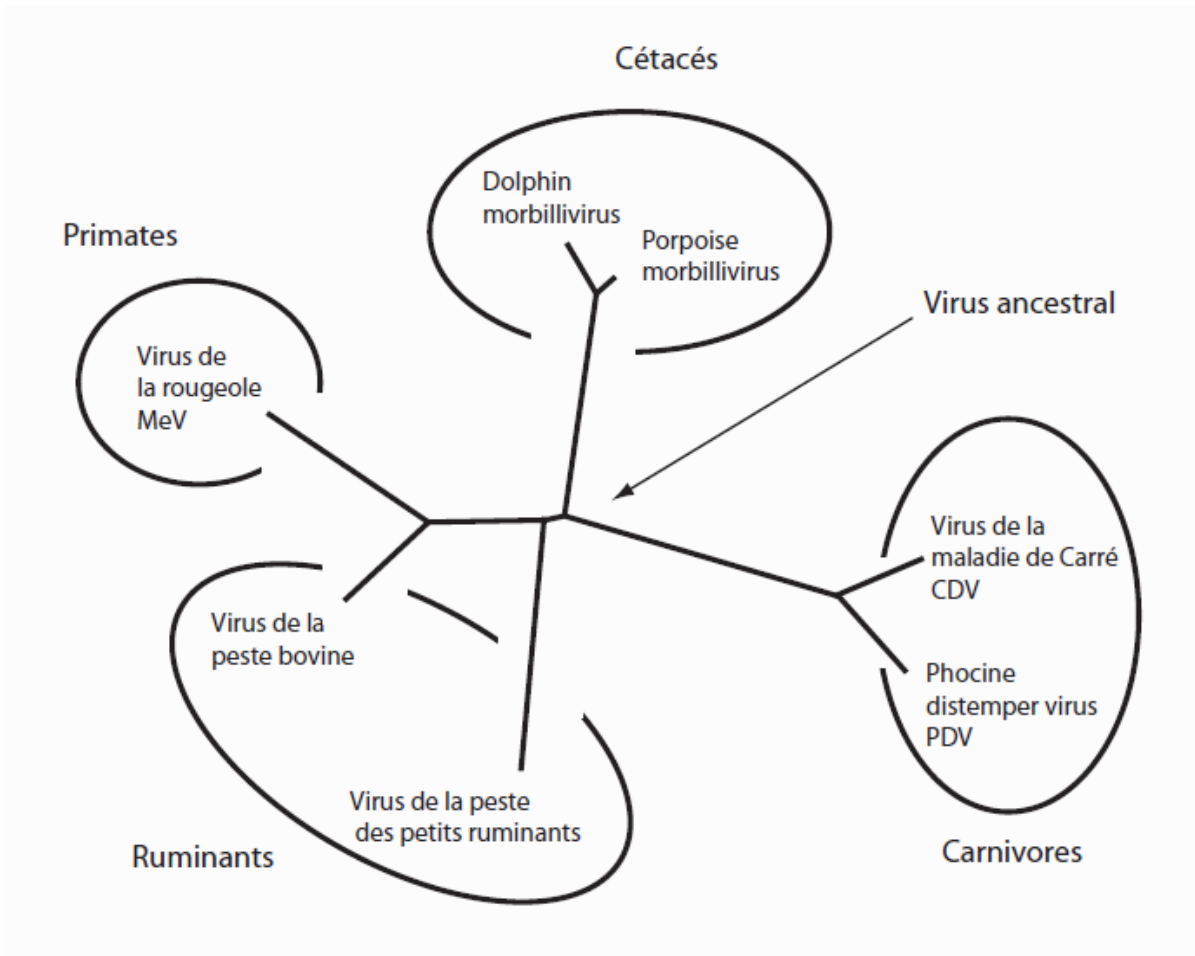


Figure 4 : Arbre phylogénique des morbillivirus (d'après Barrett 1999)

## 4.2 Structure du virion et rôle des protéines virales

Le génome morbilliviral contient six gènes codant pour huit protéines (figure 5). La protéine N englobe l'ARN viral génomique. Elle fait partie du complexe RNP et intervient dans la régulation des phases de répllication et de transcription (Plumet, Duprex et Gerlier 2005). La protéine L est l'ARN-polymérase-ARN-dépendante. Elle permet, conjointement avec la protéine P, la transcription des ARNm et la répllication du génome viral (Griffin 2001). L'ARNm du gène P permet également la transcription de deux protéines accessoires, V et C. La protéine C est transcrite à partir d'un second cadre de lecture, alors que la protéine V est transcrite sur le même cadre de lecture que la protéine P mais son ARN messenger subit un procédé d'édition de l'ARN qui consiste en l'ajout d'un guanoside en position 751 dans le cas du MeV (Cattaneo *et al.*, 1989). Les protéines C et V participent de manière complémentaire à l'inhibition de la réponse immunitaire de l'hôte et au contrôle de la synthèse d'ARN viraux (von Messling, Svitek et Cattaneo 2006, Gerlier et Valentin 2009).

La protéine M est associée à la membrane interne des cellules infectées et entraîne le bourgeonnement des particules virales. Elle interagit également avec la protéine N et l'interaction du complexe RNP avec la protéine M inhibe la transcription du génome virale (Suryanarayana *et al.*, 1994). La protéine F est une glycoprotéine transmembranaire de type I trimérique. Elle est responsable de la fusion des membranes lors de l'entrée du virus dans la cellule ainsi que de la fusion des cellules avoisinantes. Elle est synthétisée sous une forme précurseur F0 qui est clivée dans le trans-golgi par une protéase de type subtilisine en sous unités F1 et F2 reliées par un pont disulfure. Seule la forme clivée est active et un clivage aberrant de F0 entraîne une abolition de l'activité de fusion des membranes (Alkhatib *et al.*, 1994). La protéine H est une glycoprotéine transmembranaire de type II homodimérique responsable de la fixation du virus aux récepteurs cellulaires (Palese et Shaw 2007).

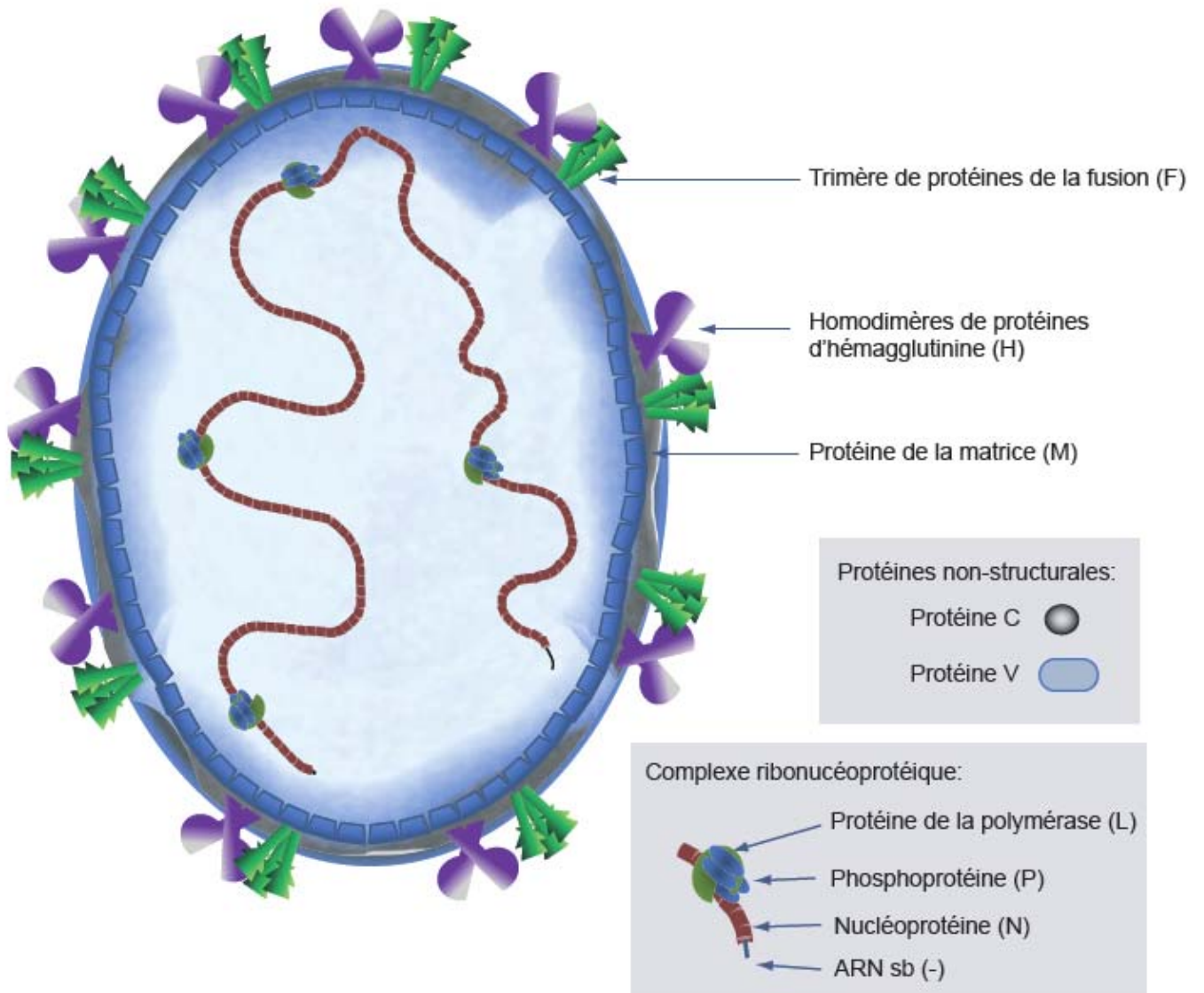


Figure 5 : Représentation schématique d'un morbillivirus



### 4.3 Cycle de réplication des morbillivirus

Les morbillivirus infectent les cellules mononucléaires du sang périphérique par l'intermédiaire du récepteur SLAM (CD150) exprimé à la surface des lymphocytes et monocytes activés (Tatsuo, Ono et Yanagi 2001). Récemment, la nectine-4 a été identifiée comme récepteur du virus de la rougeole dans les tissus épithéliaux laissant supposer qu'un récepteur similaire existe pour le CDV (Muhlebach *et al.*, 2011, Noyce *et al.*, 2011). La liaison de la protéine H à son récepteur à la surface de la cellule entraîne un changement conformationnel qui active la fusion des membranes virales et cellulaires médiées par la protéine F (Smith *et al.*, 2009). Une fois la fusion des membranes établie, le complexe RNP est libéré dans le cytoplasme de la cellule où aura lieu la transcription et la réplication du génome viral dès son entrée. Le complexe de polymérase P-L va entamer la transcription des ARNm viraux selon un gradient de transcription initié à l'extrémité 3' du brin d'ARN(-) (Poch *et al.*, 1990, Rima et Duprex 2009). Il en résulte une forte production de protéines N codées par le gène situé en amont du génome, et une quantité moindre de protéine L en aval (Griffin 2001) (figure 6). Le passage de l'activité de transcription à celle de réplication est dépendant de la concentration des protéines N dans le cytoplasme (Plumet, Duprex et Gerlier 2005). Une concentration élevée de protéines N favorisera ainsi la réplication et une faible concentration favorisera la transcription (Plumet, Duprex et Gerlier 2005). Les protéines N se lient toutes les six bases d'acides nucléiques. Cette particularité des paramyxovirus, nommée règle de six, fait en sorte que le génome viral doit contenir un nombre total de nucléotides multiples de six afin d'assurer une réplication efficace (Kolakofsky *et al.*, 1998). Les protéines de l'enveloppe, H et F, sont transportées à la membrane plasmique de la cellule où elles vont interagir avec la protéine M (Stricker, Mottet et Roux 1994). L'interaction de complexes RNP avec la protéine M va induire le bourgeonnement des particules virales à la surface de la cellule et la libération des virus dans l'environnement de la cellule infectée (Runkler *et al.*, 2007).

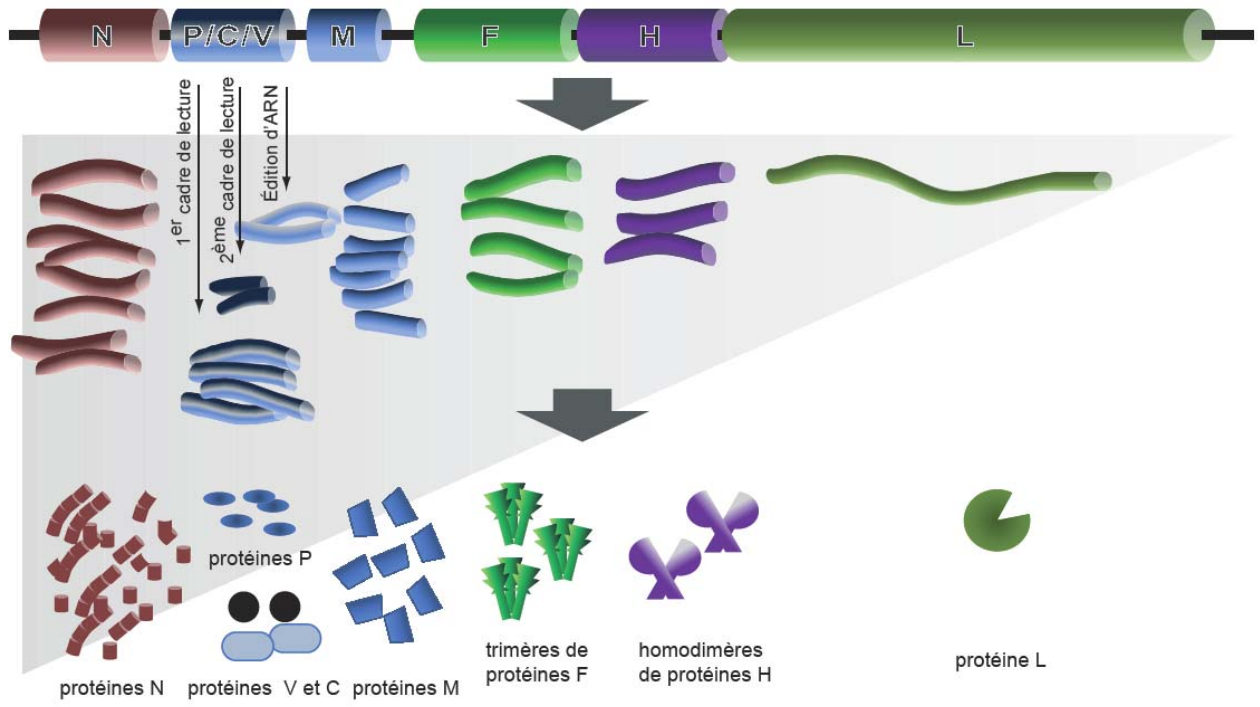


Figure 6 : Gradient de transcription des morbillivirus

#### 4.4 Pathogénèse des morbillivirus

Les morbillivirus sont transmis d'un sujet à l'autre par exhalation ou par contact avec les excréments (Moss et Griffin 2006). Comme pour le MeV, les premières cellules cibles du CDV sont les cellules immunitaires des amygdales et des cellules lymphatiques dans le tractus respiratoire supérieur. Le virus est par la suite disséminé par les PBMC circulants infectés dans les différents organes lymphoïdes (Esolen *et al.*, 1993, von Messling, Milosevic et Cattaneo 2004), et se retrouve après 2 à 4 jours dans les ganglions lymphatiques, les plaques de Peyer du petit intestin et la pulpe blanche de la rate (von Messling, Milosevic et Cattaneo 2004). Après une semaine, le virus a complètement compromis l'ensemble du système immunitaire et s'étend progressivement aux différents tissus épithéliaux. Le virus va se répliquer dans les tissus épithéliaux infectés tels que la peau (exanthèmes), les muqueuses nasopharyngées, les parois épithéliales des poumons, de l'intestin et de la vessie d'où il pourra être relargué dans le lumen et transmis à un nouvel hôte (von Messling, Milosevic et Cattaneo 2004, Beineke *et al.*, 2008, Takeda 2008). L'affaiblissement du système immunitaire et la perte d'intégrité des barrières épithéliales vont favoriser l'apparition d'infections secondaires. Ainsi, l'infection des épithéliums coïncide avec le développement des signes cliniques tels que fièvre, diarrhée, conjonctivite et pneumonie (Hussey et Clements 1996, Moss et Griffin 2006). Si l'individu ne parvient pas à contrôler l'infection ou si la réponse immunitaire est insuffisante, l'individu décède entre deux et cinq semaines suivant l'infection, principalement par suite des complications reliées aux infections secondaires. Si l'hôte parvient à contrôler l'infection, la phase symptomatique dure de une à deux semaines et le rétablissement corrèle avec le développement d'une réponse immunitaire contre le virus (figure 7).

Des infections morbillivirales peuvent mener à des complications neurologiques. Dans tous ces cas, le virus établit l'infection dans le système nerveux central pendant la phase aiguë de l'infection systémique. Ceci entraîne soit une encéphalite aiguë, qui est la principale raison de décès chez des carnivores sauvages atteints du CDV, soit une persistance à moyen ou long terme, qui est observée chez des chiens après une infection par le CDV et cela des semaines ou des mois suite au rétablissement (Summers, Greisen et Appel 1984, Vandeveld et Zurbriggen 2005). Dans le cas de la rougeole, l'incidence de complications neurologiques est de un pour mille cas en ce qui concerne les phases aiguës et de un pour un million en ce qui concerne les cas de complications à long terme (Moss et Griffin 2006).

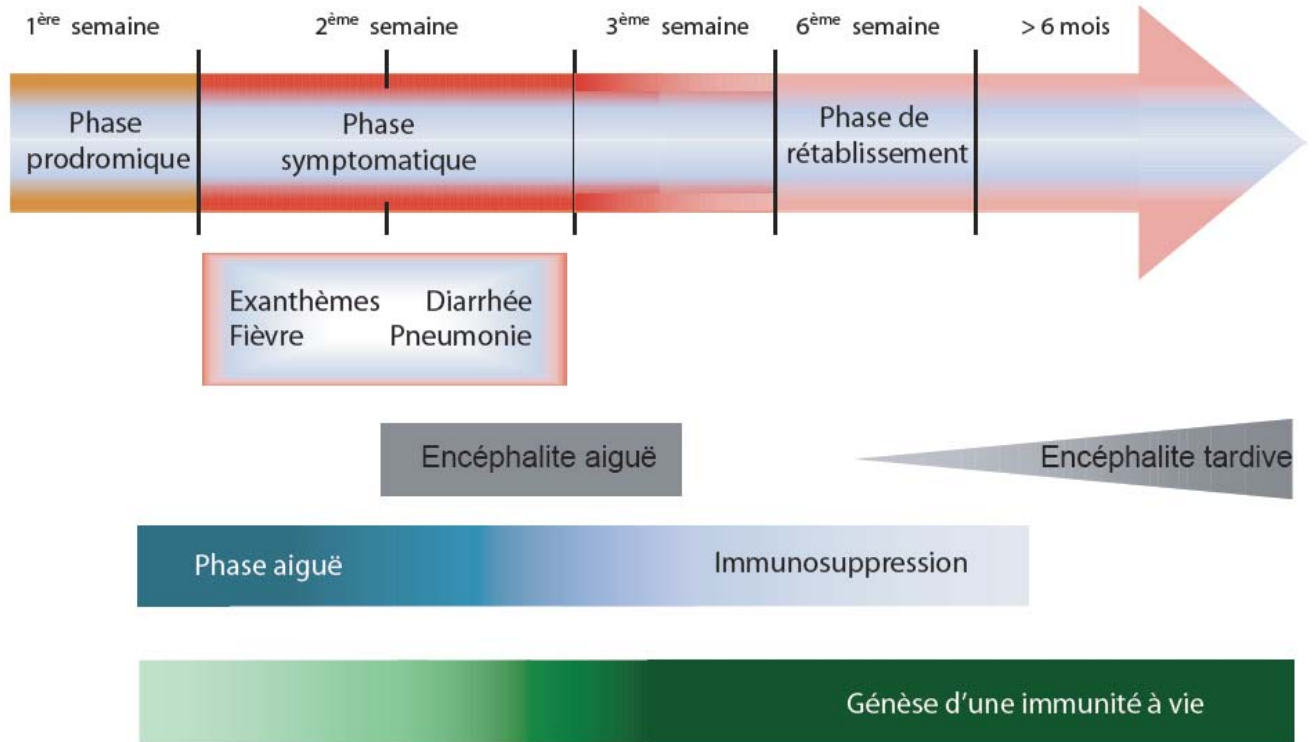


Figure 7 : Chronologie de la pathogenèse des morbillivirus

#### 4.5 Réponses immunitaires induites par les morbillivirus

Les cellules immunitaires exprimant le récepteur SLAM tels que les lymphocytes et les monocytes, sont les premières cibles du virus (Moss, Ota et Griffin 2004). De ce fait, l'infection aiguë causée par les morbillivirus s'accompagne d'une immunosuppression sévère caractérisée par une leucopénie et une perte de l'activité proliférative des lymphocytes (Kauffman, Bergman et O'Connor 1982, von Messling *et al.*, 2003, Avota, Gassert et Schneider-Schaulies 2010). Toutefois, outre les cas d'infection du système nerveux central et malgré le fait que l'infection provoque une immunosuppression sévère de l'hôte, les survivants développent une réponse immunitaire adaptative qui leur permet d'éliminer l'agent pathogène et leur confère une immunité à vie contre ce dernier.

##### a) Réponse immunitaire innée

Suite à l'infection, une induction de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6 et les interférons de type I est observée. Celle-ci mène au recrutement des différents acteurs de l'immunité. Pour contrer cette activation de la réponse immunitaire innée, les morbillivirus ont la capacité de bloquer les voies de signalisation cellulaire de la cascade signalétique pro-inflammatoire par l'intermédiaire de leurs protéines V et C (Gerlier et Valentin 2009). Si malgré l'inhibition de la cascade signalétique, la réponse immunitaire innée parvient à contenir l'infection, la réponse immunitaire adaptative débutera et pourra participer à l'élimination du virus.

##### b) Réponse immunitaire adaptative

La réponse immunitaire cellulaire adaptative joue un rôle prépondérant dans l'élimination de l'infection. Des macaques déplétés en lymphocytes T CD8<sup>+</sup> puis infectés avec une souche pathogène du MeV développent une maladie plus sévère avec une plus forte virémie (Permar *et al.*, 2003). L'apparition de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques circulant coïncide avec le développement des exanthèmes et donc avec la dissémination du virus dans les tissus épithéliaux et sa transmission (Nanan, Carstens et Kreth 1995). La phase de convalescence est caractérisée par une prévalence de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de type Th2 (Griffin et Ward 1993). Les premiers anticorps (IgM) dirigés contre le virus sont détectés à partir de 72 h suivant l'infection et

perdurent au-delà de la troisième semaine. L'apparition d'anticorps de type IgG suit cette dernière avec un pic de concentration autour des 3 - 4 mois (Helfand *et al.*, 1999). La principale cible des anticorps neutralisants sont les glycoprotéines H et F (Malvoisin et Wild 1990). L'immunité adaptative humorale et cellulaire induite par l'infection permet d'assurer une immunité à vie notamment due à la faible variabilité qui existe entre les différents géotypes de virus (Bellini et Rota 1998).

#### **4.6 Vaccins contre les morbillivirus**

Il existe des vaccins contre les principaux morbillivirus, ce sont essentiellement des vaccins de types vivants-atténués (Montali *et al.*, 1983, Baron *et al.*, 2005, Uzicanin et Zimmerman 2011). Dans le cas du MeV, les origines du vaccin encore utilisé de nos jours remontent à 1954 lorsque John Enders et Thomas Peebles parviennent à isoler et cultiver du virus à partir d'un échantillon prélevé chez un enfant, David Edmonston, lors d'une épidémie de rougeole (Enders et Peebles 1954). Après de nombreux passages successifs dans des cultures de cellules de reins, des cellules amniotiques, des œufs puis des lignées cellulaires d'embryon de poulet, le virus atténué obtenu, nommé souche Edmonston, fut testé comme vaccin (Katz, Enders et Holloway 1960). Lorsque injecté par voie intramusculaire, le virus est non-pathogénique mais reste capable de stimuler l'immunité cellulaire, d'induire une séroconversion et la génération d'anticorps neutralisants à un niveau protecteur (Katz, Enders et Holloway 1960, Katz 2009). Des travaux sur la continuité de l'équipe de John Enders ont permis d'obtenir la souche Schwartz en 1965 et Moraten en 1968 par passage successif sur des cultures cellulaires à 32°C du virus de la souche Edmonston (Katz 2009). La souche Moraten est encore utilisée aujourd'hui dans les procédés de vaccination.

Afin de permettre une meilleure diffusion des vaccins qui jusqu'alors nécessitaient des conditions de conservation et de réfrigération particulières et afin de prévenir les risques éventuels de réversion des virus atténués, des vaccins inactivés ont été produits. À partir de 1960, plusieurs groupes ont produit des vaccins inactivés à la formaline ou par la chaleur à partir de la souche vaccinale Edmonston (Solovyev et Lozovskaya 1961, Katz 2009). Toutefois, des cas de rougeoles atypiques sont apparus chez les individus vaccinés avec une incidence variant entre 15 et 60% selon les études épidémiologiques (revue par Polack 2007). Ces cas apparaissaient jusqu'à 16 ans après la vaccination lors d'une infection naturelle par le MeV et se caractérisaient par une fièvre plus élevée et plus longue ainsi que des lésions dermiques plus sévères comparativement aux cas de rougeoles communes. Bien que les causes soient peu connues, ces cas de rougeoles atypiques

étaient attribués à une réponse immunitaire cellulaire induite anormale, une faible réponse immunitaire mucosale induite ou encore une faible induction d'anticorps dirigés contre la protéine virale F (Griffin et Pan 2009). Suite à ces observations, l'utilisation de vaccins inactivés de la rougeole a été abandonnée dans les années 1970.

En ce qui concerne le vaccin contre le CDV, un isolat obtenu à partir de tissus de renards infectés a permis, après passages successifs dans des furets puis des œufs de poule, d'obtenir le premier virus atténué (Green et Stulberg 1946). Le virus de la souche Onderstepoort est le principal vaccin actuellement utilisé. Toutefois, bien que le virus soit suffisamment atténué et immunogène pour un usage commun chez le chien, il reste possiblement pathogène chez certaines espèces de carnivores hautement susceptibles à l'infection tels que les furets, les visons, les renards et les pandas roux (Barrett 1999).

Afin de faire face à la haute susceptibilité de certaines espèces aux CDV, des vaccins de type inactivé ont été produits. Cependant les premières études avec des vaccins inactivés du CDV n'ont pas permis d'observer de séroconversion suffisante pour être protectrice (Montali *et al.*, 1983, Appel *et al.*, 1984). Une nouvelle approche vaccinale a donc été mise en place utilisant des virus recombinants, le canarypox ou le virus vaccinia, comme vecteurs d'expressions de la protéine H et F du CDV (Stephensen *et al.*, 1997, Welter *et al.*, 1999). Bien que le vaccin recombinant canarypox-CDV soit utilisé actuellement (Purevax®), l'efficacité sur le long terme de cette plateforme vaccinale est mise en doute car elle semble nécessiter des ré-immunisations difficilement conciliables avec des programmes de vaccinations d'espèces sauvages (Barrett 1999).

Une autre approche vaccinale consiste à exploiter la proximité phylogénique du virus du CDV et du MeV ainsi que la réponse immunitaire croisée naturelle qui existe entre ces deux virus (Beauverger, Buckland et Wild 1993). Cependant, bien que cette méthode ait été utilisée dans le contexte de vaccination de chiots pour outre-passer l'immunité maternelle préexistante, cette immunisation ne suffit pas pour protéger l'animal adulte lors d'un défi (Appel *et al.*, 1984).

#### **4.7 Les morbillivirus comme vecteur thérapeutique oncolytique et comme vaccin multivalent**

Le potentiel oncolytique des morbillivirus a été observé pour la première fois dans les années 1970 lors des campagnes de vaccination contre la rougeole. Il a été rapporté des

diminutions de cas de lymphomes de Hodgkin ou de Burkitt en conséquence d'une vaccination contre le MeV (revue par Msaouel, Dispenzieri et Galanis 2009). Récemment, des essais cliniques en phase 1 ont mis en évidence le potentiel de morbillivirus comme plateforme oncolytique. Notamment, un virus recombinant de la souche vaccinale de la MeV exprimant l'antigène carcino-embryonique (CEA), une glycoprotéine de surface impliquée dans la dissémination des tumeurs et associée à de nombreux types de cancer, le MeV-CEA permettait de contenir la propagation de cancers ovariens chez des patientes affectées (Galanis *et al.*, 2010). Dans une même optique de traitement anti-cancéreux, les morbillivirus peuvent être également utilisés comme vecteur d'expressions dirigés contre les cellules tumorales. À titre d'exemple, des essais cliniques sont en cours afin d'évaluer le potentiel du MeV comme vecteurs afin d'induire dans les cellules tumorales l'expression du symporteur sodium-iodide (NIS). L'expression induite de NIS dans les cellules tumorales permettraient d'optimiser les traitements anticancéreux via l'utilisation d'iode radiomarquée <sup>131</sup>[I] (revue par Msaouel, Dispenzieri et Galanis 2009).

L'aspect sécuritaire des vaccins disponibles contre les morbillivirus ainsi que la capacité des virus atténués à induire une immunité à long terme en font un choix de prédilection pour le développement de vaccin bivalents. Ces capacités sont particulièrement intéressantes pour les virus pour lesquels un vaccin atténué est difficilement envisageable tel que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou les virus d'influenza aviaires hautement pathogènes tels que les H5N1. Plusieurs études ont démontré la possibilité d'utiliser le MeV pour induire l'expression de glycoprotéines exogènes tels que la protéine de l'enveloppe du VIH (Lorin *et al.*, 2004), ou son équivalent chez le singe, le VIS (Wang *et al.*, 2001, Zuniga *et al.*, 2007), la glycoprotéine de surface du virus du Nil occidentale (VNO) (Despres *et al.*, 2005), ou VHB (Singh, Cattaneo et Billeter 1999). L'utilisation de ces virus recombinants permet l'induction d'une réponse immunitaire protectrice contre l'antigène intégré. Il a été démontré qu'une immunisation avec un MeV recombinant contenant le gène codant pour la glycoprotéine E du WNV entre ses gènes P et M (P-M) pouvait induire la génération à un niveau protecteur d'anticorps neutralisants dans des souris exprimant le récepteur CD46 humain (souris CD46) (Despres *et al.*, 2005).

De manière similaire, l'immunisation de souris CD46 avec un MeV recombinant contenant le gène codant pour l'antigène de surface du VHB (VHBsag) en P - M permet la génération d'une réponse humorale dirigée contre le MeV et le VHBsag chez ses souris (Singh, Cattaneo et Billeter 1999). Un MeV recombinant contenant deux exogènes distincts VHBsag et VHBcag intégrés



respectivement en position P-M et entre les gènes H et L (H-L) assure l'expression des protéines du VHB sans que cela ne nuise à la réplication du virus recombinant. De plus, ses insertions sont stables même après plusieurs passages (Singh, Cattaneo et Billeter 1999). L'immunogénicité du virus recombinant est maintenue lorsque les exogènes sont intégrés aux positions P-M et H-L (Zuniga *et al.*, 2007).

Finalement, il a été démontré avec un virus recombinant du MeV exprimant des gènes codant pour des protéines du VIH en positions P-M ou H-L, qu'il était possible d'induire une immunité humorale et cellulaire contre le MeV et le VIH chez des souris CD46 et chez des macaques (Lorin *et al.*, 2004). Cette immunité induite peut être générée même si l'animal possède déjà une immunité contre le virus de la rougeole (Lorin *et al.*, 2004). Ceci démontre qu'un virus recombinant peut induire la genèse d'une immunité dirigée contre son exogène en outre-passant l'immunité préexistante.

#### **4.8 Modèles animaux d'infections morbillivirales**

Tel que mentionné précédemment, le MeV infecte uniquement les humains et certaines espèces de primates, ce qui limite l'étude directe de sa pathogenèse. Les primates non-humains tels que les macaques rhésus (*Macaca mulatta*) et cynomolgus (*Macaca fascicularis*) représentent donc le premier modèle d'étude du MeV (El Mubarak *et al.*, 2007). Le virus de la rougeole se réplique également dans le tractus respiratoire et, selon les souches de virus, dans les organes lymphoïdes du sigmodon ou « cotton rat » (*Sigmodon hispidus*) (revue par Niewiesk 2009). De part sa petite taille et sa capacité à se reproduire rapidement, l'utilisation des sigmodons comme modèle animal de la rougeole permet l'étude des drogues antivirales, l'interaction des vaccins avec l'immunité maternelle et l'étude des infections secondaires. Outre les singes et les sigmodons, les souris transgéniques exprimant le CD46 humains ont permis l'étude des premières plateformes vaccinales de la rougeole (revue par Sellin et Horvat 2009).

Contrairement au virus de la rougeole, le CDV possède un spectre d'hôtes naturels très large (Barrett 1999). Parmi ceux-ci, le chien (*Canis canis*) et le furet ont été largement utilisés. Les deux espèces développent des signes cliniques comparables à ceux que l'on retrouve chez l'humain tels que la fièvre, les exanthèmes, l'immunosuppression et les infections gastro-intestinal et pulmonaire (Barrett 1999, von Messling *et al.*, 2003). De plus, le furet présente une forte susceptibilité au CDV et une infection avec une souche sauvage du CDV lui est létale (revue

par Pillet, Svitek et von Messling 2009). Le développement de nouveaux outils de détection de la réponse immunitaire dans le modèle furet reste nécessaire à l'amélioration des études vaccinales dans ce modèle. Toutefois, de part les similarités des signes cliniques et la forte susceptibilité du furet au CDV, celui-ci représente un bon modèle d'étude des approches vaccinales utilisant des vecteurs morbilliviraux.

## 5 – Problématique, hypothèses et objectifs de travail

Chaque année la grippe est responsable d'environ 325,000 décès et engendre des pertes économiques élevées, malgré la disponibilité de traitements antigrippaux et de programme de vaccination. Cela s'explique principalement par l'apparition de souches résistantes aux traitements et par les fréquents changements antigéniques à la surface du virus. Ces problématiques soulèvent d'une part la nécessité de développer de nouveaux traitements capables de limiter la réplication du virus quelque soit la souche rencontrée, et d'autre part la nécessité de produire des vaccins qui protègent contre une plus grande variété de souches.

Les vaccins inactivés et vivants atténués contre le virus de l'influenza actuellement disponibles sont basés sur l'induction d'une réponse immunitaire spécifiquement dirigée contre les glycoprotéines HA et NA de la souche épidémique prédite. Bien que ces vaccins soient efficaces et capables d'induire une protection contre la souche ciblée ou ses proches variants, ces vaccins présentent des limitations importantes : les vaccins inactivés (IV) induisent une immunité essentiellement humorale sérique contre les protéines HA et NA. Ils ont ainsi une efficacité limitée en cas de changement antigénique majeur de la souche circulante ou en cas d'émergence d'un nouveau sous-type. Les vaccins vivant-atténués (LAIV) sont capables d'induire une protection à plus large spectre, humoral et cellulaire, mucoale et sérique. Toutefois, leur efficacité à stimuler une immunité est amoindrie selon le passé immunitaire de l'hôte, le LAIV est moins efficace chez les individus ayant déjà été vaccinés ou infectés par le virus de l'influenza. L'utilisation des vecteurs vaccinaux viraux, spécifiquement des morbillivirus, représente une alternative intéressante à ces vaccins. Une infection par un morbillivirus entraîne la genèse d'une immunité cellulaire et humorale, sérique et mucoale. De plus, des vaccins contre les morbillivirus sont disponibles, ils sont sécuritaires et les réponses immunitaires induites sont bien caractérisées.

Dans le cadre de mes études de doctorat, nous avons émis les hypothèses suivantes :

a) l'utilisation de ribozymes ciblant des régions conservées dans le génome d'influenza administrés comme prophylaxie permettrait de limiter la propagation du virus d'influenza indépendamment de la souche

b) l'utilisation d'un morbillivirus recombinant comme plateforme vaccinale contre le virus de l'influenza permettrait d'assurer une immunité humorale et cellulaire à large spectre contre ce virus.

Pour tester ma première hypothèse, j'ai, en collaboration avec les laboratoires des Drs Bisailon et Perreault de l'université de Sherbrooke, évalué le potentiel prophylactique de ribozymes à limiter la réplication du virus de l'influenza. Les candidats les plus prometteurs *in vitro* ont ensuite été évalués *in vivo* dans le modèle souris.

Pour évaluer ma deuxième hypothèse, j'ai, dans un premier temps, mis en place un protocole d'immunisation et de défi utilisant un vecteur morbilliviral chez le furet lors d'une étude visant à évaluer l'efficacité d'un candidat vaccinal contre le virus de la maladie de Carré (canine distemper virus, CDV). Par la suite, j'ai établi un protocole d'évaluation de la réponse immunitaire cellulaire chez le furet par un test d'ELISpot pour l'interféron gamma. J'ai finalement construit des virus CDV recombinants à partir de la souche vaccinale Onderstepoort, exprimant des gènes de la nucléoprotéine et/ou de la protéine de hémagglutinine d'une souche H1N1 saisonnière du virus d'influenza. L'expression des protéines d'influenza par les virus recombinants a été démontrée *in vitro*.

## **CHAPITRE 2**

### **PUBLICATIONS**

**Publication no.1**

**A Novel Ribozyme-Based Prophylaxis Inhibits Influenza A Virus Replication and Protects from Severe Disease**

**Julie Motard<sup>a</sup>, Ronan Rouxel<sup>b</sup>, Alexandra Paun<sup>a</sup>, Veronika von Messling<sup>b</sup>, Martin Bisailon<sup>a,\*</sup> and Jean-Pierre Perreault<sup>a,\*</sup>**

<sup>a</sup> Département de biochimie, RNA group/Groupe ARN, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada;

<sup>b</sup> INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, Canada.

Received 6 July 2011/ Accepted 13 October 2011

PLoS ONE

Nov 2011, Vol. 6, issue 11

Dans cet article, j'ai effectué les analyses impliquant l'utilisation du virus influenza *in vitro* et *in vivo*. J'ai mis en place les protocoles de transfection *in vitro*, les tests d'évaluation de l'infection *in vitro* ainsi que les protocoles d'évaluation de l'infection dans les souris et j'ai effectué les expériences *in vivo*.

FOOTNOTES

\*Co-Corresponding authors:

Jean-Pierre Perreault PhD

Email : [Jean-Pierre.Perreault@USherbrooke.ca](mailto:Jean-Pierre.Perreault@USherbrooke.ca)

Phone : (819) 564-5310

Fax : (819) 564-5340

Martin Bisailon, PhD

Email: [Martin.Bisailon@USherbrooke.ca](mailto:Martin.Bisailon@USherbrooke.ca)

Phone : (819) 564-5287

Fax : (819) 564-5340

## RÉSUMÉ

Les épidémies saisonnières et les pandémies occasionnelles de virus influenza A représentent un enjeu sanitaire mondial. L'instabilité génétique du virus lui permet rapidement d'échapper au système immunitaire de l'hôte et de développer des résistances aux antiviraux. Il est donc urgent de développer des approches innovantes pour traiter les nouvelles souches émergentes. Basé sur l'alignement des séquences de l'ensemble des sous-types du virus d'influenza connus pour infecter l'humain, nous avons identifié des régions d'acides nucléiques conservées entre ces différentes populations d'influenza A. Nous avons par la suite développé comme outils thérapeutiques des ribozymes SOFA-HDV capables de reconnaître ses régions conservées et pouvant cliver de manière catalytique les ARN messagers viraux ciblés. Les ribozymes les plus prometteurs ont été sélectionnés par un criblage *in silico* puis leurs efficacités ont été évaluées lors de test de clivage *in vitro*. Une caractérisation plus approfondie de leur efficacité antivirale en culture cellulaire et lors d'expériences animales chez la souris nous ont conduit progressivement à l'identification de combinaisons de ribozymes SOFA-HDV aux potentiels prophylactiques, démontrant l'efficacité de ce principe et le potentiel de cette nouvelle stratégie dans le développement d'antiviraux contre les virus aux génomes hautement variables.

## **ABSTRACT**

Influenza A virus seasonal outbreaks and occasional pandemics represent a global health threat. The high genetic instability of this virus permits rapid escape from the host immune system and emergence of resistance to antivirals. There is thus an urgent need to develop novel approaches for efficient treatment of newly emerging strains. Based on a sequence alignment of representatives from every subtype known to infect humans, we identified nucleic acid regions that are conserved amongst these influenza A populations. We then engineered SOFA-HDV-Ribozymes as therapeutic tools recognizing these conserved regions to catalytically cleave the corresponding viral mRNA targets. The most promising ribozymes were chosen based on an initial *in silico* screening, and their efficacy was assessed using *in vitro* cleavage assays. Further characterization of their antiviral effect in cell culture and in mice led to the gradual identification of prophylactic SOFA-HDV-Ribozyme combinations, providing proof-of-principle for the potential of this novel strategy to develop antivirals against genetically highly variable viruses.



## INTRODUCTION

Influenza A virus belongs to the *Orthomyxoviridae* family, and its genome consists of eight fragments of single-stranded RNA of negative polarity. The annual seasonal outbreaks as well as occasional pandemics constitute major public health threats. During a typical influenza season, 5-15% of the population in the United States is infected, causing 3 to 5 million people to suffer from severe illness. Major genetic changes in the circulating strain can result in global pandemics, which have happened three times in the 20<sup>th</sup> century, with the most devastating pandemic killing over 40 million people in 1918-1919 (W.H.O 2003). Influenza pandemics remain a constant threat because of the unpredictability of the timing, the nature, and the virulence of the next major antigenic shift or drift (Webster *et al.*, 1992, Luscher-Mattli 2000, Beigel et Bray 2008).

Currently, the annual vaccine containing the predicted predominant strains represents the most effective tool for influenza control. Unfortunately, the high genetic variability of the virus renders the protection incomplete. In the case of a newly emerging strain, vaccination is only available a few months after the first appearance, leaving the population vulnerable during the crucial early phase of a pandemic. There are several influenza-specific antiviral drugs available, namely neuraminidase inhibitors and M2-ion channel blockers, which can be associated with important gastrointestinal and sometimes neurological side effects (Luscher-Mattli 2000, De Clercq 2006, Anonymous 2007, Maxwell 2007). Furthermore, drug-resistant strains have emerged and rapidly spread during the last years (Hurt *et al.*, 2007, Moscona 2009, Cheng *et al.*, 2010). New antiviral strategies based on RNA interference show encouraging effectiveness both in cell cultures and in animal models (Ge *et al.*, 2003, Tompkins *et al.*, 2004, Zhou *et al.*, 2007, Zhou *et al.*, 2008, Abrahamyan, Nagy et Golovan 2009, Cheng *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2009, Zhiqiang *et al.*, 2010). However, problems of potency, specificity, and/or cell type-dependent responses illustrate a lack of understanding of the intracellular mechanisms involved. Moreover, the high sequence specificity of siRNAs reduces their potential to efficiently target newly emerging strains. There is therefore an important need for the development of new strategies that display broad-spectrum properties against new influenza strains that arise through antigenic shift or drift.

Ribozymes are RNA molecules that possess catalytic activity, and both artificial and naturally occurring ribozymes function efficiently in human cells (Tang, Hobom et Luo 1994, Lazarev *et al.*, 1999, Trang *et al.*, 2000, Bai *et al.*, 2008). The hepatitis delta virus ribozyme

(HDV-Rz) is derived from a natural motif found in HDV. Based on sequence complementarity, this ribozyme can specifically recognize and subsequently catalyze the cleavage of target RNA molecules. Its full activity under physiological conditions and outstanding stability *in vivo* makes it particularly attractive for the development as a therapeutic tool (Levesque, Choufani et Perreault 2002, Asif-Ullah *et al.*, 2007). Molecular engineering has led to the improvement of the HDV-Rz catalytic motif through the addition of a specific on/off adapter (SOFA) module, which increases the accuracy of the cleavage while reducing the cleavage of non-specific targets (Bergeron et Perreault 2005). The resulting SOFA-HDV-Rz has already been successfully used in human cells to target and discriminate between closely related mRNAs (Fiola, Perreault et Cousineau 2006, Robichaud, Perreault et Ouellette 2008).

To evaluate the potential of a SOFA-HDV-Rz-based strategy to control influenza, we initially identified conserved target sequences in all subtypes known to infect the human population for six out of eight influenza collinear mRNAs, and generated a total of 45 candidate SOFA-HDV-Rz. The step-by-step screening strategy, consisting of both *in vitro* and cellular cleavage assay and *in cellulo* replication survey, led to the identification of efficient SOFA-HDV-Rz that were further characterized for their antiviral activity in an influenza mouse model.

## MATERIALS AND METHODS

### Bioinformatics analysis

For each of the eight viral mRNA fragments (PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M, NS), 20 full-length sequences from the NCBI Influenza Virus Resource (Bao *et al.*, 2008) were chosen arbitrarily for each of the seven subtypes known to infect humans (H1N1, H1N2, H2N2, H3N2, H5N1, H7N3, H9N2) resulting in a total of about 2000 sequences analyzed. Sequences were aligned and analyzed for conserved sequences fulfilling the requirement for a SOFA-HDV-Rz target (HG\*N\*<sub>6</sub>-N<sub>3,6</sub>-N\*<sub>9-12</sub>; H = A, C or T; N = A, T, G or C; \* = conserved nt). The sequence of the each candidate SOFA-HDV-Rz designed was screened for the potential off-targeting on human host mRNAs using the RiboSubstrate software (Lucier *et al.*, 2006) with the Human NCBI build36.2 mRNAs database ([ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/H\\_sapiens/RNA](ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/H_sapiens/RNA)) and standard settings (BS mismatch = 3; Minimum spacer length = 1; Maximum spacer length = 10).

### RNA synthesis

DNA oligonucleotides (IDT) with the following sequences were used for the synthesis of SOFA-HDV-Rz: a specific SOFA-HDV-Rz\_fwd 5'-TAATACGACTCACTATAGGGCCAGC TAGTTT-BS<sub>9-12</sub>-BL<sub>4</sub>-CAGGGTCCACCTCCTCGCGGT-P1<sub>7</sub>-GGGCATCCGTTTCGCG-3' (where BS, BL and P1 indicate the biosensor, the blocker sequence and the P1 recognition domain, respectively; T7 promoter is in the underlined region) and the universal SOFA-HDV-Rz\_rev 5'-CCAGCTAGAAAGGGTCCCTTAGCCATCCGCGAACGGATGCCC -3'. The double-stranded SOFA-HDV-Rz DNA was obtained after a filling reaction, and SOFA-HDV Rz RNA was synthesized by a run-off transcription from PCR products as described previously (Bergeron et Perreault 2005). Briefly, transcriptions were performed in the presence of purified T7 RNA polymerase (10 µg) (Davanloo *et al.*, 1984) as described previously (Bussiere *et al.*, 1999), RNaseOUT (20 U, Invitrogen), pyrophosphatase (0.01 U, Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) and PCR product (2–5 mM) in a buffer containing 80 mM HEPES-KOH pH 7.5, 24 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM spermidine, 40 mM DTT, 5 mM of each NTP in a final volume of 100 ml at 37°C for 2 h. Upon completion, the reaction mixtures were treated with DNase RQ1 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) at 37°C for 20 min, and the RNA was purified by a phenol:chloroform extraction and then precipitated with ethanol.

Influenza cDNAs of H1N1 A/USSR/90/77 were subcloned in pBluescript SK+ (Stratagene). RNA substrates were synthesized by run-off transcription from SacII (NEB) linearized pBluescript-SK+ containing the appropriate cDNA template with the MEGAscript T7 transcription kit (Ambion) according to the manufacturer instructions. For the production of internally radiolabelled substrate, the transcription reactions were performed in the presence of 5  $\mu$ M UTP and 6 pmol of  $\alpha$ -<sup>32</sup>P UTP (3000 Ci/mmol, Perkin Elmer). Upon completion, the reaction mixtures were treated with TURBO DNase (2 U, Ambion) at 37°C for 20 min. The RNA products were fractionated by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE; 19 : 1 ratio of acrylamide to bisacrylamide). The reaction products were visualized by either UV shadowing or autoradiography. The bands corresponding to the correct size were cut out and the transcripts eluted overnight at 4°C. The 3' radiolabelled substrates were generated in a ligation reaction performed with 50 pmol of purified RNA, 30 pmol of <sup>32</sup>PcP (3000 Ci/mmol, Perkin-Elmer), 20 U of RNaseOUT (Invitrogen) and purified T4 RNA ligase (10  $\mu$ g) in a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM ATP, 10 mM DTT and 10% DMSO in a final volume of 10  $\mu$ L at 37°C for 1 h. The products were fractionated by denaturing PAGE, isolated and purified as described above.

### ***In vitro* cleavage assays**

SOFA-HDV-Rz cleavage assays were performed in the presence of 1 pmol of either 3'- (NS substrate) or internally <sup>32</sup>P-labelled target mRNA (all other substrates) mixed with SOFA-HDV-Rz (20 pmol) in a 20  $\mu$ L mixture containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 10 mM MgCl<sub>2</sub> and then incubated at 37 °C for 2 h. The reactions were stopped by the addition of denaturing loading buffer, separated on denaturing 5% PAGE gels, and then analyzed by autoradiography on a Phosphorscreen (GE Healthcare).

### **Construction of pDUAL-JU and introduction of SOFA-HDV-Rz and target Influenza mRNAs**

The tet-responsive Pol II promoter Ptight was amplified from the plasmid pTRE-Tight (Clontech Laboratories, Inc.), cloned in pGEM-T (Promega) and subcloned in pBudCE4.1 (Invitrogen) with the added restriction sites BbsI and NheI (NEB). The Pol III promoter PhI was amplified from the plasmid psiRNA-hH1GFPzeo (InvivoGen) and cloned in the engineered plasmid with the added restriction sites BspHI and SbfI. The two promoters inserted in the resulting pDUAL-JU vector were sequenced in both directions to assure that the correct sequences

were cloned. The different SOFA-HDV-Rz were PCR amplified and inserted after the PhHI promoter of pDUAL-JU using added BbsI restriction sites. The PCR products containing the respective targets were cloned with added MluI and NotI restriction sites after the Ptight promoter of the pDUAL-JU containing or not the DNA sequence of a SOFA-HDV-Rz. The resulting plasmids were sequenced to verify both the sequences of the SOFA-HDV-Rz and the substrate.

### **Cell culture and DNA transfection**

HEK-293 cells (obtained from the American Type Culture Collection; CRL-1573) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Wisent) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Wisent), 1 mM sodium pyruvate and 2 mM L-glutamine at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Cells were transfected with pTET-ON (Clontech) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen), as per the manufacturer's instructions. This pTET-ON vector is used to transform cells so they can express the Tet-responsive transactivator. Briefly, cells were seeded into 10 cm-dishes plates at  $3 \times 10^6$  cells/well and transfected with 24 µg of plasmid DNA that was complexed with the provided transfection reagent. They were then selected for resistance to G-418 at a final concentration of 600 µg/ml. G-418-resistant colonies were isolated and screened for the highest fold-induction (highest expression with lowest background) with the luciferase reporter assay kit provided by the manufacturer (Clontech).

HEK-293 cells expressing the Tet-responsive element were transfected with the different pDUAL-JU constructs containing the target with or without SOFA-HDV-Rz. Briefly, cells were seeded into 12-well plates at  $2 \times 10^5$  cells / well and transfected with 1 µg of plasmid DNA that was complexed with Lipofectamine 2000. The target mRNA expression was induced for 4 or 20 h with doxycycline (Sigma) at a final concentration of 975 ng/mL prior to RNA extraction with TriPur (Roche) according to the manufacturer instructions.

### **Ribonucleic Protection Assay and Northern Blot Hybridizations**

For the ribonucleic protection assay (RPA), 5 µg of total RNA extract was processed with the RPA III™ Ribonuclease Protection Assay Kit (Ambion) as recommended by the manufacturer. Probes with 3' and 5' overhangs of 15 nucleotides were transcribed from PCR products of pBluescript plasmids containing the fragments described above.

Northern blot analyses of 10 µg total RNA extract were performed as described previously (Bergeron et Perreault 2005). The probes to detect the Influenza target or the control Zeo<sup>R</sup> mRNA were obtained by a T3 RNA polymerase-based transcription in the presence of 30 pmol of α-<sup>32</sup>P UTP (3000 Ci/mmol, Amersham Biosciences) on the pBluescript plasmids containing the fragments described above, and the β-actin RNA probe was transcribed from pTRI-B-Actin-Mouse (Ambion). The plasmids were digested to yield run-off transcription products ranging from 134 nts to 503 nts in length. All probes were prepared with the MAXIscript T3 transcription kit (Ambion) according to the manufacturer instructions, and hybridizations were carried out for 16–18 h at 60°C. The membranes were then washed and analyzed by autoradiography on a Phosphorscreen (GE Healthcare).

### **Evaluation of antiviral activity *in cellulo***

Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells (obtained from the American Type Culture Collection; CCL-34) were seeded in 12-well plates at 4x10<sup>5</sup> cellules /ml in DMEM supplemented with 5% FBS. The next day, the cells were transfected with 0.75 µg of two pDUAL-JU plasmids coding for different ribozymes, but free of any substrate sequence, using Lipofectamine 2000. On day 2, the medium was replaced by DMEM with 2 µg/ml TPCK-trypsin (Sigma), and the cells were infected with H1N1 influenza A/Puerto Rico/8/34 (A/PR/8/34) at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1. After 10 h, cells were detached using Versene (Invitrogen), washed once with phosphate-buffered saline (PBS, Invitrogen), and fixed with Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences). After incubation with a mouse monoclonal antibody against influenza hemagglutinin (clone C102; Santa Cruz Biotech) in combination with a goat anti-mouse Alexa647-labeled secondary antibody (Invitrogen), the percentage of infected cells was quantified by flow cytometry.

### ***In vivo* efficacy assessment**

Groups of three to five 6 week-old female BALB/c mice (Charles River) were instilled intranasally with 10 µg each of the same plasmid combinations used for the *in vitro* replication experiments, or 20 µg of pEGFP-N1 (Clontech) as transfection control, using In Vivo-jetPEI™ (Polyplus Transfection) as transfection reagent according to the manufacturer's instructions, followed intranasal infection with 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> of H1N1 A/PR/8/34 6 h later. Animals were monitored daily for signs of disease. To assess clinical disease severity, a three-step grading system was used. For Posture, 0 represented normal, 1 slow movement, and 2 back curved and tousled fur. Activity was graded 0 for normal, 1 for calm, and 2 for inactive, and weight loss was

classified as 0 for 0 to 15% loss, 1 for 15 to 20% loss, or 2 for more than 20%. In a second experiment, all animals were euthanized on day 1 after infection, the lungs were harvested, and virus titers were determined by limited dilution method and expressed as TCID<sub>50</sub>. The Mann-Whitney test was used for statistical analyses. All experiments were approved by the institutional animal care and use committee of the Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier (#0705-04).

## RESULTS

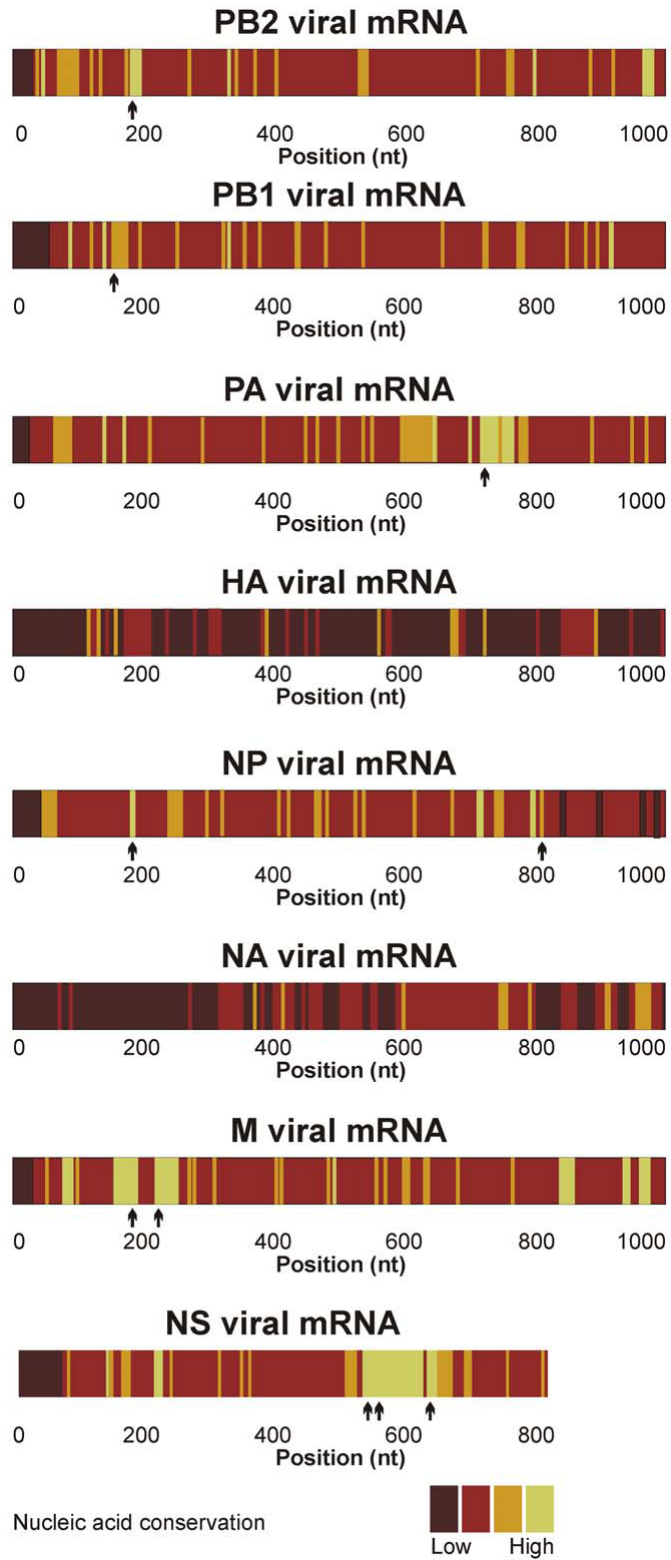
### **Conserved SOFA-HDV-Rz targets are present in six influenza segments.**

Even though the emergence of new influenza viruses is highly likely, the exact subtype and antigenic characteristics are currently impossible to predict. We therefore intended to identify regions in the viral mRNAs which are conserved in all subtypes that have the potential to cause disease in humans. Towards this, a bioinformatics analysis was conducted with complete genome sequences of 20 arbitrarily chosen isolates available in the NCBI Influenza Virus Resource database for each of the following subtypes: H1N1, H1N2, H2N2, H3N2, H5N1, H7N3, and H9N2. The sequences of each mRNA segment were aligned, and the degree of homology for the first 1000 nucleotides of each fragment was defined, since targeting the 5' region of an mRNA is more likely to result in transcript fragments that can no longer encode a functional protein. Consistent with the high genetic variability of the viral glycoproteins (Webster *et al.*, 1992, Khiabani, Trifonov et Rabadan 2009), neither the hemagglutinin (HA) nor the neuraminidase (NA) segments contained any conserved regions, while several conserved regions of sufficient size to be potential SOFA-HDV-Rz targets were identified for the other six segments (Figure 1).

SOFA-HDV-Rz are designed to contain three specific domains for a selected target: a blocker domain, which locks the catalytic core in an inactive conformation; a biosensor, which removes the block upon recognition of the target; and a P1 domain which binding results in cleavage of the targeted RNA (Figure 2). The SOFA module acts through the binding of the blocker on the P1 domain (Bergeron et Perreault 2005): this short duplex increases the energetic barrier for non-specific interactions with substrates. The biosensor offers an extended base-pairing favouring interaction with the genuine substrate; this longer duplex disrupts the hindrance carried out by the blocker and therefore allows the P1 accessibility for elongated substrate binding and subsequent target cleavage. Screening of the conserved regions for the appropriate target sequences (HG\*N\*6-N3-6-N\*9-12: H = A, C or T; N = A, T, G or C; \* = conserved nt) yielded more than 45 potential SOFA-HDV-Rz. These candidates were then analyzed for possible



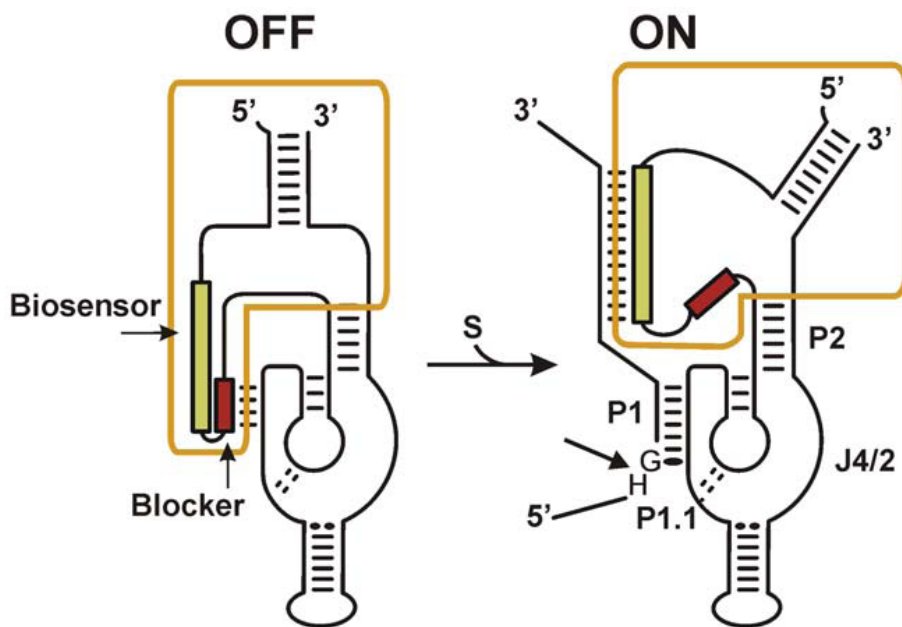
**Figure 1. Representation of the conservation study performed on the viral mRNA fragments from human influenza A virus.** For each of the 8 influenza mRNA fragments (PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M, NS), up to 20 nucleic acid sequences from the 7 human strains (H1N1, H1N2, H2N2, H3N2, H5N1, H7N3 and H9N2) were randomly selected and aligned to calculate a conservation rate at each position. The color gradation schematically identifies the level of conservation found in the first 1000 nucleotides of the different viral mRNAs. The arrows indicate the position of the most efficient ribozymes (see Table 1).



**Table 1.** *In vitro* catalytic activity of the selected SOFA-HDV-Rz

Target	SOFA-HDV-Rz	P1	BS	Cleavage %*	
PB2	PB2-177	AUCAUCU	GGAUAUUUCAU	20	
	PB2-324a	UUCCACU	GGUCCAUII	15	
	PB2-324b	UUCCACU	GGUCCAUIIUC	7	
PB1	PB1-132a	CCAUGGU	GUAUCCUGUICC	<1	
	PB1-132b	CCAUGGU	AUCCUGUICC	<1	
	PB1-167a	UGUUGAU	UAUUGGUGUG	25	
	PB1-167b	UGUUGAU	UGAAUUAUUGGUG	<1	
	PB1-296	CACAAUU	GCCAUIUGCUUC	57	
	PB1-907	GGUCAUU	GUGUCCUGAG	<1	
	PA	PA-134a	AUAUUGU	UCCAAGUGAG	38
PA-134b		AUAUUGU	ACCUCCAAGUG	41	
PA-612a		UCGCCUU	CUUCAAUUGU	28	
PA-612b		UCGCCUU	UUUCUUCAAUUG	33	
PA-629		UUUCUUU	CCUGUGAUUUCA	49	
PA-714		UAGGCUU	CGAAUCCAUC	51	
PA-716		CAUAGGU	UUCGAAUCCA	54	
PA-722a		CAUCCAUI	CCGUUCGGUU	42	
PA-722b		CAUCCAUI	CCGUUCGGUUCG	43	
PA-724a		UCCAUCU	CGUUCGGUU	38	
PA-724b		UCCAUCU	AGCCGUUCGG	22	
PA-752a		UGCCCUU	GACAUUUGAGAA	9	
PA-752b		UGCCCUU	ACAUUUGAGA	11	
PA-754		CUUGCCU	UGGACAUUUG	<1	
PA-876a		AUCCAUI	AUGCUUAAUUUU	<1	
PA-876b		AUCCAUI	AAUGCUUAAUU	<1	
NP		NP-59	UGGUGCU	GUUCAUAAGAC	<1
		NP-173a	GGUGCAU	CACUGAGUUU	52
		NP-173b	GGUGCAU	CUGAGUUUAAG	50
		NP-710a	GUUGCAU	UUUCCUUUGA	<1
	NP-710b	GUUGCAU	AAUUUUCUUU	<1	
	NP-744	UUUGUGU	UGAUCCAUCAUU	<1	
	NP-804	GAUCUUU	AGUGCCAGAAA	54	
	M	M-172a	UCUUGUU	GAGGUGACAG	23
M-172b		UCUUGUU	GAGGUGACAGGA	16	
M-226a		ACUGGGU	ACGCUGCAGUCC	7	
M-226b		ACUGGGU	GCAGUCCUCG	24	
M-231a		CGCUCAU	CUACGCUGCAG	<1	
M-231b		CGCUCAU	CGUCUACGCUGC	<1	
NS	NS-110	GGGCAUU	AGCCGAUCAAG	<1	
	NS-128	CGAAGCU	GGGACUUGAUC	34	
	NS-527a	UAUGUCU	GACAUCCUCA	75	
	NS-527b	UAUGUCU	UUUGACAUC	54	
	NS-541	GACAUCU	CCAAUUGCAU	52	
	NS-622a	GAAUCUU	CUGCUUCUCC	31	
	NS-622b	GAAUCUU	ACUGCUUCUC	13	

\* Margin of error on the cleavage rate is 10%.



**Figure 2. Schematic drawing of a SOFA-HDV-Rz.** The yellow box indicates the SOFA module. The biosensor and the blocker are illustrated in green and red, respectively. The bold arrow indicates the cleavage site. S, P1, and P1.1 stand for the substrate, P1 recognition stem, and the P1.1 pseudoknot, respectively. Without the appropriate substrate, the cleaving activity of the SOFA-HDV-Rz is locked by the base pairing of the blocker (4 nts) on the P1 recognition sequence (OFF state). Upon recognition of its specific target, the biosensor (10-12 nts) of the SOFA module base pairs on the substrate downstream of the cleavage site, which disrupts the interaction of the blocker on the P1 recognition sequence and therefore allows the formation of the P1 stem (7 nts) between the ribozyme and the substrate (ON state). This leads to the specific cleavage of the RNA substrate.

off-targeting of cellular mRNAs using the RiboSubstrate software (Lucier *et al.*, 2006). Only SOFA-HDV-Rz displaying a high level of specificity towards influenza mRNAs with a low probability of interactions with cellular mRNAs were retained for further investigation. The predicted specificity for each SOFA-HDV-Rz is shown in Table S1.

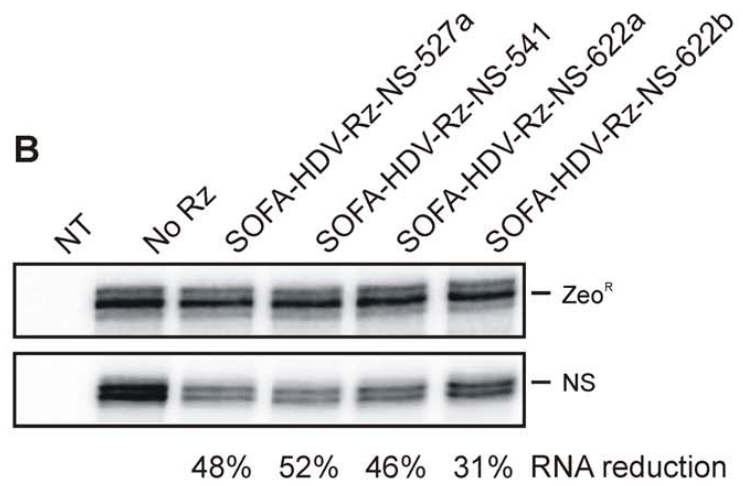
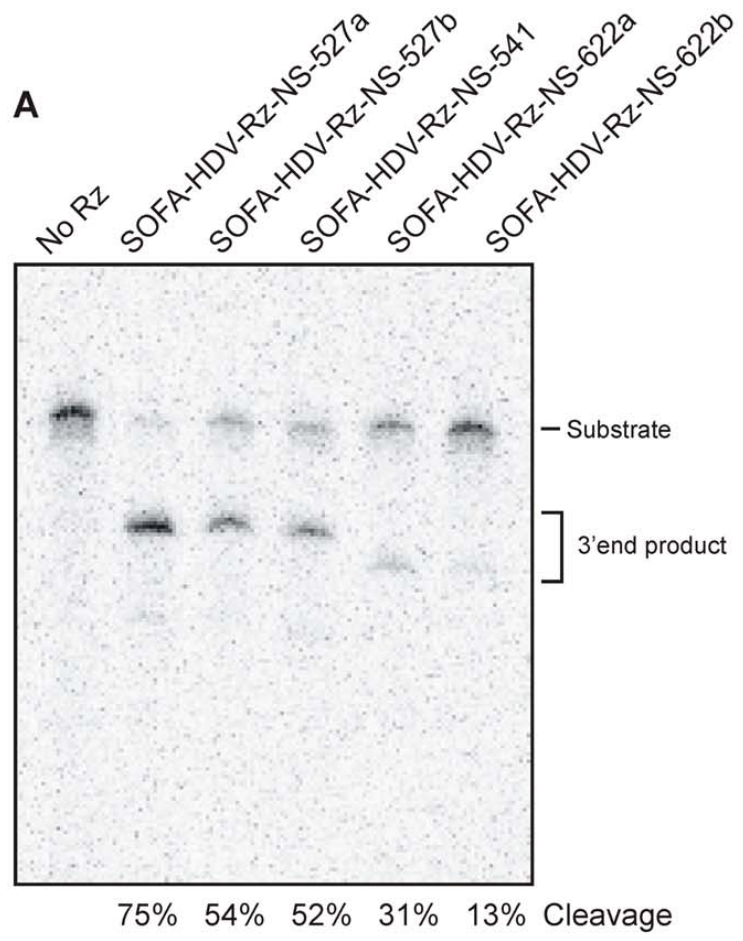
#### **A subset of SOFA-HDV-Rz shows catalytic activity.**

To assess the ability of the selected SOFA-HDV-Rz to target specific influenza mRNA transcripts, the cleavage efficacy of radiolabeled *in vitro* synthesized H1N1 A/USSR/90/77 mRNAs was tested under single-turnover conditions ( $[Rz] > [S]$ ) and analyzed on a denaturant polyacrylamide gel. Two active ribozymes were found to cleave the 5' regions of both PB2 and PB1 mRNAs. The mRNA of PA was targeted by 11 SOFA-HDV-Rz while three different ribozymes were able to cleave both the nucleoprotein (NP) and matrix (M) mRNAs. Finally, all but one of the seven ribozymes selected against the NS mRNAs displayed catalytic activity (Figure 3A and Table 1). The SOFA-HDV-Rz-NS-527a was the most catalytically efficient molecule, displaying 75% cleavage of the viral NS RNA substrate. Overall, this assay yielded a collection of 26 SOFA-HDV-Rz that efficiently cleave the collinear mRNAs produced from the six remaining influenza segments.

#### **Several candidates SOFA-HDV-Rz retain activity in a cellular environment.**

To confirm the catalytic activity of the selected SOFA-HDV-Rz in a cellular environment, plasmids were designed to simultaneously express a SOFA-HDV-Rz and the corresponding target mRNA. SOFA-HDV-Rz were under the control of a cellular RNA polymerase III promoter, while viral mRNAs were expressed using a Tet-inducible Pol II promoter (Figure S1). We generated a HEK-293 cell line stably expressing the Tet-responsive transactivator, which supports activation of that promoter by doxycycline. That modified cell line was transfected with the dual vector expressing both the viral RNA and the corresponding SOFA-HDV-Rz.

**Figure 3. Catalytic activity of SOFA-HDV-Rz directed against influenza mRNAs.** The identity of the SOFA-HDV-Rz tested, which contains the target name followed by a number indicating the cleavage site and a lower case when more than 1 ribozyme targets the same site, is listed above the gels. A negative control (No Rz) was performed in the absence of any SOFA-HDV-Rz. **(A)** 3'-radiolabeled RNA substrate consisting of the influenza NS mRNA was incubated with a SOFA-HDV-Rz at 37°C for 2 h in presence of magnesium in Tris-HCl buffer pH 7.5. The reaction products were separated on PAGE and visualized by phosphorimaging. The positions of the substrate and 3' end product are indicated. **(B)** Ribonucleic protection assay on total cell extract prepared from Tet-modified HEK-293 cells transfected with pDUAL-JU expressing both the NS target (induced for 20 h) and the SOFA-HDV-Rz. The bands corresponding to the substrate mRNA are normalized with Zeo<sup>R</sup> reference mRNA from the pDUAL-JU vector. The levels of Zeo<sup>R</sup> and NS mRNAs are presented in the upper and lower panel, respectively.



Target mRNA expression was first detected after 4 h and peaked around 20 h after doxycycline induction (data not shown). To assess cleavage efficacy, total cellular RNA was extracted and analyzed by ribonucleic protection assay (RPA) using specific probes for each target mRNA as well as GAPDH and *zeoR* mRNA for cellular RNA and plasmid controls, respectively. Results were confirmed by Northern blot hybridization. The reduction in target mRNA levels remained constant between 4 h and 20 h of induction, *i.e.* at low and high target abundance. Of all the SOFA-HDV-Rz that showed activity for their respective synthetic target RNA, only one candidate retained activity in the cellular context for PB1, PB2, and the NP, while two candidates led to an appreciable reduction in the levels PA and M mRNAs, and four of the NS-specific SOFA-HDV-Rz remained active (Figure 3B). It should be noted that one NS-specific ribozyme (SOFA-HDV-Rz-NS-527b) could not be assayed since its primary sequence encompasses a Pol III stop signal. For all the SOFA-HDV-Rz that exhibited a significant cleavage activity, a P1.1 inactive mutant, which consists in replacing the nucleotides forming the pseudoknot I.I (*i.e.* including two GC bp) by for 4 adenosines, was constructed. These substitutions prevent the formation of the pseudoknot I.I, a crucial step in the folding pathway, thereby inhibiting its catalytic activity (Nishikawa et Nishikawa 2000, Deschenes *et al.*, 2003). Using such controls, we observed in most of the cases a reduction in the overall levels of the targeted mRNAs in cellular assays (data not shown) that most likely results from antisense effect, since those mutants retain the ability to fully bind the target. For example, the active and inactive SOFA-HDV-Rz-NP-804 displayed a 38% and 24% reduction of the target mRNA, respectively. More importantly, the reductions observed with the active ribozymes were more significant than their respective inactive version in all cases (data not shown), supporting that they resulted from the cleavage action.

#### **Combined SOFA-HDV-Rz displays antiviral activity.**

To evaluate the antiviral activity of the catalytically active SOFA-HDV-Rz, we established a flow cytometry-based assay allowing us to quantify the proportion of infected cells. Toward this, Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells, which are naturally susceptible to influenza infection, were first transfected with SOFA-HDV-Rz encoding plasmids and then infected with H1N1 A/Puerto Rico/8/34 (PR8) at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1. An antibody against the HA protein was chosen to ensure an unbiased detection of infected cells, since none of the ribozymes target this particular glycoprotein. Moreover, combinations of two

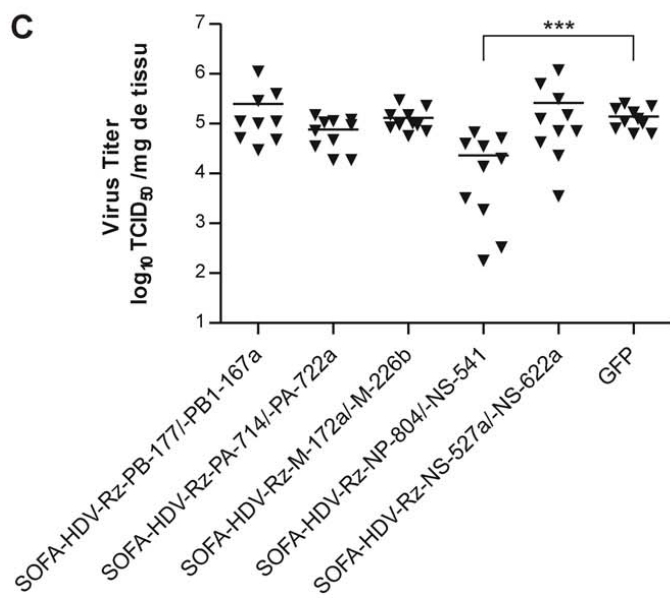
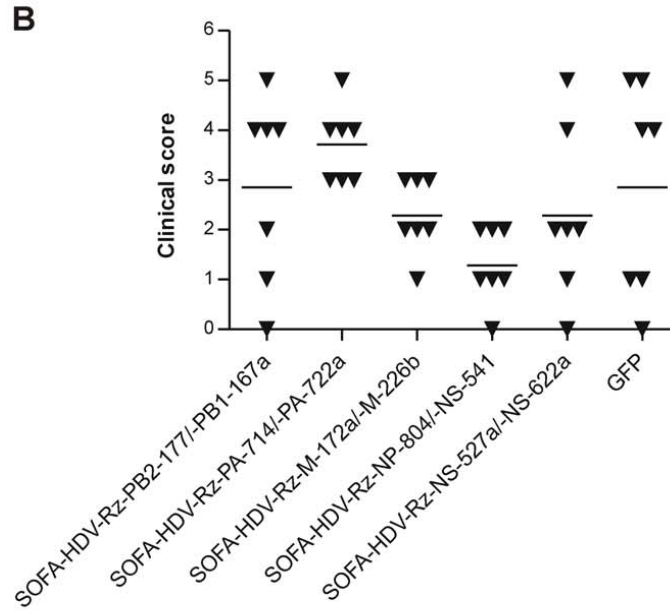
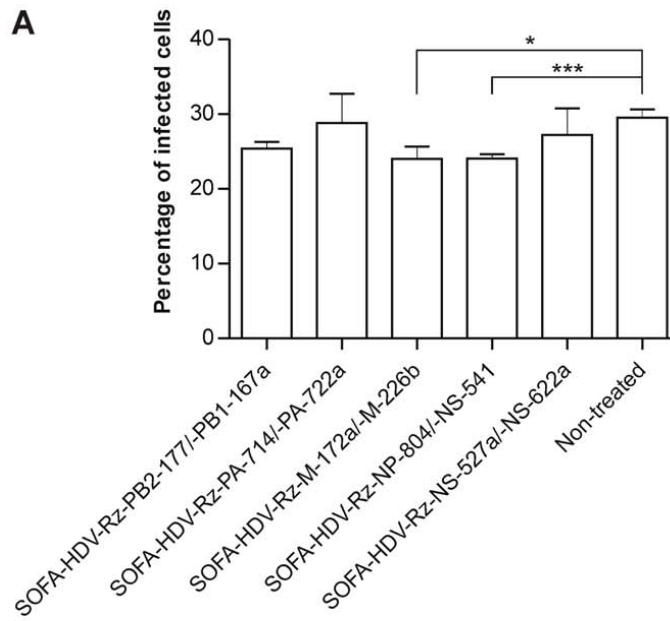


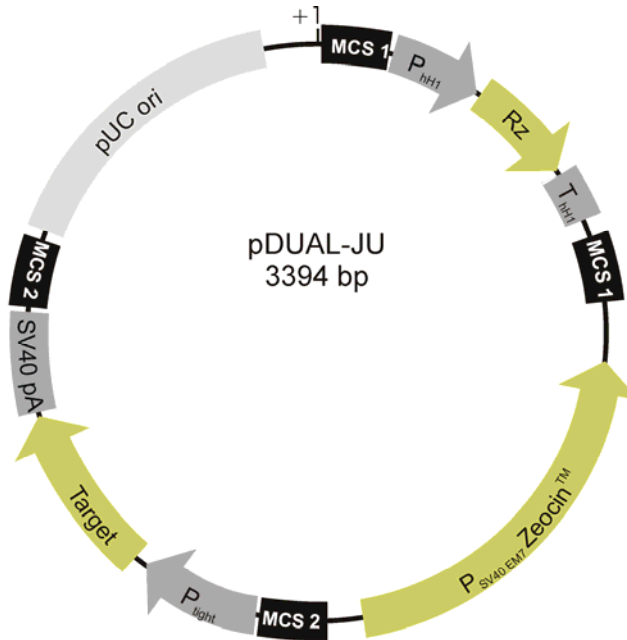
SOFA-HDV-Rz targeting the same or different viral mRNAs were transfected simultaneously. Ten hours after infection, around 30% of the non-treated cells expressed the HA protein (Figure 4A). While no improvement was seen for the combination of PA- and NS-targeting ribozymes, both the SOFA-HDV-Rz-M-172a/-M-226b and -NS-541/-NP-804 pairs resulted in a small reduction in the number of HA-positive cells (Figure 4A). No significant effect was observed for individually transfected ribozymes (data not shown).

**Only the NS/NP combination retains antiviral activity *in vivo*.**

The previous result does not provide any information on the actual number of viral particles produced in the presence of active ribozymes. It only indicates that a smaller number of infected-cells are actually detected in the presence of certain ribozyme combinations. Considering that a partial reduction of viral titer can potentially cause a significant decrease in disease severity since the immune system contributes importantly to the control of influenza replication and spread *in vivo*, we further investigated the extent of morbidity reduction and viral inhibition by the SOFA-HDV-Rz combinations in a mouse model. To validate the *in vivo* transfection protocol, mice were initially transfected intranasally with an eGFP expression plasmid using In Vivo-JetPEI as transfection agent. Twenty-four hours later, eGFP expression was detected throughout the lower respiratory tract, confirming efficient delivery to the site of influenza infection (data not shown). To assess *in vivo* efficacy, the different SOFA-HDV-Rz combinations were instilled intranasally, followed by infection with  $10^5$  50% tissue culture infectious doses (TCID<sub>50</sub>) of PR8 6 h later. Considerable variability of clinical disease severity was observed in groups treated with the control eGFP plasmid or the SOFA-HDV-Rz-PA-714/-PA-722a, -PB1-167a/-PB2-177, and -NS-527a/NS-622a combinations, while all animals in the -M-172a/-M-226b and -NS-541/-NP-804 treated groups were protected from severe disease and death (Figure 4B). Mice transfected with the SOFA-HDV-Rz-NS-541/-NP-804 combination displayed especially lower clinical scores than the average controls. To examine the direct inhibitory effect on virus replication, animals were transfected with the same SOFA-HDV-Rz combinations, followed by infection with PR8 after 6 h and sacrifice 24 h after infection. Quantification of viral titers in lung tissue revealed that only the SOFA-HDV-Rz-NS-541/-NP-804 combination significantly inhibited virus replication at early times after infection, with up to 1000-fold reduction in viral titer seen in some individuals (Figure 4C).

**Figure 4. Antiviral activity of SOFA-HDV-Rz (A) in cells and (B and C) *in vivo*.** (A) MDCK cells were transfected with the indicated SOFA-HDV-RZ combinations, and infected with PR8 at a MOI of 0.1 after 24 h. Ten hours later, the cells were fixed and stained with a monoclonal antibody against HA. The percentage of HA-positive cells detected in three independent experiments is shown. Error bars indicate standard deviation. (B and C) BALB/c mice were transfected intranasally with the indicated SOFA-HDV-Rz combinations and challenged with  $10^5$  50% tissue culture infectious doses (TCID<sub>50</sub>) of PR8 6 h later. (B) Clinical score on day 3 after infection. The clinical score represents a combination of posture, activity, and weight loss scores evaluated on a 0-1-2 scale as detailed in materials and methods. Results from 2 independent experiments are shown, and each symbol represents one animal. (C) Viral lung titers on day 1 after infection. Animals were sacrificed 24 h after infection and the lung was harvested. Titers are expressed as TCID<sub>50</sub> per mg of tissue. Student's t-test : asterisk,  $P < 0.05$ ; three asterisks,  $P < 0.001$ .





#### Location of features

Multiple cloning site (MCS) 1 : 1-88

Human H1 Promoter ( $P_{hh1}$ ) : 89-207

EM7-alpha-peptide : 208-541

Terminateur hH1( $T_{hh1}$ ) : 542-567

MCS 1' : 568-627

Zeocin<sup>TM</sup> resistance gene : 1004-1378 (complementary strand)

EM7 Promoter : 1397-1451 (complementary strand)

SV40 early promoter : 1488-1810 (complementary strand)

MCS 2 : 1828-1882

$P_{tight}$  Tet-responsive promoter : 1891-2206

Tet response element ( $TRE_{mod}$ ) : 1891-2140

Location of the 7 *tetO* 19-mers: 1900-1918; 1936-1954;

1971-1989; 2007-2025; 2043-2061; 2078-2096; 2114-2132.

Fragment containing  $P_{minCMVD}$ : 2145-2205

TATAA box: 2168-2174

MCS : 2244-2293

SV40 polyadenylation sequence : 2295-2495

MCS 2' : 2498-256.

pUC origin (high copy number) : 2671-3344

**Figure S1. Schematic representation of the plasmid designed to simultaneously express a SOFA-HDV-Rz and the corresponding target mRNA.** SOFA-HDV-Rz are under the control of a cellular RNA polymerase III promoter, while viral mRNAs are expressed using a Tet-inducible Pol II promoter.

**Table S1.** Predicted specificity of the selected SOFA-HDV-Rz

Target	SOFA-HDV-Rz	RS rate
PB2	PB2-177	■
	PB2-324a	■
	PB2-324b	■
PB1	PB1-132a	■
	PB1-132b	■
	PB1-167a	■
	PB1-167b	■
	PB1-296	■
	PB1-907	■
	PA	PA-134a
PA-134b		■
PA-612a		■
PA-612b		■
PA-629		■
PA-714		■
PA-716		■
PA-722a		■
PA-722b		■
PA-724a		■
PA-724b		■
PA-752a		■
PA-752b		■
PA-754		■
PA-876a		■
PA-876b		■
NP		NP-59
	NP-173a	■
	NP-173b	■
	NP-710a	■
	NP-710b	■
	NP-744	■
	NP-804	■
M	M-172a	■
	M-172b	■
	M-226a	■
	M-226b	■
	M-231a	■
NS	M-231b	■
	NS-110	■
	NS-128	■
	NS-527a	■
	NS-527b	■
	NS-541	■
	NS-622a	■
NS-622b	■	



## DISCUSSION

We have developed a step-by-step strategy to achieve efficient and affordable selection of therapeutic molecules against conserved regions of a broad range of influenza A subtypes. This strategy capitalizes on an *in silico* analysis of all subtypes known to infect the human population, allowing an inexpensive and time-saving identification of regions that are conserved over time and regardless of reassortments. We designed SOFA-HDV-Rz to target those identified regions and catalytically cleave the mRNA, which are subsequently degraded by the host cellular machinery. The most promising candidates were further evaluated first in *in vitro* assays to assess catalytic activity, and then regarding their antiviral activity in cell culture and *in vivo*, yielding two combinations with promising prophylactic activity. Our study thus provides proof-of-principle for the identification of candidate HDV-SOFA-Rz with antiviral activity against a highly variable RNA virus.

The lack of proof-reading capacity of the viral polymerase, the high replication rate and short replication time are the cause of the high genetic variability inherent to RNA viruses, unless there is functional pressure to maintain specific nucleotides (Ilyinskii *et al.*, 2009, Khiabani, Trifonov et Rabadan 2009). The extensive *in silico* conservation study, which to our knowledge is the first of its kind, allowed the identification of several such stretches of conserved nucleotides sufficiently long for efficient SOFA-HDV-Rz targeting in all but the two viral mRNAs coding for the viral glycoproteins NA and HA. These two major surface glycoproteins are highly variable due to the continuous antigenic pressure (Webster *et al.*, 1992, Robbins *et al.*, 2008, Khiabani, Trifonov et Rabadan 2009) and were thus excluded from the study. Therapeutic molecules targeting regions identified through this process are thus expected to display broad-spectrum specificity and are likely to retain efficacy against new strains, thereby overcoming the main weakness of all antiviral strategies targeting nucleotide sequences (Tang, Hobom et Luo 1994, Boden *et al.*, 2003, Ferguson, Galvani et Bush 2003, Haasnoot, Westerhout et Berkhout 2007).

The HDV-Rz is one of the rare examples derived from an RNA species found to infect human cells, therefore being naturally optimized to fully function in physiological conditions (Levesque, Choufani et Perreault 2002, Asif-Ullah *et al.*, 2007). A SOFA module has been engineered to improve its catalytic characteristics, greatly increasing its fidelity (Bergeron et Perreault 2005). The *in vitro* activity of many SOFA-HDV-Rz designed to target conserved

regions identified with the bio-informatics of six collinear viral mRNA was evaluated, as targeting the viral mRNA might be more effective than the genomic RNA due to its higher abundance and lack of encapsidation by the NP protein (Haasnoot, Westerhout et Berkhout 2007). Since RNA molecules can have long-range interactions, working with *in vitro* synthesized full-length target RNA is likely to be an accurate way to evaluate the potential of the effective candidates in regards of the tridimensional accessibility. Roughly half of the potential candidates showed appreciable catalytic activity, which is in the same range as other studies done with long RNA and SOFA-HDV-Rz (Robichaud, Perreault et Ouellette 2008, Levesque *et al.*, 2010, Laine *et al.*, 2011). The ineffectiveness of the rejected candidates could be explained either by inaccessibility of the target RNA or by kinetic trapping of the SOFA-HDV-Rz in an inactive conformation, which could be attributed to diverse interaction between different parts of the molecule. In particular, the biosensor interaction with the J4/2-P2 region (Figure 2) is known to inhibit the catalytic activity. Such example is found in the SOFA-HDV-Rz-NP-710a and its 7 consecutive nts that could be base-paired with that area. An elevated blocker strength is also detrimental for the release of the P1 and successive substrate recognition. This situation is found in SOFA-HDV-Rz-PB1-132a and -PB1-132b that have an elongated blocker (from the continuous biosensor nts) of 6 nts containing 4 strong G-C bonds. With the high potential of this novel class of therapeutic ribozyme, it would be of great interest to learn which criteria could discriminate between an intrinsically functional or inactive SOFA-HDV-Rz. The information gathered from the SOFA-HDV-Rz panel produced in this project is currently under investigation to develop new screening and selection criteria to improve the yield of active molecules in future studies.

Around half of the catalytically active SOFA-HDV-Rz failed to display sufficient activity in cellular assays, either due to a differential reaching of the target (divergent conformation or protection through interaction with host factors) or to an inhibited state of the ribozyme. The observed effect of the active candidates is necessarily the sum of antisense and cleavage action, leading to the development of powerful antisense-enhanced ribozymes (Tang, Hobom et Luo 1994, Kumar *et al.*, 2010). However, the antisense effect in some cases was really minimal while all ribozymes were shown to actively cleave the mRNAs, although at different levels. The use of certain combinations of ribozymes clearly reduces the probability of generating escape mutants (Boden *et al.*, 2003, ter Brake *et al.*, 2006). Therefore, combinations of SOFA-HDV-Rz chosen from the collection of catalytically active molecules were tested for their antiviral effect in infected cells. While most of the combinations targeting the same RNA showed no increase in activity, all the SOFA-HDV-Rz duos targeting different viral mRNAs inhibited viral growth,

indicating a synergic effect. However, it is too early in our investigation to comment on how the synergic effect precisely takes place and/or on the steps of the viral replication cycle that are the most affected by the action of the ribozyme. The slight decrease of infected cells in the replication assays is explained by the sorting system which scores positive for an infected cell independently of its viral titer (Figure 4A). The efficient SOFA-HDV-Rz combinations also reduced viral replication in lungs and protected animals from severe illness, whereas combinations that were unable to inhibit viral replication in cell culture had no beneficial effect *in vivo*. The SOFA-HDV-Rz NS-541 / NP-804 duo led to a one order magnitude difference in peak lung titers, which is in a range previously shown to correlate with decreased disease severity (Haasnoot, Westerhout et Berkhout 2007). It will be of great interest to investigate further combinations and to extend the clinical evaluation to post-exposure treatment in order to gain insight in the curative prospect of SOFA-HDV-Rz. Respiratory viruses such as influenza A are ideal target for nucleic acid therapy since the upper airways and even lungs are relatively accessible for gene delivery systems (Haasnoot, Westerhout et Berkhout 2007).

In summary, our study constitutes a proof-of-principle for a new strategy to find therapeutic molecules against highly variable RNA viruses using influenza A as a prototype. Our approach offers an inexpensive and time-saving way for the development of any RNA recognition-based design, starting with the identification of conserved nucleic acid regions by *in silico* analysis. A step-by-step selection strategy with increasing stringency from *in vitro* catalytic cleavage evaluation to *in vivo* efficacy assessment yielded a panel of SOFA-HDV-Rz that target influenza A virus mRNAs. This innovative system led to the identification of potent SOFA-HDV-Rz against which emergence of resistance would be unlikely giving the conserved nature of the targeted nucleotides.



## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors would like to thank Dominique Lévesque and Michel Lévesque for technical assistance. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; grant number PAP-99021) to Dr. Bisailon, Dr. Perreault and Dr. von Messling. The RNA group is also supported by grants from both the Université de Sherbrooke and CIHR (Resource program). Dr. Perreault holds the Canada Research Chair in Genomics and Catalytic RNA. Dr. Motard is a Chercheur Boursier Junior 2 from the Fonds de recherche en santé du Québec. Dr. Bisailon and Dr. Perreault are members of the Centre de Recherche Clinique Étienne-Label. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The authors have declared that no competing interests exist.

## REFERENCES

- Abrahamyan, A., Nagy, E. et Golovan, S. P. (2009). Human H1 promoter expressed short hairpin RNAs (shRNAs) suppress avian influenza virus replication in chicken CH-212 and canine MDCK cells. *Antiviral Res* 84: 159-67.
- Anonymous (2007). New concerns about oseltamivir. *Lancet* 369: 1056.
- Asif-Ullah, M., Levesque, M., Robichaud, G. et Perreault, J. P. (2007). Development of ribozyme-based gene-inactivations; the example of the hepatitis delta virus ribozyme. *Curr Gene Ther* 7: 205-16.
- Bai, Y., Trang, P., Li, H., Kim, K., Zhou, T. et Liu, F. (2008). Effective inhibition in animals of viral pathogenesis by a ribozyme derived from RNase P catalytic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 10919-24.
- Bao, Y., Bolotov, P., Dernovoy, D., Kiryutin, B., Zaslavsky, L., Tatusova, T., Ostell, J. et Lipman, D. (2008). The influenza virus resource at the National Center for Biotechnology Information. *J Virol* 82: 596-601.
- Beigel, J. et Bray, M. (2008). Current and future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza. *Antiviral Res* 78: 91-102.
- Bergeron, L. J. et Perreault, J. P. (2005). Target-dependent on/off switch increases ribozyme fidelity. *Nucleic Acids Res* 33: 1240-8.
- Boden, D., Pusch, O., Lee, F., Tucker, L. et Ramratnam, B. (2003). Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference. *J Virol* 77: 11531-5.
- Bussiere, F., Lehoux, J., Thompson, D. A., Skrzeczkowski, L. J. et Perreault, J. (1999). Subcellular localization and rolling circle replication of peach latent mosaic viroid: hallmarks of group A viroids. *J Virol* 73: 6353-60.
- Cheng, C., Yao, L., Chen, A., Jia, R., Huan, L., Guo, J., Bo, H., Shu, Y. et Zhang, Z. (2009). Inhibitory effect of small interfering RNA specific for a novel candidate target in PB1 gene of influenza A virus. *J Drug Target* 17: 133-9.
- Cheng, P. K., To, A. P., Leung, T. W., Leung, P. C., Lee, C. W. et Lim, W. W. (2010). Oseltamivir- and amantadine-resistant influenza virus A (H1N1). *Emerg Infect Dis* 16: 155-6.

- Davanloo, P., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. et Studier, F. W. (1984). Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 2035-9.
- De Clercq, E. (2006). Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nat Rev Drug Discov* 5: 1015-25.
- Deschenes, P., Ouellet, J., Perreault, J. et Perreault, J. P. (2003). Formation of the P1.1 pseudoknot is critical for both the cleavage activity and substrate specificity of an antigenomic trans-acting hepatitis delta ribozyme. *Nucleic Acids Res* 31: 2087-96.
- Ferguson, N. M., Galvani, A. P. et Bush, R. M. (2003). Ecological and immunological determinants of influenza evolution. *Nature* 422: 428-33.
- Fiola, K., Perreault, J. P. et Cousineau, B. (2006). Gene targeting in the Gram-Positive bacterium *Lactococcus lactis*, using various delta ribozymes. *Appl Environ Microbiol* 72: 869-79.
- Ge, Q., McManus, M. T., Nguyen, T., Shen, C. H., Sharp, P. A., Eisen, H. N. et Chen, J. (2003). 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* 100: 2718-23.
- Haasnoot, J., Westerhout, E. M. et Berkhout, B. (2007). RNA interference against viruses: strike and counterstrike. *Nat Biotechnol* 25: 1435-43.
- Hurt, A. C., Selleck, P., Komadina, N., Shaw, R., Brown, L. et Barr, I. G. (2007). Susceptibility of highly pathogenic A(H5N1) avian influenza viruses to the neuraminidase inhibitors and adamantanes. *Antiviral Res* 73: 228-31.
- Ilyinskii, P. O., Schmidt, T., Lukashev, D., Meriin, A. B., Thoidis, G., Frishman, D. et Shneider, A. M. (2009). Importance of mRNA secondary structural elements for the expression of influenza virus genes. *Omic* 13: 421-30.
- Khiabani, H., Trifonov, V. et Rabadan, R. (2009). Reassortment patterns in Swine influenza viruses. *PLoS One* 4: e7366.
- Kumar, P., Sood, V., Vyas, R., Gupta, N., Banerjee, A. C. et Khanna, M. (2010). Potent inhibition of influenza virus replication with novel siRNA-chimeric-ribozyme constructs. *Antiviral Res* 87: 204-12.
- Laine, S., Scarborough, R. J., Levesque, D., Didierlaurent, L., Soye, K. J., Mougel, M., Perreault, J. P. et Gagnon, A. (2011). In vitro and in vivo cleavage of HIV-1 RNA by new SOFA-HDV ribozymes and their potential to inhibit viral replication. *RNA Biol* 8: 343-53.

- Lazarev, V. N., Shmarov, M. M., Zakhartchouk, A. N., Yurov, G. K., Misurina, O. U., *et al.* (1999). Inhibition of influenza A virus reproduction by a ribozyme targeted against PB1 mRNA. *Antiviral Res* 42: 47-57.
- Levesque, D., Choufani, S. et Perreault, J. P. (2002). Delta ribozyme benefits from a good stability in vitro that becomes outstanding in vivo. *Rna* 8: 464-77.
- Levesque, M. V., Levesque, D., Briere, F. P. et Perreault, J. P. (2010). Investigating a new generation of ribozymes in order to target HCV. *PLoS One* 5: e9627.
- Lucier, J. F., Bergeron, L. J., Briere, F. P., Ouellette, R., Elela, S. A. et Perreault, J. P. (2006). RiboSubstrates: a web application addressing the cleavage specificities of ribozymes in designated genomes. *BMC Bioinformatics* 7: 480.
- Luscher-Mattli, M. (2000). Influenza chemotherapy: a review of the present state of art and of new drugs in development. *Arch Virol* 145: 2233-48.
- Maxwell, S. R. (2007). Tamiflu and neuropsychiatric disturbance in adolescents. *Bmj* 334: 1232-3.
- Moscona, A. (2009). Global transmission of oseltamivir-resistant influenza. *N Engl J Med* 360: 953-6.
- Nishikawa, F. et Nishikawa, S. (2000). Requirement for canonical base pairing in the short pseudoknot structure of genomic hepatitis delta virus ribozyme. *Nucleic Acids Res* 28: 925-31.
- Robbins, M., Judge, A., Ambegia, E., Choi, C., Yaworski, E., Palmer, L., McClintock, K. et MacLachlan, I. (2008). Misinterpreting the therapeutic effects of small interfering RNA caused by immune stimulation. *Hum Gene Ther* 19: 991-9.
- Robichaud, G. A., Perreault, J. P. et Ouellette, R. J. (2008). Development of an isoform-specific gene suppression system: the study of the human Pax-5B transcriptional element. *Nucleic Acids Res* 36: 4609-20.
- Tang, X. B., Hobom, G. et Luo, D. (1994). Ribozyme mediated destruction of influenza A virus in vitro and in vivo. *J Med Virol* 42: 385-95.
- ter Brake, O., Konstantinova, P., Ceylan, M. et Berkhout, B. (2006). Silencing of HIV-1 with RNA interference: a multiple shRNA approach. *Mol Ther* 14: 883-92.
- Tompkins, S. M., Lo, C. Y., Tumpey, T. M. et Epstein, S. L. (2004). Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8682-6.
- Trang, P., Lee, M., Nepomuceno, E., Kim, J., Zhu, H. et Liu, F. (2000). Effective inhibition of human cytomegalovirus gene expression and replication by a

ribozyme derived from the catalytic RNA subunit of RNase P from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5812-7.

W.H.O (2003). World Health Organization Fact sheet N°211.

Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M. et Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 56: 152-79.

Zhang, W., Wang, C. Y., Yang, S. T., Qin, C., Hu, J. L. et Xia, X. Z. (2009). Inhibition of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 replication by the small interfering RNA targeting polymerase A gene. *Biochem Biophys Res Commun* 390: 421-6.

Zhiqiang, W., Yaowu, Y., Fan, Y., Jian, Y., Yongfeng, H., Lina, Z., Jianwei, W. et Qi, J. (2010). Effective siRNAs inhibit the replication of novel influenza A (H1N1) virus. *Antiviral Res* 85: 559-61.

Zhou, H., Jin, M., Yu, Z., Xu, X., Peng, Y., *et al.* (2007). Effective small interfering RNAs targeting matrix and nucleocapsid protein gene inhibit influenza A virus replication in cells and mice. *Antiviral Res* 76: 186-93.

Zhou, K., He, H., Wu, Y. et Duan, M. (2008). RNA interference of avian influenza virus H5N1 by inhibiting viral mRNA with siRNA expression plasmids. *J Biotechnol* 135: 140-4.

**Publication no.2**

**A Chimeric Measles Virus with Canine Distemper Envelope Protects Ferrets from Lethal Distemper Challenge**

**Ronan Nicolas Rouxel, Nicholas Svitek, and Veronika von Messling\***

INRS-Institut Armand-Frappier, University of Quebec, Laval, Quebec

Received 17 April 2009/ Accepted 31 May 2009

Vaccine

2009, p. 4961-4966, Vol. 27

Dans cet article, j'ai construit le virus chimérique et j'ai effectué les caractérisations *in vitro* du virus chimérique et des virus parentaux. J'ai participé aux suivis des animaux et j'ai effectué l'isolement des leucocytes sanguins, les tests de prolifération lymphocytaire ainsi que tous les tests de neutralisation et sérologiques.

FOOTNOTES

\* Corresponding Author, Mailing Address:

INRS-Institut Armand-Frappier, University of Quebec, 531, boul. des Prairies, Laval, Quebec, H7V 1B7, Canada. Phone: (450) 687-5010. Fax: (450) 686-5309.

E-mail: veronika.vonmessling@iaf.inrs.ca

## **RÉSUMÉ**

Le CDV peut infecter une grande variété de carnivores, et durant les dernières décennies, le CDV a été responsable de plusieurs épidémies dans différentes populations sauvages de carnivores. Puisque le vaccin vivant-atténué actuellement disponible n'est pas suffisamment sécuritaire dans certaines espèces hautement susceptibles, nous avons construit un virus chimérique combinant le complexe de réplication de la souche vaccinale de la rougeole, la souche Moraten, avec l'enveloppe d'un isolat récent d'une souche sauvage du CDV. Le virus résultant ne causait pas de maladie ou d'immunosuppression chez le furet et leur conférait une protection lors d'un défi avec une souche sauvage létale, démontrant ainsi son potentiel dans les efforts de conservation des espèces sauvages.

## **ABSTRACT**

CDV infects a broad range of carnivores, and over the past several decades it has caused outbreaks in a variety of wild carnivore populations. Since the currently available live-attenuated vaccine is not sufficiently safe in these highly susceptible species, we produced a chimeric virus combining the replication complex of the measles Moraten vaccine strain with the envelope of a recent CDV wild type isolate. The resulting virus did not cause disease or immunosuppression in ferrets and conferred protection from challenge with a lethal wild type strain, demonstrating its potential value for wildlife conservation efforts.



## INTRODUCTION

Canine distemper virus (CDV) and measles virus (MeV) are related members of the genus *Morbillivirus* within the *Paramyxoviridae* family. Morbilliviruses cause severe disease in their respective hosts, which is characterized by fever, rash, diarrhea, nasal discharge, conjunctivitis and occasional neurologic complications (von Messling *et al.*, 2003, Moss et Griffin 2006). MeV has a narrow natural host range restricted to humans and certain non-humans primates, while CDV infects most of the carnivorous species including *Canidae*, *Mustelidae*, *Procyonidae*, and some *Felidae* (Barrett 1999). Over the past decades, CDV has caused several fatal outbreaks in wild carnivores, including the deaths of almost all African wild dogs (*Lycaon pictus*) in a Tanzanian reserve, about 10 000 Caspian seals (*Phoca caspica*), and around 35% of Serengeti lions (*Panthera leo*) in an African national park (Roelke-Parker *et al.*, 1996, van de Bildt *et al.*, 2002, Kuiken *et al.*, 2006).

These outbreaks have resulted in increasing interest in a safe and efficient CDV vaccine for highly susceptible species. The modified-live vaccine, which elicits robust immunity in dogs, retains sufficient virulence to cause severe disease and death in more susceptible species (Barrett 1999). In contrast, the recently approved recombinant canarypox vaccine, which expresses the CDV fusion (F) and hemagglutinin (H) proteins, is safe for all CDV host species but induces a weaker response, thus requiring regular re-immunization (Stephensen *et al.*, 1997). While repeat inoculations are easily integrated in routine care of zoo animals, this approach is less feasible in the context of wild life conservation efforts.

Even though MeV and CDV only cause disease in their respective hosts, artificial inoculation usually leads to an immune response with cross-reactive activity between the two viruses [8]. This has long been exploited by vaccinating puppies with the MeV vaccine in the presence of maternal antibodies. The resulting immune response includes epitopes conserved between MeV and CDV thereby conferring a certain level of protection (Sheshberadaran *et al.*, 1986). However, to induce long-term protection, these

animals will have to be re-immunized with the modified-live vaccine once the maternal antibodies have disappeared (Appel *et al.*, 1984), again reducing the applicability of this approach to wildlife.

To combine the benefit of the long-lasting CDV-specific immunity elicited by the live-attenuated vaccine with the safety associated with the heterotypic MeV immunization, we produced a chimeric virus, in which the replication complex of the MeV Moraten vaccine strain was combined with the envelope proteins of a recent wild type CDV strain. After evaluating the replication competence and growth phenotype of the chimeric virus in VerodogSLAMtag cells and ferret peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), its safety and efficacy was assessed in ferrets.

## MATERIALS AND METHODS

### Cells and viruses

VerodogSLAMtag (von Messling *et al.*, 2003) cells and 293T cells (ATCC CRL-1573) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM: Invitrogen) supplemented with 5% fetal calf serum (Invitrogen). The MeV Moraten vaccine strain (MVvac) [11], and the CDV wild type strain 5804P (von Messling *et al.*, 2003), its enhanced green fluorescent protein (eGFP)-expressing derivative 5804PeH [12] and the eGFP-expressing vaccine strain Onderstepoort (CDV-eGFP) (Suter *et al.*, 2005), were grown in VerodogSLAMtag cells.

### Generation of a chimeric MeV with the CDV envelope

Using extension PCR (Ho *et al.*, 1989), the untranslated region between the MeV phospho (P)- and matrix (M) protein genes was connected to the start of the CDV M gene up to the unique *SpeI* site, and the end of the hemagglutinin (H) gene from the *RsrII* site was connected to the MeV untranslated region between H and the polymerase (L) gene. The resulting fragments together with the *SpeI/RsrII* fragment obtained from p5804P by digestion were cloned into the MVvac backbone using the unique *SacII* and *SpeI* restriction sites, yielding MVvac58Penv. The recombinant virus was recovered as described before (Anderson et von Messling 2008). Briefly, the full-length plasmid was transfected into semiconfluent 293 cells together with MeV nucleoprotein (N), P, L, and T7 polymerase expression plasmids (Martin, Staeheli et Schneider 2006), using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Two days post-transfection, cells were transferred on VerodogSLAMtag cells seeded at 50% confluency, and syncytia were subsequently transferred on fresh VerodogSLAMtag cells to produce virus stocks.

For virus growth curve analyses, VerodogSLAMtag cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01. Samples were harvested daily for 5 days following the infection, and the cell-associated and cell-free virus titers were determined by limited dilution. Photographs were taken using an Eclipse TE2000-U microscope with a DXM1200F digital camera (Nikon).

## **Ferret vaccination and challenge experiments**

Unvaccinated male ferrets (*Mustela putoris furo*) 16 weeks or older (Marshall Farms) were used for all studies. The experiments were performed as described previously (von Messling *et al.*, 2003) and were approved by the institutional animal care and use committee of the INRS-Institut Armand-Frappier. Groups of three animals were infected intranasally or intramuscularly with  $10^5$  50% tissue culture infectious doses (TCID<sub>50</sub>) of MVvac58Penv or intranasally with  $10^5$  TCID<sub>50</sub> of 5804PeH. Body temperature and clinical signs were recorded daily, and blood samples were collected twice weekly for the first 2 weeks post-infection and weekly thereafter. To assess clinical disease severity, a three-step grading system was used. For rash, 0 represented no rash, 1 localized rash, and 2 generalized rash. Fever was graded 0 for no fever, 1 for temperatures above 39°C, or 2 for temperatures above 40°C, and weight loss was classified as 0 for 0 - 5% loss, 1 for 5-10% loss, or 2 for more than 10%. For the total white blood cell count, 10 ul of heparinized blood was added to 990 ul of a 3% solution of acetic acid, and nucleated cells were counted. Cell-associated viremia was quantified by limited dilution of infected white blood cells isolated from the same blood sample after hypotonic erythrocyte lysis, and expressed as TCID<sub>50</sub> per  $10^6$  cells, as previously described [11].

## **Antibody response assessment**

Total antiviral IgG antibodies were quantified by immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) as previously described (von Messling *et al.*, 1999). Briefly, VerodogSLAMtag cells in 96-well plates were infected with 5804P at an MOI of 0.01 and incubated at 37°C for 2 days until easily detectable syncytia appeared. The plates were then washed once with phosphate-buffered saline (PBS, Invitrogen), dried, and fixed at 65°C overnight. CDV-specific IgG antibodies in ferret serum samples were quantified by adding serial twofold dilutions to the plates, starting at a dilution of 1:100 in PBS, followed by incubation with a peroxidase-labeled, anti-ferret IgG secondary antibody (Bethyl). Virus-specific staining was visualized by staining with 3-amino-9-ethylcarbazole solution (Sigma), and titers were expressed as reciprocals of the highest antibody dilution at which viral antigen was detected by light microscopy.

Neutralizing antibodies were quantified by serum neutralization assay. Briefly, serial dilutions of serum samples starting at a dilution of 1:10 were incubated with  $10^2$  TCID<sub>50</sub> of CVD-eGFP and incubated for 15 min, before,  $3 \times 10^4$  VerodogSLAMtag cells were added. Plates were read once syncytia formation was readily recognizable after 3 days, and the titer was expressed as the reciprocal dilution at which syncytia formation was first detected.

### ***In vitro* infection of PBMCs**

Ficoll-purified PBMCs were seeded in 12-well plates, activated with 100 µg/ml phytohemagglutinin (PHA, Sigma) for 4h, and infected with 5804P, MVvac58Penv or MVvac, respectively, at a MOI of 0.01. Supernatants and cells were harvested daily for 4 days, and the number of infected cells was quantified by flow cytometry after staining with either a fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated polyclonal goat antiserum directed against CDV (VMRD) for 5804P, or a FITC-conjugated monoclonal antibody directed against the MeV nucleoprotein (Chemicon International) for MVvac and MVvac58Penv. The virus titer in the supernatants was quantified by limited dilution method.

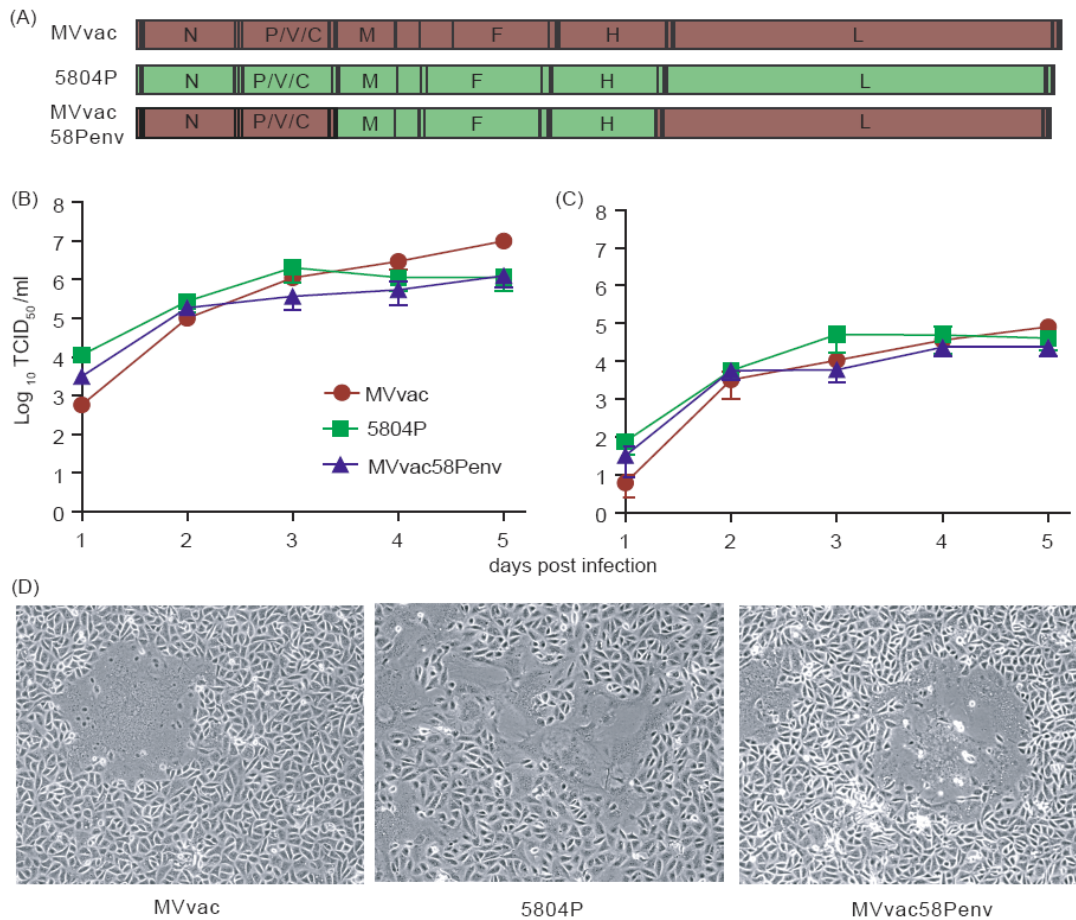
## RESULTS

### **The chimeric MVvac58Penv virus retains a parental growth phenotype**

Even though the currently available live-attenuated CDV vaccines are safe and highly efficacious in dogs, they remain virulent in highly susceptible species, and are therefore unsuitable for wildlife conservation efforts (Barrett 1999). To retain the long-term immunity induced by a live-attenuated vaccine but eliminate any risk of disease development, we produced a chimeric MeV vaccine strain that carries the envelope of a recent CDV wild type isolate (Fig. 1A). In VerodogSLAMtag cells, which are equally permissive to MeV and CDV infection, the chimeric virus displayed growth characteristics similar to the parental strains, with cell-associated virus titers one to two logs above the respective cell-free titers (Fig. 1B and C). No differences in syncytia phenotype were observed in these cells (Fig. 1D), indicating that the envelope transfer did not affect the viability of the chimeric virus *in vitro*.

### **MVvac58Penv replicates efficiently in ferret PBMCs**

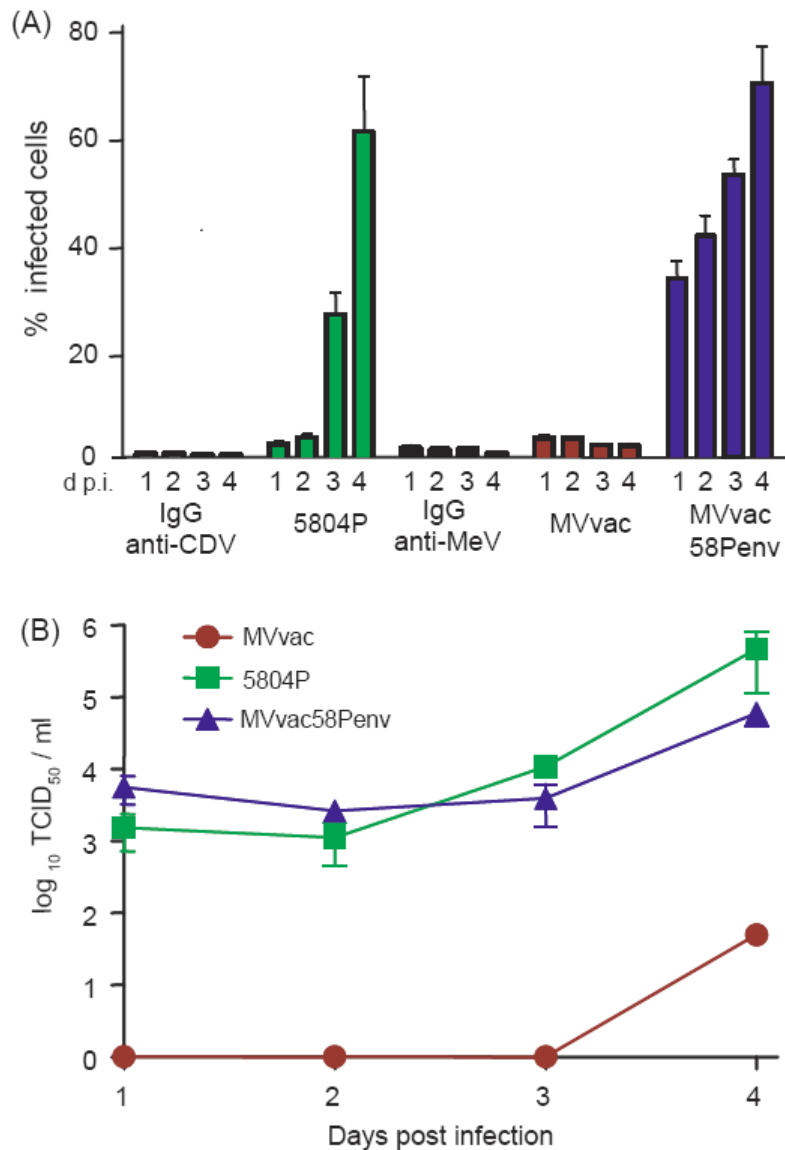
Immune cells are one of the main morbillivirus targets, and the extent of their infection influences disease severity as well as the kinetics of the antiviral immune response (von Messling *et al.*, 2003, de Swart *et al.*, 2007). To determine the ability of the chimeric virus to establish a productive infection in immune cells of one of its natural hosts, PHA-activated ferret PBMCs were infected with the chimeric or parental viruses at a MOI of 0.01. Quantification of infected cells by flow cytometry revealed that 5804P infection resulted in a gradual increase starting after two days, reaching around 50% after four days, while MVvac was unable to replicate in ferret cells (Fig. 2A). The chimeric MVvac58Penv led to 25% infected cells within the first 24 h, and infection levels consistently increased to reach over 50% after four days (Fig. 2A). However, this faster dissemination did not result in higher virus production (Fig. 2B), suggesting that the overall replication efficiency of the chimeric virus in ferret PBMCs is similar to the parental wild type CDV strain.



**Figure 1**

**Generation and *in vitro* characterization of a chimeric MeV with CDV envelope.**

(A) Schematic drawing of the parental CDV and MeV and the chimeric virus generated. The genomes are drawn to scale. Gray or white boxes represent open reading frames and untranslated regions, originating from the MeV or CDV backbone, respectively. The genes are indicated by their respective abbreviation. (B and C) Growth curves of the parental viruses MVvac and 5804P and the chimeric virus MVvac58Penv in VerodogSLAMtag cells expressed as titers of cell-associated (B) and released virus (C). Cells were infected with a multiplicity of infection (MOI) of 0.01, and samples were harvested daily for five days. Titers are expressed as 50% tissue culture infectious doses (TCID<sub>50</sub>). Data points represent the average of at least four experiments, and error bars indicate the standard deviation. (D) Syncytia formation in VerodogSLAMtag cells. Cells were infected with a MOI of 0.01 and overlaid with 0.5% methylcellulose. Photographs were taken 72 h post infection using phase contrast at 100x magnification.



**Figure 2**

**Infection and dissemination characteristics of the different viruses in ferret peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).** Ficoll-purified ferret PBMCs were activated with 10 $\mu$ g/ml phytohemagglutinin for 4 h prior to infection with MVvac, 5804P, or MVvac58Penv at a MOI of 0.01. **(A)** Proportion of infected cells and **(B)** virus production over 4 days after infection. Cells were harvested daily and stained with a directly FITC-labeled anti-CDV, for 5804P, or anti-MeV antibody, for MVvac and MVvac58Penv, recognizing the N protein. The percentage of infected cells was determined by flow cytometry, using as control uninfected PBMCs stained with the respective antibody. Cell-free virus production was assessed by titration of the supernatant from harvested cells using limited dilution method. Titers are expressed as TCID<sub>50</sub>. Data points represent the average of at least four experiments, and error bars indicate the standard deviation.

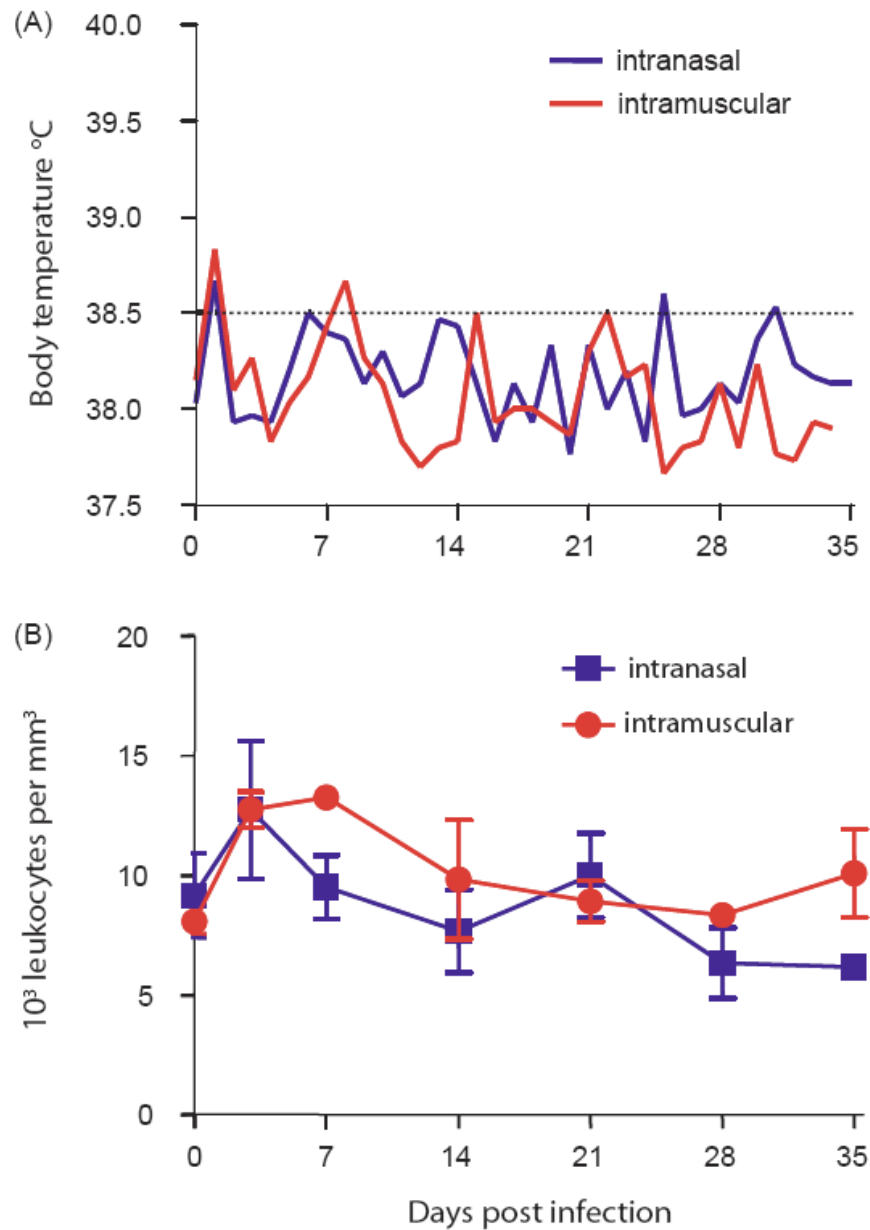


### **MVvac58Penv elicits a robust antibody response without causing disease in ferrets**

Ferrets succumb to the infection with wild type strains 3-5 weeks after infection, thereby mirroring the sensitivity many of the wild carnivores threatened by CDV outbreaks. To assess the virulence of the chimeric MVvac58Penv, we inoculated groups of three ferrets either intranasally or intramuscularly with  $10^5$  TCID<sub>50</sub>. None of the animals developed fever (Fig. 3A), weight loss, rash, or other clinical signs (data not shown), and not even a transient leukopenia was observed (Fig. 3B). Weak cell-associated viremia close to the detection level of 10 TCID<sub>50</sub> was observed at day 7 after infection in two out of three animals in each group (data not shown), demonstrating that the immunization resulted in limited systemic dissemination regardless of the route of inoculation. All animals mounted a strong antiviral antibody response (Fig. 4A), and developed detectable neutralizing antibody titers around 80 (Fig. 4B), which is considered the cutoff for protection.

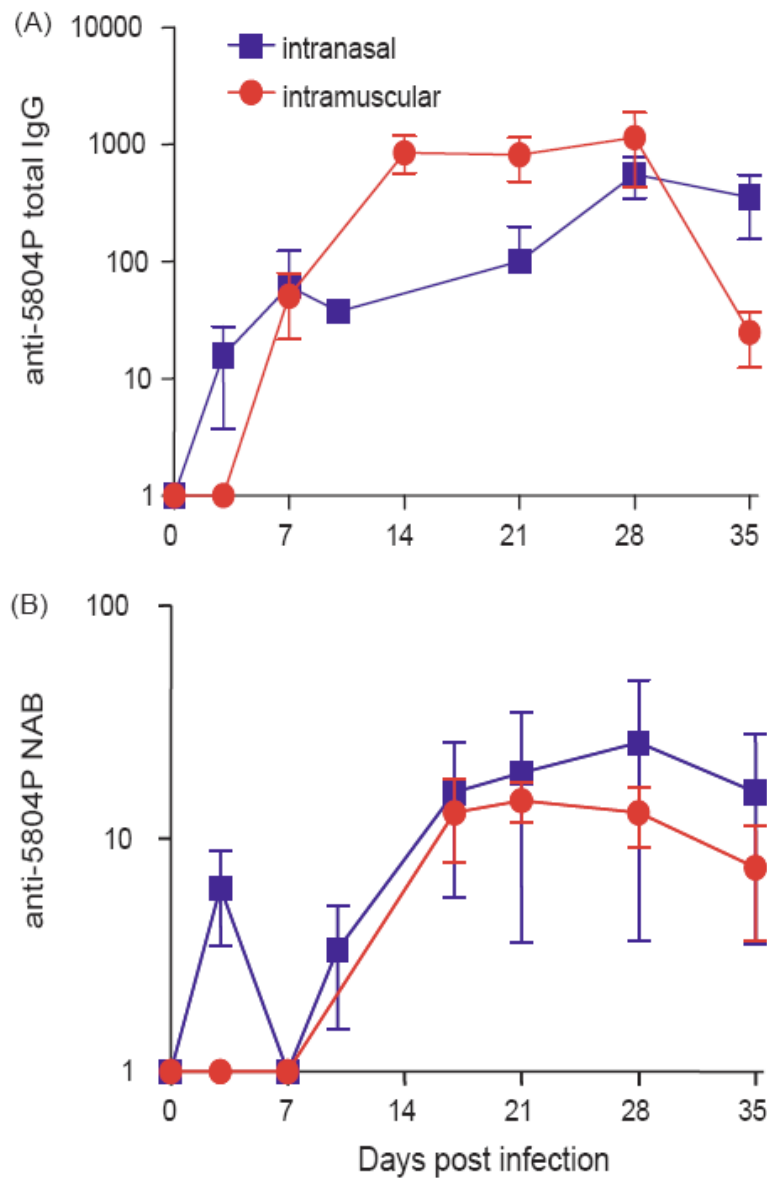
### **Immunization with MVvac58Penv protects from lethal challenge**

To evaluate the protection conferred by vaccination with MVvac58Penv, the animals were challenged two months after vaccination with  $10^5$  TCID<sub>50</sub> of 5804PeH, which is lethal for ferrets within 2-3 weeks (von Messling, Milosevic et Cattaneo 2004). This virus expresses GFP from an additional open reading frame introduced between the H and L genes, enabling the direct identification of infected cells. All vaccinated ferrets survived the challenge while unvaccinated control animals had to be euthanized on day 12 after infection because they had reached experimental end points. These animals started to develop an increase in body temperature and weight loss around one week after infection, coinciding with the onset of rash, conjunctivitis, and stomatitis (Fig. 5A and B). Both, fever and weight loss, accelerated over the next days, leaving the animals increasingly dehydrated. In contrast, vaccinated ferrets developed at most a mild transient rash between days 8 and 12, and experienced no change in body temperature or weight loss. Even the age-appropriate weight gain of animals in the intranasally vaccinated groups, which were at the end of their growing phase at the time of challenge, continued uninterrupted. Low levels of cell-associated



**Figure 3**

**Immunization of ferrets with MVvac58Penv.** (A) Body temperature and (B) leukocyte count of immunized animals. Groups of three ferrets were inoculated intranasally or intramuscularly with  $10^5$  TCID<sub>50</sub> of MVvac58Penv. Animals were observed daily for 5 weeks after inoculation, and the body temperature was measured. Blood samples were collected twice weekly during the first week and weekly thereafter. Leukocytes were counted at each time points. Data points represent the average of each group, and error bars indicate the standard deviation.



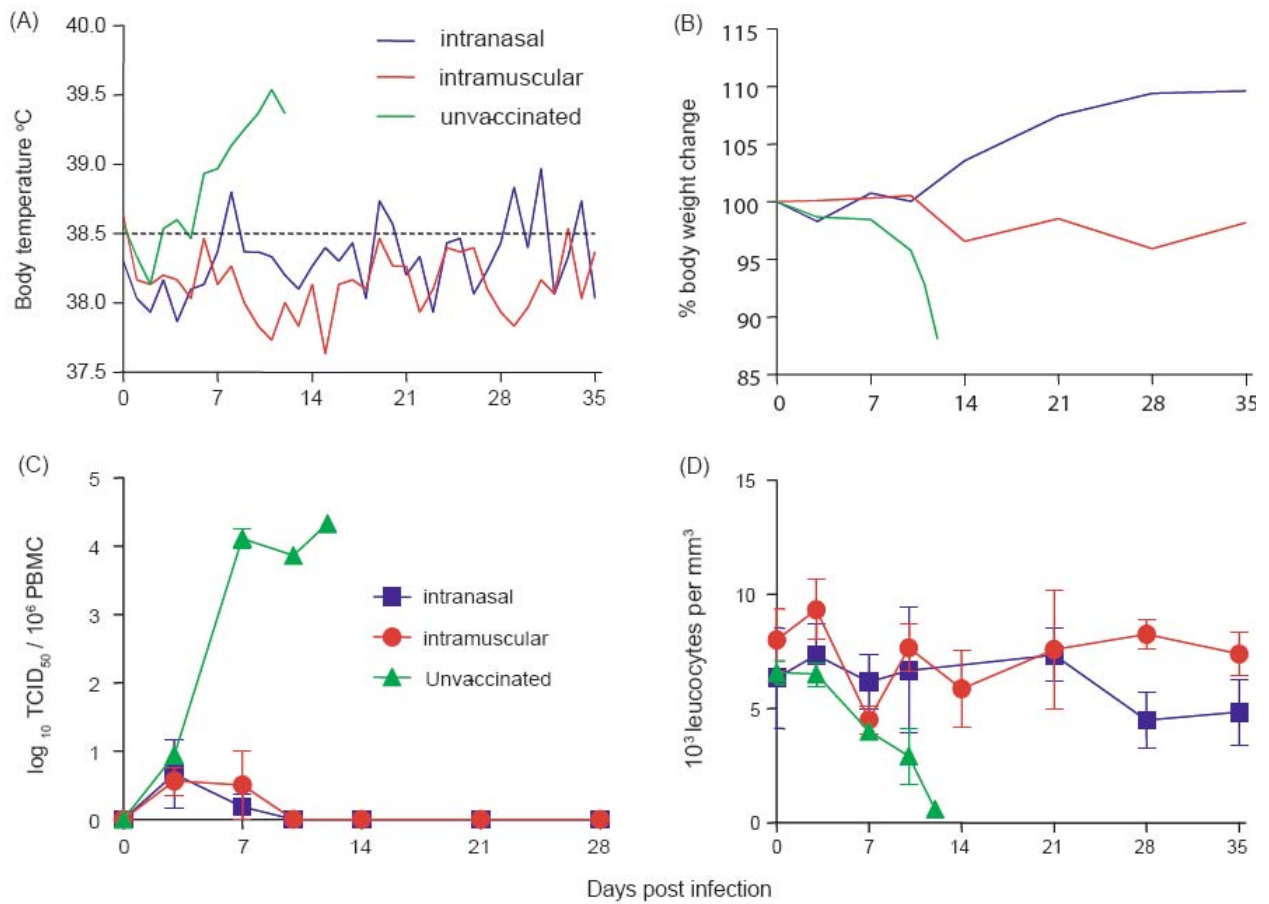
**Figure 4**

**Antibody response after immunization.** (A) Total IgG and (B) neutralizing antibody (NAB) titers detected at different time points over 5 weeks following intranasal or intramuscular immunization with MVvac58Penv. Total IgG antibodies were quantified by IPMA, and neutralizing antibodies were measured by serum neutralization assay against CDV. Titers are expressed as reciprocals of the highest antibody dilution at which viral antigen or syncytia formation were observed. Data points represent the average of each group, and error bars indicate the standard deviation.

virus were detected in all animals on day 3. However, the vaccinated ferrets controlled the infection, and all virus was cleared by day 10, whereas unvaccinated animals showed the characteristic increase in virus titers, reaching values above  $10^4$  infectious doses per  $10^6$  cells (Fig. 5C). This increase in cell-associated viremia correlated with a dramatic drop in leukocyte numbers (Fig. 5D). In contrast, intramuscularly inoculated group displayed only a mild leucopenia on day 7, and the intranasally immunized animals maintained a stable leukocyte count throughout the challenge (Fig. 5D).

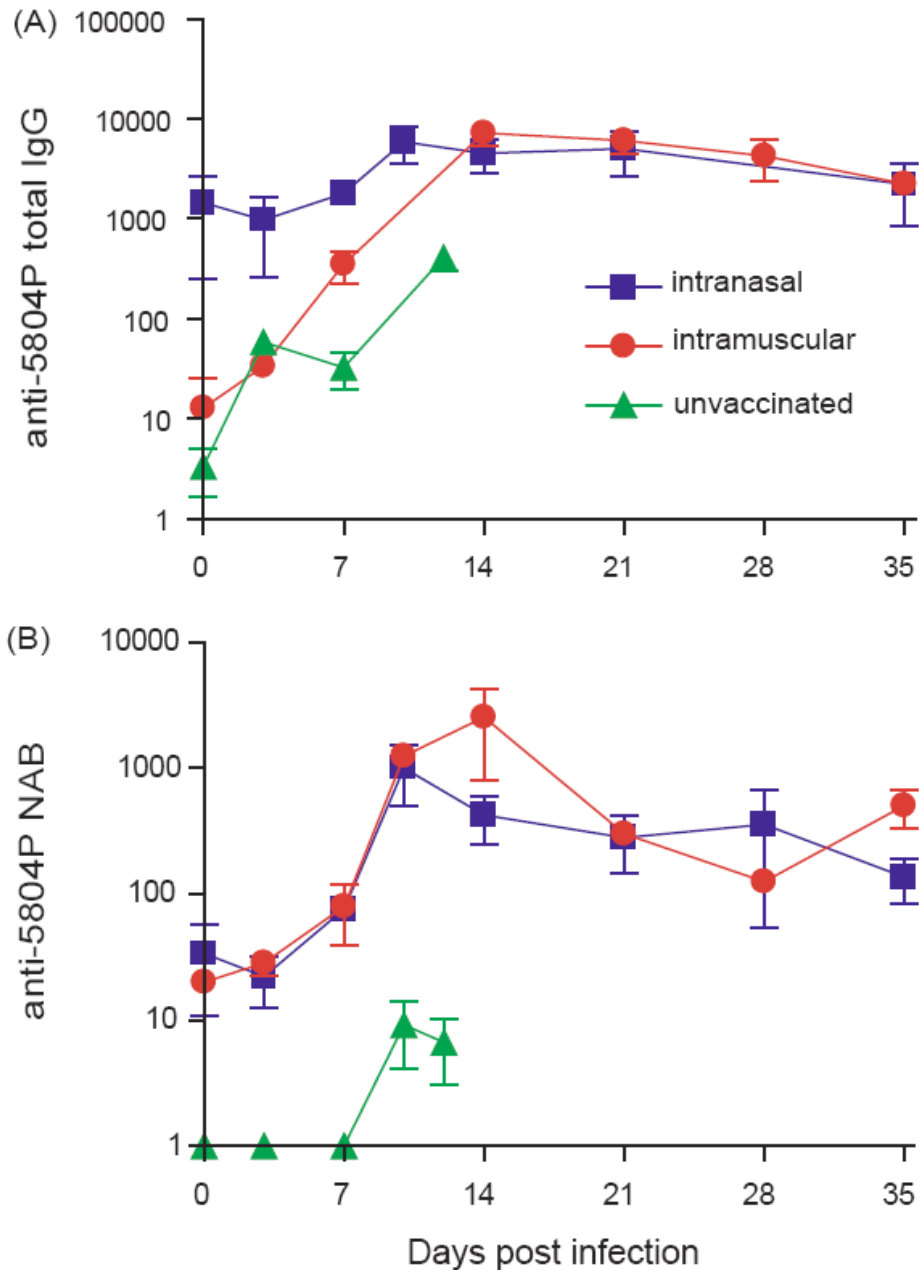
### **Intranasal immunization elicits a more sustained antibody response**

The analysis of total and neutralizing antibody titers at the time of challenge revealed that both groups had upheld the neutralizing antibody levels, but only the animals inoculated intranasally had also maintained the total IgG titers (Fig. 6A and B). The total IgG titer remained stable in that group, while the intramuscularly vaccinated animals experienced a rapid increase between 3 and 14 days after infection, ultimately reaching similar levels (Fig. 6A). Both groups experienced a hundredfold increase in neutralizing antibody titers starting in the first week after infection and resulting in a more than tenfold increase after five weeks (Fig. 6B). Despite their inability to control and clear the virus, unvaccinated animals developed low levels of antibodies that, in the case of the neutralizing antibody response, decreased before death.



**Figure 5**

**Lethal challenge experiment.** The two vaccinated groups and an unvaccinated control group were challenged intranasally with  $10^5$  TCID<sub>50</sub> of the 5804PeH wild type strain. (A) Body temperature and (B) weight change over the course of the disease. Temperatures were measured daily, and the animals were weighed twice weekly for the first two weeks and weekly thereafter. (C) Course of cell-associated viremia displayed as the number of CDV-infected cells per million peripheral blood mononuclear cells (PBMC). (D). Total leukocyte count determined every time blood samples were collected. Data points represent the average of each group, and error bars indicate the standard deviation.



**Figure 6**

**Antibody response after challenge.** (A) Total IgG and (B) neutralizing antibody (NAB) titers detected at the time of challenge with 5804PeH and at different time points over five weeks thereafter. Total IgG antibodies were quantified by IPMA, and neutralizing antibodies were measured by serum neutralization assay against CDV. Titers are expressed as reciprocals of the highest antibody dilution at which viral antigen or syncytia formation were observed. Data points represent the average of each group, and error bars indicate the standard deviation.

## DISCUSSION

CDV causes a devastating disease in many wild carnivores, and mortality rates over 90% can result in critical depletion of endangered or isolated populations (Appel et Summers 1995, Barrett 1999). Even though the live-attenuated vaccine is safe and efficient in dogs, it remains too virulent for many of those species (Carpenter *et al.*, 1976). The more recently developed recombinant canarypox vaccine is safe, since it cannot replicate in mammalian cells, but requires repeat inoculations to reliably induce protection (Stephensen *et al.*, 1997). Building on a previous report that a rinderpest virus (RPV) carrying the peste-de-petits-ruminants (PPRV) envelope protected goats from PPRV (Mahapatra *et al.*, 2006), we generated a chimeric virus combining the MVvac replication complex with the envelope of the CDV wild type strain 5804P, and evaluated its immunogenicity and protection against lethal challenge.

Morbilliviruses share a common genome structure, and high structural and functional homology of their viral proteins has been demonstrated by transcomplementation of their F and H proteins (von Messling *et al.*, 2001) and replication complexes (Brown *et al.*, 2005). Chimeric viruses composed of different combinations of genes originating from closely related members of this genus have also illustrated the limits of these transcomplementations in the viral context, as rinderpest viruses that express the PPRV F and H proteins are severely impaired while other combinations replicate efficiently (Mahapatra *et al.*, 2006, Bonami, Rudd et von Messling 2007, Parida *et al.*, 2007). The similarities in replication efficiency and syncytia phenotype observed between the parental and chimeric viruses in VerodogSLAMcells, which are equally permissive to MeV and CDV infection, demonstrate the functional interchangeability of these viruses' envelope and replication complex.

Despite the ability of MeV to recognize and use canine SLAM as receptor when expressed different cell lines (Tatsuo, Ono et Yanagi 2001), MVvac was unable to establish a productive infection in PHA-activated ferret PBMCs. In contrast, the CDV wild type strain and the chimeric virus efficiently infected these cells, reaching infection

levels above 50% within 4 days. Since the kinetics of virus release were similar for both viruses, the earlier detection of the chimeric virus is likely due to differences in antibody reactivity rather than its more rapid replication. However, the observed similarity of infection between the parental CDV strain and the chimeric virus indicates that entry efficiency in immune cells constitutes a main morbillivirus host range determinant.

For most live-attenuated vaccines, including those against MeV and CDV, the exact mechanism and genetic determinants of attenuation remain elusive. The resulting safety concern is best illustrated by reports of severe or fatal disease in more susceptible species after vaccination with the approved live-attenuated CDV vaccine, which is completely attenuated in dogs (Carpenter *et al.*, 1976, Appel et Summers 1995). Sequence comparison of the wild type Edmonston isolate and the currently used Edmonston-based vaccine strains revealed coding and non-coding differences distributed throughout the genome, indicating that attenuation is most likely multifactorial (Parks *et al.*, 2001). The contribution of a reduced replication efficacy and tropism differences due to the CD46 binding ability of vaccine strains have been suggested (Valsamakis, Kaneshima et Griffin 2001, Condack *et al.*, 2007), but their respective importance remains to be determined in an appropriate animal model. The attenuation of the chimeric virus observed in our study is thus likely due to a combination of the already present attenuating mutations in the MVvac replication complex with the maladaptation of the individual viral proteins, especially the V and C proteins involved in immune response interference (Devaux *et al.*, 2008), to a species that is not part of its natural host range.

Vaccination of ferrets with the chimeric virus did not result in clinical signs or immunosuppression, regardless of the route of inoculation, and protected the animals from challenge with a lethal wild type strain. Even though both groups developed a sustained neutralizing antibody response, only the intranasally inoculated animals also maintained a high level of total anti-CDV antibodies, which subsequently resulted in the complete absence of leukopenia during challenge. In addition to demonstrating the efficacy of intranasal inoculation for a live-attenuated vaccine, which had so far only been shown for the recombinant canarypox vaccine (Welter *et al.*, 1999), this observation also



highlights the importance of a more natural route of inoculation for the development of an efficient immune response.

Taken together, our study provides proof-of-principle for the safety and efficacy of the chimeric virus as a CDV vaccine for highly susceptible species, and justifies further evaluation involving different species and virus strains.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank all laboratory members for continuing support and lively discussions, and C. Thibault for excellent technical support. This work was supported by grants from the CIHR (MOP-66989), NSERC (299385-04), and CFI (9488) to V.v.M

## REFERENCES

- Anderson, D. E. et von Messling, V. (2008). Region between the canine distemper virus M and F genes modulates virulence by controlling fusion protein expression. *J Virol* 82: 10510-8.
- Appel, M. J., Shek, W. R., Shesberadaran, H. et Norrby, E. (1984). Measles virus and inactivated canine distemper virus induce incomplete immunity to canine distemper. *Arch Virol* 82: 73-82.
- Appel, M. J. et Summers, B. A. (1995). Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Vet Microbiol* 44: 187-91.
- Barrett, T. (1999). Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. *Vet Microbiol* 69: 3-13.
- Bonami, F., Rudd, P. A. et von Messling, V. (2007). Disease duration determines canine distemper virus neurovirulence. *J Virol* 81: 12066-70.
- Brown, D. D., Collins, F. M., Duprex, W. P., Baron, M. D., Barrett, T. et Rima, B. K. (2005). 'Rescue' of mini-genomic constructs and viruses by combinations of morbillivirus N, P and L proteins. *J Gen Virol* 86: 1077-81.
- Carpenter, J. W., Appel, M. J., Erickson, R. C. et Novilla, M. N. (1976). Fatal vaccine-induced canine distemper virus infection in black-footed ferrets. *J Am Vet Med Assoc* 169: 961-4.
- Condack, C., Grivel, J. C., Devaux, P., Margolis, L. et Cattaneo, R. (2007). Measles virus vaccine attenuation: suboptimal infection of lymphatic tissue and tropism alteration. *J Infect Dis* 196: 541-9.
- de Swart, R. L., Ludlow, M., de Witte, L., Yanagi, Y., van Amerongen, G., et al. (2007). Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques. *PLoS Pathog* 3: e178.
- Devaux, P., Hodge, G., McChesney, M. B. et Cattaneo, R. (2008). Attenuation of V- or C-defective measles viruses: infection control by the inflammatory and interferon responses of rhesus monkeys. *J Virol* 82: 5359-67.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. et Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77: 51-59.

- Kuiken, T., Kennedy, S., Barrett, T., Van de Bildt, M. W., Borgsteede, F. H., *et al.* (2006). The 2000 canine distemper epidemic in Caspian seals (*Phoca caspica*): pathology and analysis of contributory factors. *Vet Pathol* 43: 321-38.
- Mahapatra, M., Parida, S., Baron, M. D. et Barrett, T. (2006). Matrix protein and glycoproteins F and H of Peste-des-petits-ruminants virus function better as a homologous complex. *J Gen Virol* 87: 2021-9.
- Martin, A., Staeheli, P. et Schneider, U. (2006). RNA polymerase II-controlled expression of antigenomic RNA enhances the rescue efficacies of two different members of the Mononegavirales independently of the site of viral genome replication. *J Virol* 80: 5708-15.
- Moss, W. J. et Griffin, D. E. (2006). Global measles elimination. *Nat Rev Microbiol* 4: 900-8.
- Parida, S., Mahapatra, M., Kumar, S., Das, S. C., Baron, M. D., Anderson, J. et Barrett, T. (2007). Rescue of a chimeric rinderpest virus with the nucleocapsid protein derived from peste-des-petits-ruminants virus: use as a marker vaccine. *J Gen Virol* 88: 2019-27.
- Parks, C. L., Lerch, R. A., Walpita, P., Wang, H. P., Sidhu, M. S. et Udem, S. A. (2001). Comparison of predicted amino acid sequences of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage. *J Virol* 75: 910-20.
- Roelke-Parker, M. E., Munson, L., Packer, C., Kock, R., Cleaveland, S., *et al.* (1996). A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature* 379: 441-5.
- Sheshberadaran, H., Norrby, E., McCullough, K. C., Carpenter, W. C. et Orvell, C. (1986). The antigenic relationship between measles, canine distemper and rinderpest viruses studied with monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 67 ( Pt 7): 1381-92.
- Stephensen, C. B., Welter, J., Thaker, S. R., Taylor, J., Tartaglia, J. et Paoletti, E. (1997). Canine distemper virus (CDV) infection of ferrets as a model for testing Morbillivirus vaccine strategies: NYVAC- and ALVAC-based CDV recombinants protect against symptomatic infection. *J Virol* 71: 1506-13.
- Suter, S. E., Chein, M. B., von Messling, V., Yip, B., Cattaneo, R., Vernau, W., Madewell, B. R. et London, C. A. (2005). In vitro canine distemper virus infection of canine lymphoid cells: a prelude to oncolytic therapy for lymphoma. *Clin Cancer Res* 11: 1579-87.
- Tatsuo, H., Ono, N. et Yanagi, Y. (2001). Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *J Virol* 75: 5842-50.

- Valsamakis, A., Kaneshima, H. et Griffin, D. E. (2001). Strains of measles vaccine differ in their ability to replicate in an damaged human thymus. *J Infect Dis* 183: 498-502.
- van de Bildt, M. W., Kuiken, T., Visee, A. M., Lema, S., Fitzjohn, T. R. et Osterhaus, A. D. (2002). Distemper outbreak and its effect on African wild dog conservation. *Emerg Infect Dis* 8: 211-3.
- von Messling, V., Harder, T. C., Moennig, V., Rautenberg, P., Nolte, I. et Haas, L. (1999). Rapid and sensitive detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against canine distemper virus by a new recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 37: 1049-56.
- von Messling, V., Milosevic, D. et Cattaneo, R. (2004). Tropism illuminated: lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14216-21.
- von Messling, V., Springfield, C., Devaux, P. et Cattaneo, R. (2003). A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. *J Virol* 77: 12579-91.
- von Messling, V., Zimmer, G., Herrler, G., Haas, L. et Cattaneo, R. (2001). The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *J Virol* 75: 6418-27.
- Welter, J., Taylor, J., Tartaglia, J., Paoletti, E. et Stephensen, C. B. (1999). Mucosal vaccination with recombinant poxvirus vaccines protects ferrets against symptomatic CDV infection. *Vaccine* 17: 308-18.

**Publication no.3**

**Generation and Characterisation of a Live-Attenuated Morbillivirus-Based  
Influenza Candidate Vaccine**

**R. N. Rouxel<sup>1</sup>, L-É. Bastien-Hamel<sup>1</sup>, V. von Messling<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup> INRS-Institut Armand-Frappier, University of Quebec, Laval, Quebec, Canada

<sup>2</sup> Emerging Infectious Diseases Program, Duke-NUS Graduate Medical School, Singapore

En préparation

Dans cet article, j'ai produit l'antisérum biotinylé dirigé contre l'IFN $\gamma$  de furet. J'ai également mis en place et optimisé le test d'ELISpot contre cette cytokine. J'ai par ailleurs construit les différents virus recombinants et effectué l'ensemble des caractérisations *in vitro* de ces virus. J'ai également préparé les figures et rédigé le premier brouillon du manuscrit.

FOOTNOTES

\*Corresponding Author, Mailing Address:

Emerging Infectious Diseases Program, Duke-NUS Graduate Medical School, 8 College Road, Singapore 169857, Singapore, phone: +65 6601 1372, fax: +65 6221 2529, e-mail: [veronika.vonmessling@duke-nus.edu.sg](mailto:veronika.vonmessling@duke-nus.edu.sg)

Running title: CDV-Based Influenza Vaccine

## RÉSUMÉ

Les réponses immunitaires induites par les vaccins inactivés couramment utilisés sont spécifiquement dirigées contre les souches ciblées et se limitent aux anticorps dirigés contre les glycoprotéines hémagglutinine (HA) et neuraminidase (NA). Le vaccin vivant-atténué récemment approuvé induit une plus vaste réponse cellulaire T et B chez les individus naïf, mais les réponses induites chez des individus ayant une immunité préexistante sont variables et le risque de réassortiment limite leur utilisation aux sous-types actuellement circulants. Les vaccins basés sur des vecteurs viraux ont le potentiel d'amoindrir ces risques tout en induisant une réponse immunitaire cellulaire et humorale même en présence d'une immunité préexistante contre le virus de l'influenza. Afin de caractériser le potentiel de la plateforme vaccinale morbillivirus, nous avons utilisé le virus de la maladie de Carré (CDV) qui, comme le virus de l'influenza, infecte naturellement les furets. Nous avons tout d'abord produit un antisérum biotinylé spécifiquement dirigé contre l'interféron (IFN)  $\gamma$  de furet afin de pouvoir quantifier la réponse cellulaire en IFN $\gamma$  lors d'un test d'ELISpot. Par la suite, nous avons généré des virus recombinant du CDV basés sur la souche vaccinale Onderstepoort, exprimant la nucléoprotéine et la protéine HA, seule ou en combinaison, du virus de l'influenza H1N1 saisonnier, la souche USSR/90/77. Tous les virus recombinants ont conservé l'efficacité de réplication du virus CDV parental et exprimaient leurs protéines d'influenza respectives à des niveaux détectables. À l'aide de ces outils, nous pouvons désormais valider le potentiel des morbillivirus comme plateforme vaccinale contre le virus de l'influenza.

## ABSTRACT

Immune responses induced by currently used inactivated influenza vaccines are highly strain-specific and mostly limited to a humoral response against the hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) glycoproteins. The recently approved live-attenuated vaccine results in a broader T and B cell response in naïve individuals, but responses in individuals with pre-existing immunity are variable, and the risk of reassortment limits its use to currently circulating subtypes. Viral vector-based vaccine platforms have the potential to alleviate these safety concerns, while inducing cellular and humoral immune responses even in the presence of a pre-existing immunity against influenza. To characterize the potential of the morbillivirus vaccine platform, we used canine distemper virus (CDV), which, like influenza, naturally infects ferrets. We first produced a ferret interferon (IFN)  $\gamma$ -specific biotinylated antiserum enabling a quantitative assessment of ferret IFN $\gamma$  responses by ELISpot assay. Next, recombinant CDVs based on the vaccine strain Onderstepoort expressing the nucleoprotein and the HA protein of the seasonal H1N1 influenza strain USSR/90/77 individually or in combination were generated. All recombinant viruses retained the parental replication efficacy and expressed the respective influenza proteins at detectable levels. By generating these tools, we are now in a good position to validate morbilliviruses as an influenza vaccine platform.



## INTRODUCTION

Influenza A viruses are one of the main causes of seasonal influenza epidemics, and emergence of antigenetically new variants can lead to devastating pandemics. Seasonal influenza alone is responsible for up to 500 000 deaths worldwide every year, and this number is expected to increase up to several millions during a severe pandemic (Potter 2001, W.H.O. 2009). Live-attenuated (LAIV) and inactivated (IV) vaccines available for seasonal influenza require annual renewal in response to the continuous antigenic drift. Furthermore, vaccine efficacy greatly depends on the patient infection and vaccination history (Ambrose, Levin et Belshe 2010). While IV induce a predominantly humoral response against the influenza virus glycoproteins hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA), LAIV have the potential to elicit a cellular and humoral response against all viral proteins (Monto *et al.*, 2009, Hoft *et al.*, 2011). However, their efficacy in individuals with pre-existing immunity is difficult to predict, and the possibility of reassortment with circulating influenza strains cannot be excluded, making them unsuitable for vaccination strategies targeting non-circulating strains (W.H.O. 2007, Fan *et al.*, 2009, Min *et al.*, 2010).

Traditionally, influenza vaccines are produced in embryonated chicken eggs, which can lead to delays when the respective vaccine strain either does not replicate well in eggs or rapidly kills the embryo, as seen for highly pathogenic avian viruses (Gerdil 2003, El Sahly et Keitel 2008). The use of a viral vector-based vaccine platform has the potential to alleviate the safety concerns associated with the current live-attenuated vaccines, while continuing to induce cellular and humoral immune responses, and provides validated production processes independent of the influenza glycoproteins expressed (Kopecky-Bromberg et Palese 2009). Adeno- and poxviral vectors are most frequently used, but the potential of measles virus (MeV), a member of the morbillivirus genus, as vaccine platform is increasingly investigated due to its ability to induce strong and long-lasting immune responses, even in the presence of pre-existing immunity (Dilraj *et al.*, 2000, Zuniga *et al.*, 2007).

MeV live-attenuated vaccines have been used for more than 60 years and are considered one of the safest and most efficacious vaccines currently available (Moss et Griffin 2006). The MeV genome tolerates the insertion of several additional genes without loss of replication efficiency (Zuniga *et al.*, 2007), and the immune response against the inserted antigen follows the same kinetics as the response against morbilliviral proteins (Singh, Cattaneo et Billeter 1999,

Lorin *et al.*, 2004, Zuniga *et al.*, 2007). To evaluate the potential of a morbillivirus-based vaccine platform to improve influenza vaccines, we took advantage of the closely related carnivore morbillivirus canine distemper virus (CDV), for which a live-attenuated vaccine with similar characteristics is available (Barrett 1999). CDV naturally infects ferrets, which are also susceptible to human influenza viruses (Pillet, Svitek et von Messling 2009, Belser, Katz et Tumpey 2011), thus allowing an efficacy assessment of both vaccine components.

To enable a quantitative assessment of the cellular host response, we first produced a ferret IFN $\gamma$ -specific biotinylated antiserum and evaluated the resulting increase in sensitivity of our ferret IFN $\gamma$  ELISpot assay. We then generated a recombinant CDV based on the vaccine strain Onderstepoort (von Messling *et al.*, 2001) expressing the nucleoprotein (NP) and HA protein of the seasonal H1N1 influenza strain USSR/90/77 individually or in the same virus. After evaluating the replication efficacy of the recombinant viruses, we determined the presence of the influenza proteins in infected cells and viral particles. By generating these tools, we are now in a good position to validate morbilliviruses as an influenza vaccine platform.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Production and purification of recombinant ferret IFN $\gamma$**

The ferret IFN $\gamma$  (ftIFN $\gamma$ ) gene lacking the signal peptide sequence was cloned into the bacterial expression vector pET32a (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), which adds a histidine tag (HisTag) to the amino-terminus of the protein, and a clone with the correct sequence was transformed into *Escherichia coli* Origami2 (DE3) competent cells (Novagen) as described previously (Rudd, Bastien-Hamel et von Messling 2010). Bacteria were cultured in Luria-Bertani (LB) media with ampicillin and tetracycline, and recombinant protein expression was induced by adding 1mM of IPTG (Fisher Thermo Scientific, Ottawa, Canada) once the culture reached 0.8 O.D. at 600 nm. Bacteria were then pelleted, lysed in Protino LEW buffer with 1 mg/ml of lysozyme (NEB, Pickering, Ontario, Canada), and sonicated. The recombinant ftIFN $\gamma$  was isolated on a Protino Ni-TED 200 column (Macherey-Nagel Bethlehem, PA, USA) according to the manufacturer's instruction, and purification efficacy was evaluated by Western blot analysis.

### **Generation of a biotinylated ftIFN $\gamma$ -specific rabbit antiserum**

To generate an affinity purification column, purified recombinant ft-IFN $\gamma$  in coupling buffer (0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 M HCl, pH 8.34) was mixed to 0.34 g of HCl-preactivated CNBr-Sepharose 4B resin (GE Healthcare, Baie d'Urfe, Canada) for 16 h at 4°C. The remaining active groups on the beads were inactivated with 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) for 2 h at room temperature, followed by several washes in alternating pH cycles and PBS. The gel was packed into a gravity flow column (Fisher Thermo Scientific, Ottawa, Canada) and stored at 4°C in PBS containing 0.01% sodium azide. Serum from rabbits immunized with the purified ft-IFN $\gamma$  (Cocalico Biologicals, Reamstown, PA, USA) was diluted 1:1 in binding buffer (0.1M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0.15 M NaCl, pH:7.4) and loaded onto the sepharose-ftIFN $\gamma$  column, followed by several washes with binding buffer. Anti-ftIFN $\gamma$  antibodies were then eluted with 0.2M Glycine/HCl, pH 2.5, and 200  $\mu$ l aliquots were collected in tubes containing 20 $\mu$ l of neutralizing buffer (1M Tris/HCl, pH9). Aliquots containing specific anti-ftIFN $\gamma$  antibodies were identified by Western blot analysis and protein concentration was quantified by Bradford assay (Fisher Thermo Scientific, Ottawa, Canada). Aliquots containing ftIFN $\gamma$  antibodies were pooled and biotinylated with EZ-link sulfo-

NHS-LC-LC-biotin (Pierce, Thermo Scientific, Ottawa, Canada) following the manufacturer's protocol.

### **Immunoperoxidase monolayer assay (IPMA)**

Vero cells in 96-well plates were transfected with the ftIFN $\gamma$  expression plasmid pCG-ftIFN $\gamma$  and incubated for 24 hours. The plates were then washed once with phosphate-buffered saline (PBS, Invitrogen, Life Technologies, Burlington, ON, Canada), air-dried, and fixed at 65°C overnight. FtIFN $\gamma$ -specific IgG antibodies were quantified by adding serial two fold dilutions to the plates, starting at a dilution of 1:100 in PBS, followed by incubation with a peroxidase-labeled, anti-ferret IgG secondary antibody (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA). Positive cells were visualized by staining with 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) solution (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), and titers were expressed as reciprocals of the highest antibody dilution at which positive cells were detectable.

### **Antibody validation for ftIFN $\gamma$ ELISpot assay**

The ftIFN $\gamma$  ELISpot assay was performed as described previously (Pillet et al. Vaccine 2011). Briefly, nitrocellulose 96-well plates (MultiScreen, Millipore, Billerica, MA, USA) were coated overnight with mouse IgG anti-bovine IFN $\gamma$  (1mg/ml, AbD Serotec, Raleigh, NC, USA), and blocked with culture medium RPMI containing 10% FCS and 1% Penicillin/Streptomycin. To obtain ferret PBMCs, 3 ml of heparinized blood was collected from healthy ferrets and cells were purified by Ficoll gradient centrifugation (GE Healthcare, Baie d'Urfe, Canada). In each well,  $5 \times 10^5$  cells were added in RPMI supplemented with 10% FCS, 10mM MEM non-essential amino acid, 100nM Sodium pyruvate, 1% HEPES, 1% L-Glutamine, 1% Penicillin/streptomycin (RPMIc, all Invitrogen, Life Technologies, Burlington, ON, Canada). PBMCs were either stimulated with 0.3  $\mu$ l/well of phytohemagglutinin (PHA) or left untreated. After 24 h cultivation, the plates were washed three times with distilled H<sub>2</sub>O and four times with PBS containing 0.05% of Tween 20 (PBS/T). Twofold dilutions of biotinylated anti-ftIFN $\gamma$  antiserum were added to each well and incubated overnight at 4°C. The commercial biotinylated anti-dog IFN $\gamma$  antiserum (R&D Systems, Minneapolis MN, USA) was used as a positive control. After four washes with PBS/T, plates were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-labeled streptavidine and then stained with 3-Amino-9-ethylcarbazole (AEC) substrate (BD ELISpot, San Jose, CA, USA). Plates were left to air-dry overnight, and spots were counted using an AID ELISpot reader.

## Cells and viruses

Vero cells (ATCC CCL-81), MDCK cells (ATCC CCL-34) and 293T cells (ATCC CRL-1573) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen, Life Technologies, Burlington, ON, Canada) supplemented with 5% FCS. The influenza virus H1N1 A/USSR/90/77 (USSR, Genebank CY010372.1-CY010378.1) was propagated in MDCK cells cultivated in DMEM with 2 µg/ml of TPCK-trypsin (DMEM-TPCK, Sigma-Aldrich, Oakville, ON Canada). The CDV vaccine strain Onderstepoort (OS, (von Messling *et al.*, 2001)), was grown in Vero cells. Virus titers were quantified by limiting dilution method and expressed as 50% tissue culture infectious dose per ml (TCID<sub>50</sub>/ml).

## Generation of recombinant CDVs expressing influenza NP and/or HA proteins

The vaccine strain OS was used for the generation of all recombinant viruses. To produce viruses that express either the USSR NP or HA proteins from an additional open reading frame between the H and L genes, part of the H gene and the untranslated region between the P and M genes was first added upstream of the respective influenza gene using extension PCR. The resulting fragment was then inserted into the plasmid containing the OS genome using unique restriction sites, yielding OS H/HA<sup>USSR</sup>/L (OS-HA) and OS H/NP<sup>USSR</sup>/L (OS-NP). The genome containing both USSR proteins, OS H/NPHA<sup>USSR</sup>/L (OS-NP/HA), was generated by adding the untranslated region between the F and H genes upstream of the NP gene and introducing the resulting fragment upstream of the HA gene into OS-HA.

The recombinant viruses were recovered by first infecting 293 cells with the modified vaccinia virus Ankara expressing the T7 polymerase (MVA-T7), followed by transfection with Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Life Technologies, Burlington, ON, Canada) of 4-6 µg of the respective genomic plasmid and 0.5 µg of CDV N and P, and 0.1 µg of CDV L protein expression plasmids under control of the T7 promoter (von Messling *et al.*, 2001, Martin, Staeheli et Schneider 2006). Two days later, cells were transferred onto fresh Vero cells, and individual syncytia were amplified to produce virus stocks. For growth kinetics, Vero cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01. Samples were harvested daily for 5 days following the infection, and the cell-associated and cell-free virus titers were determined by limited dilution. Photographs were taken using an Eclipse TE2000-U microscope with a DXM1200F digital camera (Nikon instruments inc., Melville, NY, USA).

### **Western blot analysis**

Vero or MDCK cells were seeded in 6-well plates and infected with the different recombinant CDVs or USSR, respectively, at a MOI of 0.01. At different times after infection, samples were lysed in 200  $\mu$ L of RIPA buffer (1 mM PMSF, 1% sodium deoxycholate, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% Triton-X100, 0.1% SDS, 150 mM NaCl) on ice, and clarified by centrifugation at 4°C. Cell lysates as well as bacterial lysates or different antibody purification steps were mixed with 2x Laemmli buffer (BIO-RAD, Life science, Mississauga, Ontario, Canada) with 10% dithiothreitol (Sigma-Aldrich, Oakville, ON Canada) and heated at 95°C for 5 min. Proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred on Immobilon-P PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were blocked with 0.5% blocking buffer TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl), and incubated with either a CDV H protein-specific rabbit anti-peptide sera, a polyclonal goat anti-influenza A antibody (OBT1551 AbD Serotec, Raleigh, NC, USA), a mouse monoclonal anti-influenza A NP antibody (9G8, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA), or a monoclonal anti-HisTag antibody (AbD Serotec, Raleigh, NC, USA), followed by horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Proteins were visualized using the ECL Plus Western Blotting Detection system (GE Healthcare, Baie d'Urfe, Canada), exposed on a luminescent image analyzer (IS2000mm, Kodak, Rochester, NY, USA).

### **Immunoprecipitation**

For cell surface biotinylation, Vero cells were infected with the different viruses at a MOI of 0.1. After 2 days, infected cells were incubated for 20 min at 4°C with EZ-Link NHS-LC-LC-Biotin (Sigma-Aldrich, Oakville, ON Canada) at a concentration of 2 mM in PBS, and then washed with 100 mM glycine in PBS to quench excess biotin. The cells were then lysed with RIPA buffer with protease inhibitor, and were mixed with immobilized Protein G-PLUS beads (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA USA) and a rabbit polyclonal anti-H1N1 HA antibody (A01500 Genscript, Piscataway, NJ, USA). After agitation overnight at 4°C, samples were washed three times, mixed with 2X SDS-gel loading buffer containing 10%  $\beta$ -mercaptoethanol and heated at 75°C for 5 min. Surface-expressed HA protein was detected by Western blot analysis using a streptavidin-HRP conjugate (Pierce, Thermo Scientific, Ottawa, Canada) and the ECL+ Chemiluminescence kit (GE Healthcare, Baie d'Urfe, Canada).

### **Virus particle purification**

Supernatants of cells infected with A/H1N1/USSR/77 or parental or recombinant CDVs were pre-cleared by centrifugation at 3000 rpm at 4°C and loaded on a 20%/60% discontinuous sucrose gradient. The samples were then centrifuges at 28 000 rpm, 4°C, for 90 min. For each sample, interface fraction was harvested and resuspended in 1X TNE buffer. Virus particles were then pelleted by ultracentrifugation at 28 000 rpm, 4°C for 90 minutes and resuspended in PBS.

### **Immunofluorescence**

For immunofluorescence staining,  $5 \times 10^4$  Vero cells seeded in 8 well glass slides (Lab-Tek II, Thermo Scientific, Ottawa, Canada) were infected with the different recombinant viruses at a MOI of 0.5. At different times after infection, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% Triton X 100, and then incubated with the respective primary antibody. Goat anti-rabbit Alexa Fluor 568 and goat anti-mouse Alexa Fluor 488 antisera (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada) were used as secondary antibodies, and slides were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada) before mounting in Vectamount (Vector Laboratories, Burlington, ON Canada).

## RESULTS

### **The biotinylated ftIFN $\gamma$ antiserum improves ftIFN $\gamma$ ELISpot Sensitivity**

We recently developed a ftIFN $\gamma$  ELISpot assay, which allows us to detect the induction of a cellular immune response (Pillet *et al.*, 2011). However, the commercial dog-specific biotinylated detection antibody used in this work had only limited affinity to ftIFN $\gamma$ , precluding a quantitative comparison of positive responses. To increase the sensitivity of the assay, we first generated a ftIFN $\gamma$ -specific antiserum by immunizing rabbits with recombinant ftIFN $\gamma$  produced in a bacterial expression system (Rudd *et al.*, 2010). FtIFN $\gamma$ -specific antibodies were purified using an affinity column produced with purified ftIFN $\gamma$  (Figure 1a), and fractions with protein concentrations above 2 mg/ml and antibody titers above 1:1000 (Figures 1b and c), were pooled and biotinylated. The resulting antiserum enabled the detection of recombinant ftIFN $\gamma$  by Western blot up to a dilution of 1:100 000 (Figure 1d). To evaluate the specificity and sensitivity of the ftIFN $\gamma$ -specific antiserum, PBMCs from healthy ferrets were isolated by Ficoll gradient purification and PHA- or mock-stimulated for 24 h. IFN $\gamma$ -producing foci were visualized by staining with the commercial dog-specific or our newly produced ferret-specific biotinylated IFN $\gamma$  antiserum (Figure 2a). At its previously determined working dilution, the dog-specific antiserum resulted in considerable background staining and the detection of ~30% less foci than the ferret-specific serum at its optimal dilution (Figure 2b), illustrating the improved sensitivity and specificity of the newly produced ftIFN $\gamma$ -specific antiserum in our IFN $\gamma$  ELISpot assay.

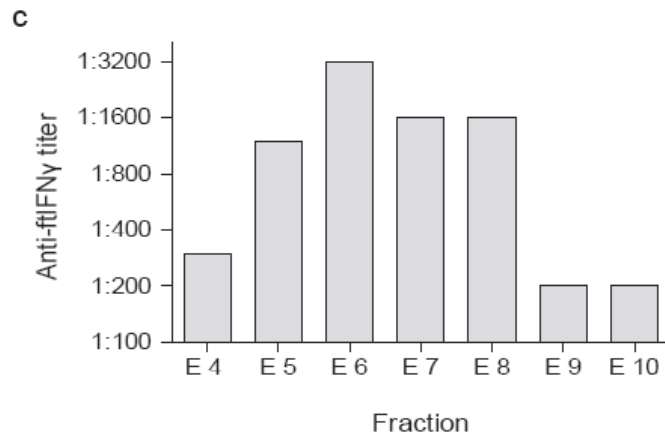
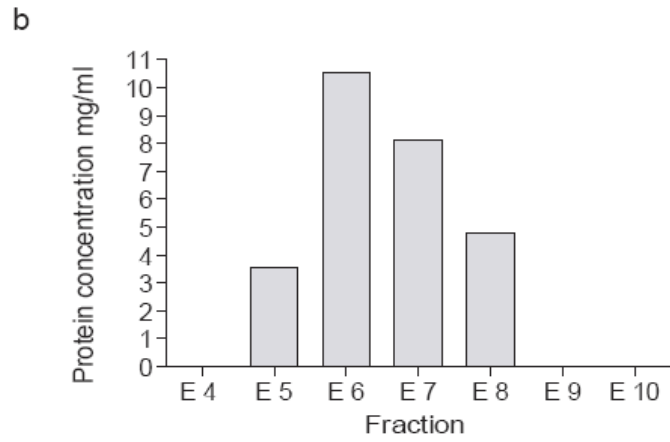
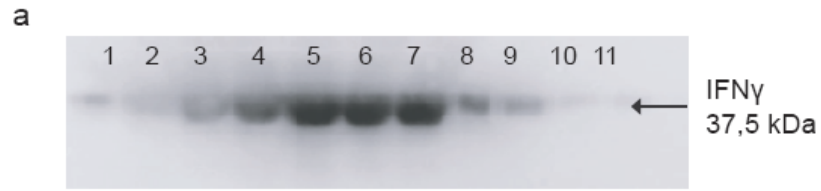
### **Influenza protein-expressing CDV vaccine strains retain parental growth phenotype**

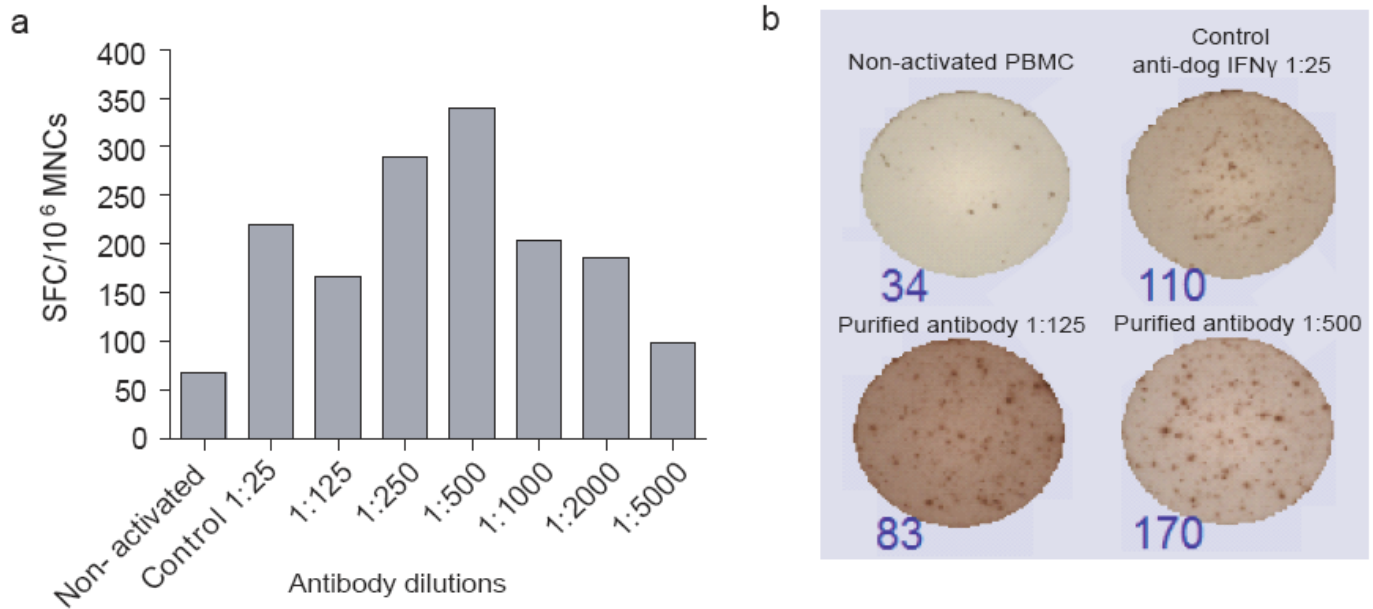
To evaluate the potential of morbillivirus-based vaccine platforms, we introduced the USSR NP or HA proteins individually or in combination in additional open reading frames between the H and L genes of the CDV vaccine strain OS (von Messling *et al.*, 2001), which is completely attenuated in ferrets (Figure 3a). Growth kinetics in Vero cells revealed that the recombinant viruses retained parental replication efficacy with cell-associated titers around thousandfold higher than the corresponding titer in the supernatant (Figure 3b). No differences in syncytia phenotype were observed (Figure 3c), indicating that insertion of the additional genes did not affect the viability of the recombinant viruses *in vitro*.



**Figure 1**

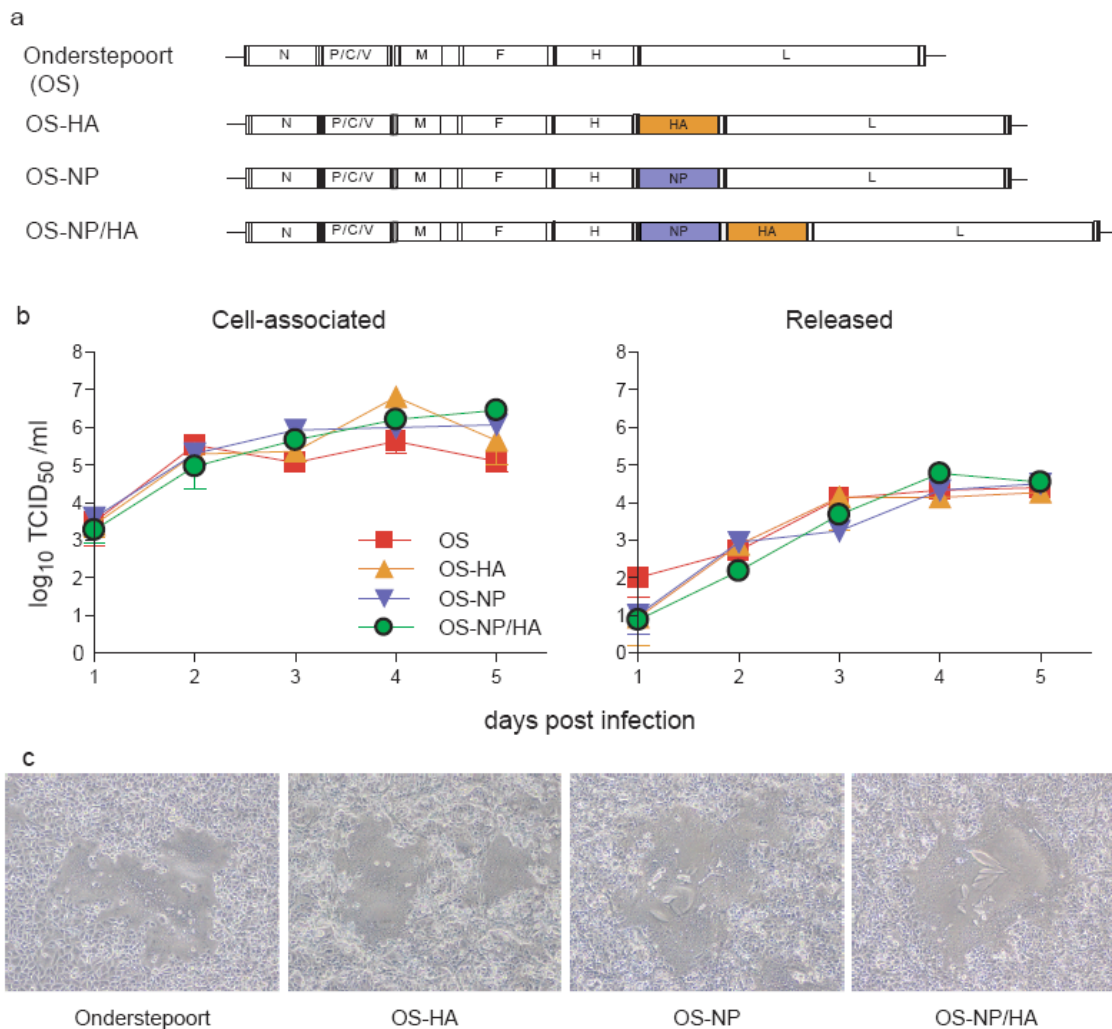
Production of biotinylated anti-ftIFN $\gamma$  antiserum. **(a)** Identification of eluate fractions from Ni<sup>+</sup> affinity column purification containing ftIFN $\gamma$ . Ten  $\mu$ l of each fraction were separated by SDS-PAGE, and fractions containing ftIFN $\gamma$  were identified by Western blot analysis using an anti-histidine tag antibody. **(b)** Quantification of total protein concentration and **(c)** ftIFN $\gamma$ -specific antibody titers in eluate fraction from the ftIFN $\gamma$  affinity column. The total protein concentration was measured by Bradford assay and is expressed in mg/ml. Antibody titers were quantified by IPMA assay and are expressed as reciprocal of the last dilution step that yielded a positive signal. **(d)** Detection level of the biotinylated ftIFN $\gamma$  antiserum. Western blot strips with recombinant ftIFN $\gamma$  were probed with decreasing dilutions of purified anti-ftIFN $\gamma$  biotinylated antiserum, followed by peroxidase (HRP)-labeled streptavidine. The anti-his tag antibody was used as control.





**Figure 2**

ELISpot assay optimisation. **(a)** Quantification of IFN $\gamma$ -producing cells. Wells were coated overnight with mouse anti-bovine IFN $\gamma$ , followed by addition of ferret PBMC cells in the presence or absence of PHA. After 24 h plates were stained with twofold dilutions of biotinylated anti-fIFN $\gamma$  antiserum or the commercial biotinylated anti-dog IFN $\gamma$  antiserum. Spots were visualized by AEC staining, and counted using an AID ELISpot reader. Values are expressed as spot-forming cells (SFC) by million mononuclear cells (MNC). **(b)** Photographs of selected control and positive wells acquired with an AID ELISpot reader. The number of spot-forming cells per well is indicated in the bottom left corner.

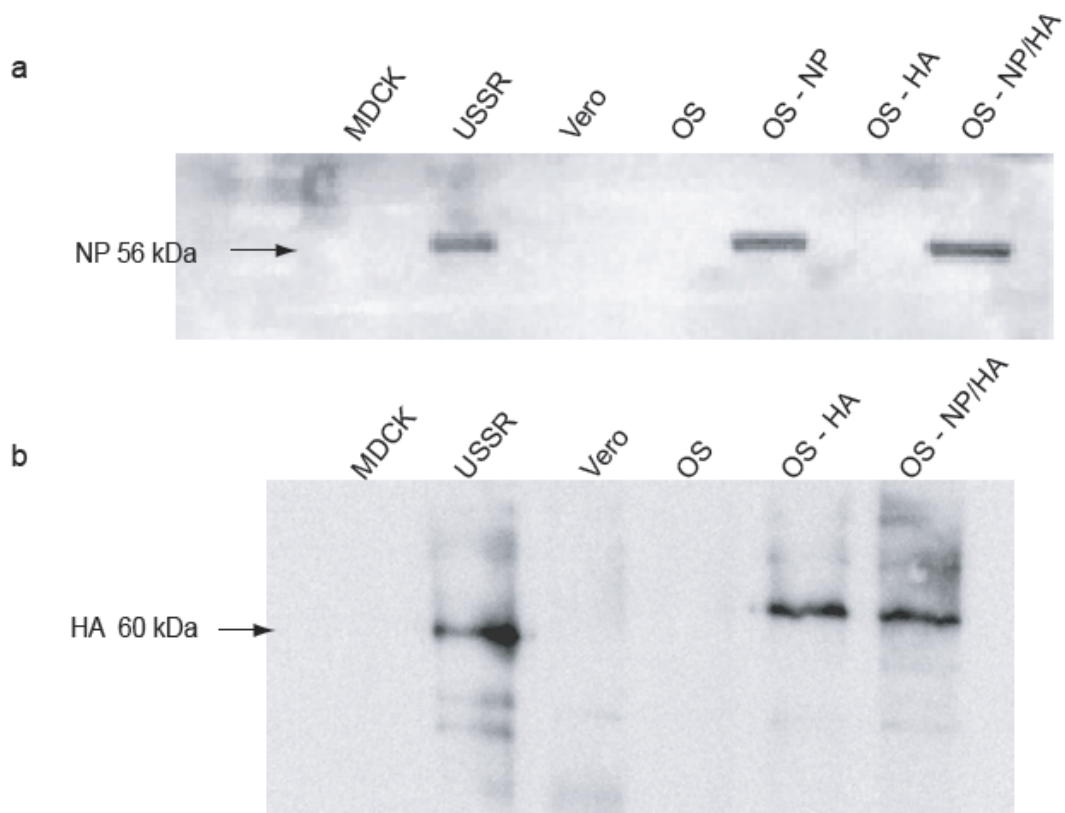


**Figure 3**

Generation and *in vitro* characterization of recombinant viruses. **(a)** Schematic drawing of the CDV vaccine strain OS and the recombinant viruses expressing the respective influenza genes from additional open reading frames. All genomes are drawn to scale. White boxes represent CDV open reading frames and untranslated regions, orange and purple boxes represent influenza HA and NP genes, respectively. **(b)** Growth kinetics of the cell-associated and released virus titers produced by the parental and recombinant viruses in Vero cells. Cells were infected with a MOI of 0.01, and samples were harvested daily for 5 days. Titers are expressed as TCID<sub>50</sub>/ml. Data points represent the average of at least three experiments, and error bars indicate the standard deviation. **(c)** Syncytia formation in Vero cells. Cells were infected with a MOI of 0.01. Photographs were taken 72 h post-infection with phase contrast at 100x magnification.

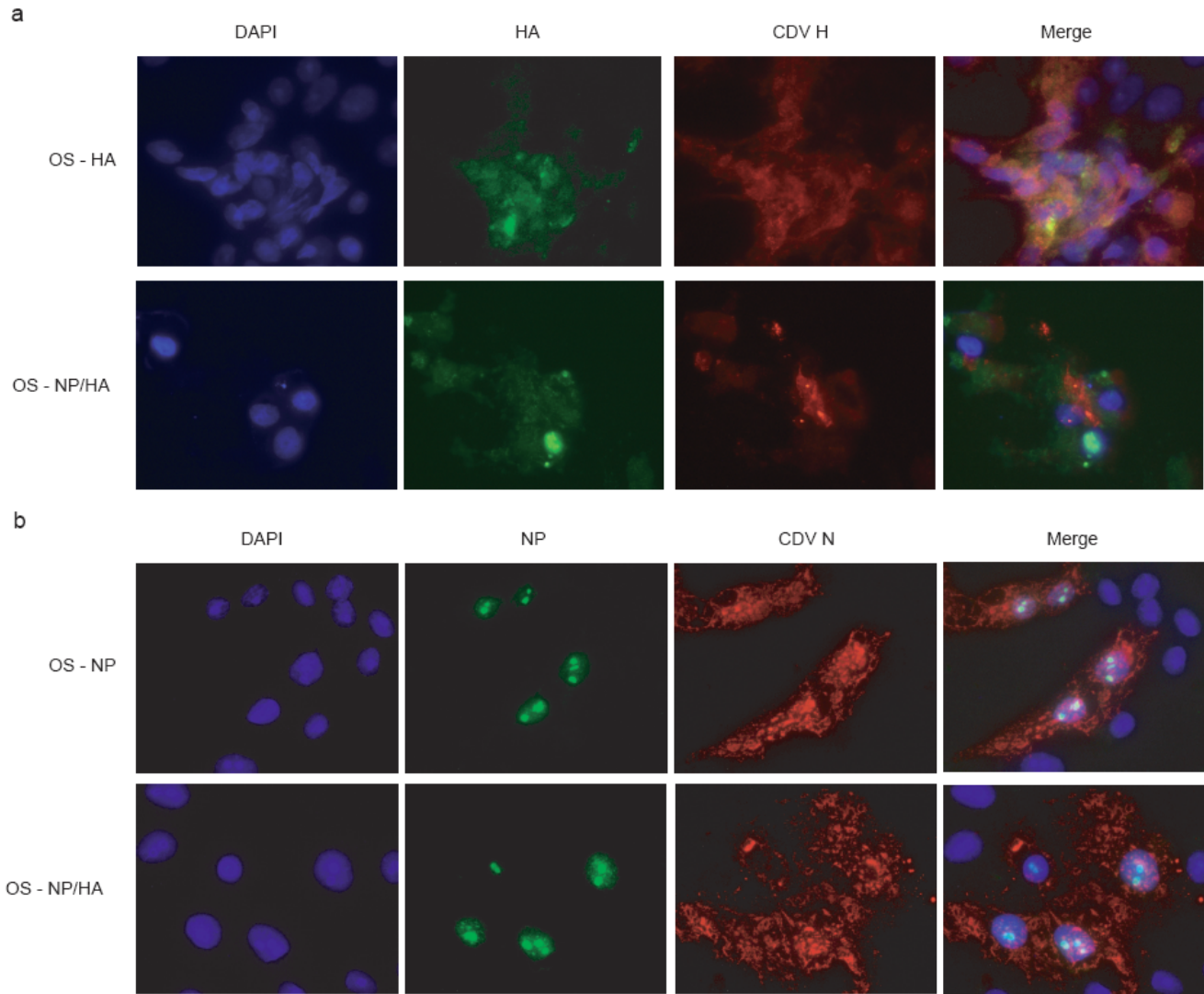
### **NP and HA proteins are expressed at near wild type levels in infected cells**

The characterization of a recombinant MeV expressing the hepatitis B virus antigen in primates revealed that the expression level of the additional antigen influences the strength of the immune response (del Valle *et al.*, 2007). While NP protein expression levels in Vero cells infected with the OS-NP and OS-NP/HA reached levels similar to those in USSR-infected MDCK cells (Figure 4a), the HA surface expression of the recombinant CDVs was slightly lower than that of the parental influenza virus (Figure 4b). Immunofluorescence double staining revealed that the influenza HA and CDV H proteins were both found in the cytoplasm and on the cell surface (Figure 5a). In contrast, the influenza NP protein is primarily found in the nucleus, whereas the CDV N protein is detected exclusively in the cytoplasm (Figure 5b). We next evaluated the extent of influenza protein incorporation into the CDV particle. While a certain level of NP protein incorporation was detected for OS-NP, no HA protein was detected in any of the HA-expressing CDVs, even though it was detected in purified influenza particles (Figure 6). Thus, while only CDV proteins are efficiently incorporated into the viral particle, the expression levels and the intracellular localization of the CDV-expressed influenza proteins come close to reproduce the conditions observed during a natural influenza infection.



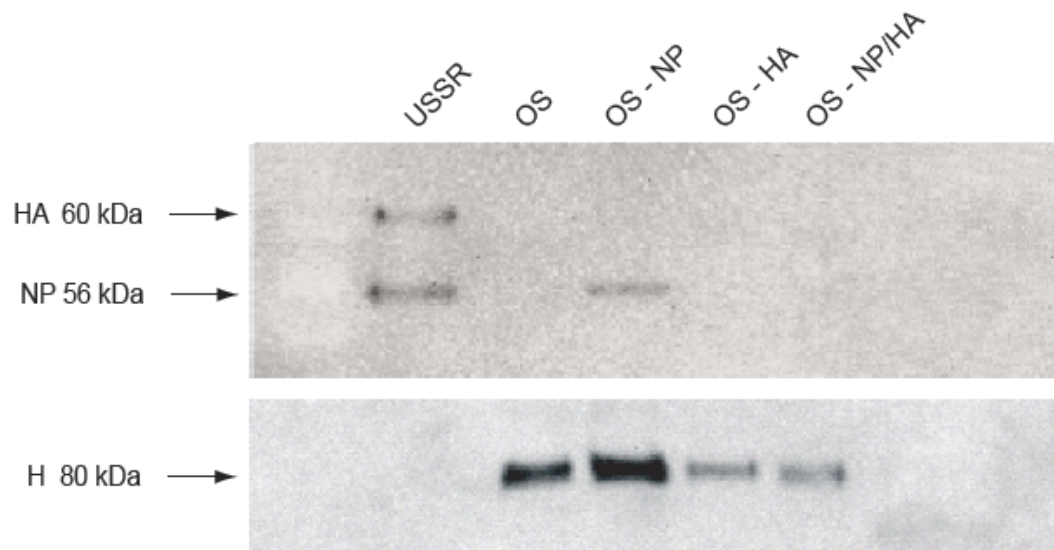
**Figure 4**

Expression of HA and NP proteins in infected Vero cells. **(a)** NP protein detection by Western blot analysis and **(b)** HA protein detection by surface biotinylation. MDCK cells were infected with A/H1N1/USSR/77 and Vero cells were infected with the parental and recombinant CDVs at a MOI of 0.01. Influenza-infected cells were lysed 24 h and CDV-infected cells 48 h after inoculation and the lysates were subjected to Western blot analysis. Membranes were probed with an NP-specific mouse monoclonal antibody followed by a HRP-conjugated secondary antiserum. For HA protein detection, cells were surface-biotinylated with Sulfo-NHS-biotin prior to lysis. Lysates were then immunoprecipitated with a polyclonal goat anti-influenza A antiserum and precipitated influenza proteins were detected by Western blot analysis using streptavidine-HRP.



**Figure 5**

Immunofluorescence detection of NP and HA proteins in infected Vero cells. Vero cells were seeded in 8 well glass slides and infected with the parental and recombinant CDVs at a MOI of 0.5. After 48 h, cells were fixed and stained with either (a) CDV H protein-specific rabbit anti-peptide sera and mouse monoclonal anti-influenza A HA antibody, or (b) CDV N protein-specific rabbit anti-peptide sera and mouse monoclonal anti-influenza A NP antibody. Goat anti-rabbit Alexa Fluor 568 and goat anti-mouse Alexa Fluor 488 were used as secondary antibodies. Slides were counterstained with DAPI, and pictures were taken at 1000x magnification.



**Figure 6**

Analysis of HA and NP protein incorporation into viral particles. MDCK were infected with A/H1N1/USSR/77, and Vero cells with the parental and recombinant CDVs. Viral particles were purified by ultracentrifugation, the virus titer was quantified, and similar infectious doses were analyzed by Western blot. Membranes were probed with CDV H protein-specific rabbit anti-peptide sera or polyclonal goat anti-influenza A serum followed by HRP-conjugated secondary antibodies.



## DISCUSSION

The 2009 pandemic proves that new influenza viruses will continue to emerge, and highlighted the challenges associated with pandemic preparedness. Since vaccination is considered the most effective public health response, there are ongoing efforts to shorten the production time of antigenetically matched vaccines and to develop vaccines that induce a broader protection (Osterholm 2005). While LAIV induce a sustained humoral and cellular immune response in naïve individuals, their efficacy in the presence of pre-existing immunity to related strains is variable (Ambrose, Levin et Belshe 2010). Furthermore, their use as pre-pandemic vaccine carrying HA and NA proteins that are not circulating in the human population is fraught with the risk of inadvertent reassortment (Pfleiderer, Lower et Kurth 2002, Subbarao et Joseph 2007).

Here we set out to explore the potential of a replication-competent morbillivirus-based vaccine platform to address these problems. Towards this, we introduced the HA and NP proteins of a seasonal H1N1 influenza strain into a CDV vaccine strain. CDV is closely related to MeV, which has been shown to induce a strong immune response against an additionally expressed antigen in the presence of pre-existing MeV immunity (Singh, Cattaneo et Billeter 1999, Lorin *et al.*, 2004). Since ferrets are naturally susceptible to CDV and to human influenza viruses and develop clinical signs that reproduce the disease seen in measles and influenza patients, respectively, the use of CDV as viral vector allows a simultaneous efficacy assessment against both pathogens (Maher et DeStefano 2004, Pillet, Svitek et von Messling 2009, Belser, Katz et Tumpey 2011).

To improve the tools available for the assessment of the cellular immune response in ferrets, we generated a ferret IFN $\gamma$ -specific biotinylated detection antibody. This antibody more than doubled the sensitivity of the original ferret IFN $\gamma$  ELISpot assay, which was based on the use of a commercially available detection antibody raised against canine IFN $\gamma$  (Pillet *et al.*, 2011), and will thus allow us for the first time to quantitatively compare cellular immune responses to different vaccines or vaccination regimen. We are now in the process to use a similar approach for the development of additional ELISpot assays for the detection of other cytokines.

Despite the lack of proof-reading inherent to RNA-dependent RNA polymerases, morbilliviruses maintain the expression of additionally inserted genes over multiple passages *in vitro* (Singh, Cattaneo et Billeter 1999), and GFP expression is retained throughout the course of infection in ferrets and monkeys (von Messling, Milosevic et Cattaneo 2004, de Vries *et al.*, 2010). Since the *in vitro* replication efficacy of the recombinant viruses was not affected, it can be speculated that their replication *in vivo* may also be similar to that of the parental vaccine strain. However, if initial immunization experiments reveal insufficient immune responses to the influenza antigens or hyperattenuation of the recombinant viruses, the insertion cassette will be placed at upstream or downstream positions in the viral genome taking advantage of the transcriptional gradient (del Valle *et al.*, 2007). A similar strategy has previously been used for MeVs expressing antigens for bivalent vaccination or therapeutic genes for cancer therapy (del Valle *et al.*, 2007, Msaouel, Dispenzieri et Galanis 2009).

Even though we were unable to detect HA protein incorporation into viral particles, the possibility of incorporation cannot be excluded. However, in contrast to LAIV, which may give rise to fully replication-competent influenza viruses carrying novel envelope glycoproteins, the presence of HA alone in CDV particles has likely little effect. Like influenza, morbilliviruses naturally target epithelial cells in the respiratory tract (van Riel *et al.*, 2007, Muhlebach *et al.*, 2011). In addition, morbilliviruses infect immune and epithelial cells throughout the body (Sato *et al.*, 2012), which mirrors the tropism of highly pathogenic influenza viruses, which can spread systemically due to a polybasic cleavage site in their HA protein (Stieneke-Grober *et al.*, 1992, Kuiken et Taubenberger 2008, Yao *et al.*, 2008), thereby alleviating possible concerns of a change of tropism associated with the expression of the influenza HA proteins in the case of highly pathogenic avian influenza viruses,

## REFERENCES

- Ambrose, C. S., Levin, M. J. et Belshe, R. B. (2010). The relative efficacy of trivalent live attenuated and inactivated influenza vaccines in children and adults. *Influenza Other Respi Viruses* 5: 67-75.
- Barrett, T. (1999). Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. *Vet Microbiol* 69: 3-13.
- Belser, J. A., Katz, J. M. et Tumpey, T. M. (2011). The ferret as a model organism to study influenza A virus infection. *Dis Model Mech* 4: 575-9.
- de Vries, R. D., Lemon, K., Ludlow, M., McQuaid, S., Yuksel, S., *et al.* (2010). In vivo tropism of attenuated and pathogenic measles virus expressing green fluorescent protein in macaques. *J Virol* 84: 4714-24.
- del Valle, J. R., Devaux, P., Hodge, G., Wegner, N. J., McChesney, M. B. et Cattaneo, R. (2007). A vectored measles virus induces hepatitis B surface antigen antibodies while protecting macaques against measles virus challenge. *J Virol* 81: 10597-605.
- Dilraj, A., Cutts, F. T., de Castro, J. F., Wheeler, J. G., Brown, D., Roth, C., Coovadia, H. M. et Bennett, J. V. (2000). Response to different measles vaccine strains given by aerosol and subcutaneous routes to schoolchildren: a randomised trial. *Lancet* 355: 798-803.
- El Sahly, H. M. et Keitel, W. A. (2008). Pandemic H5N1 influenza vaccine development: an update. *Expert Rev Vaccines* 7: 241-7.
- Fan, S., Gao, Y., Shinya, K., Li, C. K., Li, Y., *et al.* (2009). Immunogenicity and protective efficacy of a live attenuated H5N1 vaccine in nonhuman primates. *PLoS Pathog* 5: e1000409.
- Gerdil, C. (2003). The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine* 21: 1776-9.
- Hoft, D. F., Babusis, E., Worku, S., Spencer, C. T., Lottenbach, K., *et al.* (2011). Live and inactivated influenza vaccines induce similar humoral responses, but only live vaccines induce diverse T-cell responses in young children. *J Infect Dis* 204: 845-53.
- Kopecky-Bromberg, S. A. et Palese, P. (2009). Recombinant vectors as influenza vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol* 333: 243-67.
- Kuiken, T. et Taubenberger, J. K. (2008). Pathology of human influenza revisited. *Vaccine* 26 Suppl 4: D59-66.

- Lorin, C., Mollet, L., Delebecque, F., Combredet, C., Hurtrel, B., Charneau, P., Brahic, M. et Tangy, F. (2004). A single injection of recombinant measles virus vaccines expressing human immunodeficiency virus (HIV) type 1 clade B envelope glycoproteins induces neutralizing antibodies and cellular immune responses to HIV. *J Virol* 78: 146-57.
- Maher, J. A. et DeStefano, J. (2004). The ferret: an animal model to study influenza virus. *Lab Anim (NY)* 33: 50-3.
- Martin, A., Staeheli, P. et Schneider, U. (2006). RNA polymerase II-controlled expression of antigenomic RNA enhances the rescue efficacies of two different members of the Mononegavirales independently of the site of viral genome replication. *J Virol* 80: 5708-15.
- Min, J. Y., Vogel, L., Matsuoka, Y., Lu, B., Swayne, D., Jin, H., Kemble, G. et Subbarao, K. (2010). A live attenuated H7N7 candidate vaccine virus induces neutralizing antibody that confers protection from challenge in mice, ferrets, and monkeys. *J Virol* 84: 11950-60.
- Monto, A. S., Ohmit, S. E., Petrie, J. G., Johnson, E., Truscon, R., Teich, E., Rotthoff, J., Boulton, M. et Victor, J. C. (2009). Comparative efficacy of inactivated and live attenuated influenza vaccines. *N Engl J Med* 361: 1260-7.
- Moss, W. J. et Griffin, D. E. (2006). Global measles elimination. *Nat Rev Microbiol* 4: 900-8.
- Msaouel, P., Dispenzieri, A. et Galanis, E. (2009). Clinical testing of engineered oncolytic measles virus strains in the treatment of cancer: an overview. *Curr Opin Mol Ther* 11: 43-53.
- Muhlebach, M. D., Mateo, M., Sinn, P. L., Pruffer, S., Uhlig, K. M., et al. (2011). Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature*.
- Osterholm, M. T. (2005). Preparing for the next pandemic. *N Engl J Med* 352: 1839-42.
- Pfleiderer, M., Lower, J. et Kurth, R. (2002). Cold-attenuated live influenza vaccines, a risk-benefit assessment. *Vaccine* 20: 886-94.
- Pillet, S., Kobasa, D., Meunier, I., Gray, M., Laddy, D., Weiner, D. B., von Messling, V. et Kobinger, G. P. (2011). Cellular immune response in the presence of protective antibody levels correlates with protection against 1918 influenza in ferrets. *Vaccine* 29: 6793-801.
- Pillet, S., Svitek, N. et von Messling, V. (2009). Ferrets as a model for morbillivirus pathogenesis, complications, and vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol* 330: 73-87.

- Potter, C. W. (2001). A history of influenza. *J Appl Microbiol* 91: 572-9.
- Rudd, P. A., Bastien-Hamel, L. E. et von Messling, V. (2010). Acute canine distemper encephalitis is associated with rapid neuronal loss and local immune activation. *J Gen Virol* 91: 980-9.
- Sato, H., Yoneda, M., Honda, T. et Kai, C. (2012). Morbillivirus receptors and tropism: multiple pathways for infection. *Front Microbiol* 3: 75.
- Singh, M., Cattaneo, R. et Billeter, M. A. (1999). A recombinant measles virus expressing hepatitis B virus surface antigen induces humoral immune responses in genetically modified mice. *J Virol* 73: 4823-8.
- Stieneke-Grober, A., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Thomas, G., Roberts, C., Klenk, H. D. et Garten, W. (1992). Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *Embo J* 11: 2407-14.
- Subbarao, K. et Joseph, T. (2007). Scientific barriers to developing vaccines against avian influenza viruses. *Nat Rev Immunol* 7: 267-78.
- van Riel, D., Munster, V. J., de Wit, E., Rimmelzwaan, G. F., Fouchier, R. A., Osterhaus, A. D. et Kuiken, T. (2007). Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals. *Am J Pathol* 171: 1215-23.
- von Messling, V., Milosevic, D. et Cattaneo, R. (2004). Tropism illuminated: lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14216-21.
- von Messling, V., Zimmer, G., Herrler, G., Haas, L. et Cattaneo, R. (2001). The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *J Virol* 75: 6418-27.
- W.H.O. (2007). Options for Live Attenuated Influenza Vaccines (LAIV) In the Control of Epidemic and Pandemic Influenza meeting.
- W.H.O. (2009). Seasonal Influenza Fact Sheet No 211.
- Yao, L., Korteweg, C., Hsueh, W. et Gu, J. (2008). Avian influenza receptor expression in H5N1-infected and noninfected human tissues. *Faseb J* 22: 733-40.
- Zuniga, A., Wang, Z., Liniger, M., Hangartner, L., Caballero, M., et al. (2007). Attenuated measles virus as a vaccine vector. *Vaccine* 25: 2974-83.

## **CHAPITRE 3**

### **DISCUSSION**

Ce projet de doctorat avait pour objectif d'évaluer le potentiel des SOFA-HDV ribozymes comme traitement prophylactique contre le virus de l'influenza ainsi que la construction et la caractérisation d'une plateforme vaccinale morbillivirale adaptée au modèle furet. L'évaluation *in vitro* et *in vivo* dans le modèle souris des SOFA-HDV ribozymes a démontré une capacité de certaines combinaisons à limiter la réplication du virus ainsi qu'un effet protecteur chez la souris. Nous avons également mis en place un protocole de vaccination avec le CDV chez le furet, produit des réactifs et optimisé des tests de suivi de la réponse immunitaire cellulaire dans ce modèle. Nous avons parallèlement construit et caractérisé trois virus recombinants du CDV contenant les gènes codant pour les protéines NP et/ou HA du virus d'influenza. L'évaluation des virus recombinants nous a permis de déterminer que ceux-ci induisaient l'expression des protéines du virus influenza dans les cellules infectées sans que la réplication des virus *in vitro* ne semble affectée. La réponse immunitaire induite par cette approche vaccinale contre chacun des agents pathogènes sera maintenant à évaluer chez le furet.

## **1- Limitations des vaccins et traitements actuels contre le virus de l'influenza**

La grande majorité des vaccins actuellement disponibles sont des formulations inactivées (IV), comprenant principalement les glycoprotéines virales du virus, qui induisent une immunité humorale dirigée uniquement contre ces antigènes. Les vaccins de type vivant-atténués (LAIV) développés plus récemment sont capables d'induire une réponse immunitaire humorale et cellulaire dirigée contre l'ensemble des protéines du virus d'influenza mais l'efficacité de ces vaccins est amoindrie chez les individus ayant déjà été vaccinés ou infectés par le virus par le passé.

La production de ces vaccins est un procédé long, pouvant prendre jusqu'à six mois après l'identification de la souche d'intérêt et ne peut être appliqué à toutes les souches de virus. La sélection, la production d'une souche d'influenza réassortante exprimant les glycoprotéines de surface HA et NA choisies, la production massive puis l'accréditation prennent entre six et huit mois (Gerdil 2003, Butler 2012).

De plus, certaines souches d'influenza sont difficilement compatibles avec une production massive de vaccins. Les virus influenza aviaire hautement pathogènes (HPIV) tels que les virus

H5N1 tuent les œufs embryonnés qui sont utilisés pour la fabrication des vaccins, et des quantités d'antigènes élevées et répétées sont nécessaires pour induire une immunité protectrice (revue par El Sahly et Keitel 2008)).

Également, comme cet argument a déjà été soulevé, on ne peut exclure lors d'une vaccination le risque d'un réassortiment antigénique entre la souche vaccinale LAIV et une souche circulante (Pfleiderer, Lower et Kurth 2002). La possibilité d'un tel réassortiment a déjà été observé lors d'essai clinique en co-infection entre le LAIV et une souche circulante (Youngner *et al.*, 1994). Le virus réassortant pourrait s'avérer virulent en combinant les protéines de l'enveloppe du LAIV et le complexe de réplication de la souche circulante et ainsi éventuellement donner naissance à une pandémie accidentelle. Pour cette raison, l'utilisation de vaccin LAIV est pour le moment restreinte aux souches circulantes et ne peut être appliquée aux souches non-humaines.

Durant le printemps 2009, une souche d'influenza A/H1N1 transmise depuis un virus porcin à l'homme a mené à la première pandémie du 21<sup>ème</sup> siècle. Cette souche est issue de multiples réassortiments entre différentes souches d'influenza humaine, aviaire et porcine (Smith *et al.*, 2009). Parmi ses multiples caractéristiques, cette souche est notamment résistante à l'adamantane, un inhibiteur de canaux M2 (Itoh *et al.*, 2009). Par ailleurs, il a été observé dans les souches circulantes saisonnières d'influenza A/H1N1 ainsi que dans la souche pandémique A/H1N1/2009 l'apparition de souches résistantes à l'oseltamivir, un inhibiteur de neuraminidase (Dharan *et al.*, 2009, Storms *et al.*, 2012). Les apparitions de souches résistantes aux drogues antigrippales actuelles appuient la nécessité de traitements anti-influenza pour lesquels une adaptation du virus aux traitements est impossible.



## 2- Les ribozymes comme traitement prophylactique contre le virus de l'influenza

Dans le cadre de mon doctorat, j'ai évalué le potentiel des SOFA-HDV ribozymes comme traitements contre le virus de l'influenza. Nous avons pu démontrer qu'*in vitro*, les SOFA-HDV ribozymes sont capables de diminuer de manière significative le pourcentage de cellules infectées. *In vivo*, dans le modèle souris, le titre viral dans les poumons au jour 1 post infection est diminué de manière significative, et l'état général des souris tend à l'amélioration avec une diminution des signes cliniques associés à l'infection (Matsuoka, Lamirande et Subbarao 2009). Nous n'avons pas observé de variations dans le titre viral des poumons des souris au-delà du jour 1 post-infection, et ce, malgré le fait que l'état de santé général des souris s'améliorait comparativement au groupe contrôle. La diminution de la pathogenèse observée pourrait s'expliquer par le ralentissement de la réplication du virus au début de l'infection ce qui limiterait l'induction de la réponse inflammatoire. Il a été démontré qu'une diminution des cytokines pro-inflammatoires lors d'une infection par le virus de l'influenza est associée à un plus haut taux de survie et une diminution du titre viral dans les poumons. Des souris déficientes en IL-15, IL-17 ou TNF $\alpha$  et IL-1, toutes des cytokines pro-inflammatoires stimulatrices de la réponse immunitaire innée, avaient ainsi une diminution de la pathogenèse associée à l'infection ainsi qu'une diminution de l'infiltration des cellules immunitaires aux poumons (Crowe *et al.*, 2009, Nakamura *et al.*, 2010, Perrone *et al.*, 2010). Inversement, l'administration par voie intranasale d'IFN $\alpha$  quelques heures avant l'infection avec un virus A/H1N1 chez le furet ou chez le macaque permet de diminuer le titre viral et les signes cliniques (Kugel *et al.*, 2009, Matzinger *et al.*, 2010). Les IFN de type I sont parmi les premiers acteurs de la réponse immunitaire innée et permettent le recrutement et l'activation des différentes cellules immunitaires. Il semble donc que la diminution de la pathogenèse associée à l'infection est le résultat d'un meilleur contrôle de la réponse immunitaire innée et de l'intrusion massive de cellules immunitaires dans les poumons. En diminuant le pourcentage de cellules initialement infectées, le système immunitaire est capable de mieux contrôler l'infection sans exacerbation.

L'utilisation de SOFA-HDV ribozymes comme traitement prophylactique présente l'avantage qu'ils sont spécifiquement dirigés contre des séquences conservées entre différentes souches d'influenza et devraient donc être capables de limiter la réplication d'un grand nombre de souches émergentes rencontrées. Contrairement aux médicaments actuels contre le virus de l'influenza, tels que les inhibiteurs de canaux ioniques M2 ou de la neuraminidase qui bloquent

l'activité des protéines virales, les SOFA-HDV ribozymes ciblent des séquences entières du génome d'environ 20 nucléotides (Bergeron, Reymond et Perreault 2005). L'utilisation de cocktail de ribozymes ciblant plusieurs séquences sur plusieurs gènes permettrait de diminuer considérablement le risque d'apparition de souche résistantes aux traitements (Hoopes *et al.*, 2011). Les plasmides codant pour les ribozymes peuvent être stockés massivement et peuvent être rapidement produits. L'utilisation de ribozyme représente donc une option attrayante pour limiter la propagation du virus durant le délai nécessaire à la production massive de vaccin.

En perspective, des études futures devraient viser à mieux caractériser et évaluer l'efficacité de ribozymes comme traitement contre le virus de l'influenza. Premièrement, en ce qui concerne l'importance du temps d'administration. Nous avons ici démontré qu'une administration prophylactique de 6 h avant infection pouvait inhiber la morbidité associée au virus de l'influenza. Quelle est la durée de cette protection? Combien de temps après infection, les SOFA-HDV ribozymes restent-ils efficaces? Les SOFA-HDV ribozymes sont particulièrement stables *in vivo* (Levesque, Choufani et Perreault 2002), toutefois, lorsque les ribozymes se fixent à leur ARN cible, il y a possibilité que le complexe ribozyme-ARN soit reconnu par le complexe Dicer et cliver. Les SOFA-HDV ribozymes ont donc une durée de vie restreinte lorsqu'ils sont actifs *in vivo* qui doit être évaluée dans un contexte d'infection par le virus de l'influenza. La fréquence d'administration pour une efficacité optimale des SOFA-HDV ribozymes pourra ensuite être déterminée. Il sera également nécessaire d'évaluer l'efficacité des différentes combinaisons de SOFA-HDV ribozymes. Les paires de SOFA-HDV ribozymes que nous avons évaluées dans cette thèse ont été déterminées aléatoirement et nous avons observé des effets variables selon les couples choisis. Des études complémentaires sur les différents couples possibles de SOFA-HDV ribozymes nous permettront de déterminer les combinaisons les plus efficaces à inhiber la réplication du virus. Finalement, des études sur l'efficacité des SOFA-HDV ribozymes dans le modèle furet nous permettraient d'évaluer le niveau de protection conféré dans un modèle animal plus proche de l'homme en ce qui concerne une infection par le virus de l'influenza ainsi que l'étendue de la protection conférée selon différentes souches d'influenza humaine.

### **3- Les virus chimériques et leur potentiel vaccinal**

Le principe de vaccination introduit par Edward Jenner à la fin du 18<sup>ème</sup> siècle était sans le savoir, basé sur la proximité qui existait entre deux virus d'un même genre viral, le genre *orthopoxvirus*, à savoir le virus de la variole et le virus de la vaccine. De par les similarités

génétiques et antigéniques entre ces deux virus, mais dû à leur spectre d'hôte restreint, une immunisation avec le virus vaccinia induisait une immunité contre le virus de la variole avec moins de risques et effets secondaires que par la technique de variolisation (Riedel 2005). Une telle approche a également été utilisée pour la vaccination des chiots contre le CDV. Dû à l'immunité maternelle, les chiots sont protégés contre une infection au CDV mais cette protection s'amenuise avec le temps et pendant un laps de temps précédent leur vaccination, les chiots sont susceptibles à l'infection par le CDV. Pour y remédier, les chiots étaient immunisés avec le vaccin contre le MeV qui permettait l'induction d'une réponse immunitaire protectrice contre des épitopes conservés entre ces deux virus en outre passant l'immunité maternelle lors de l'immunisation (Sheshberadaran *et al.*, 1986). L'optimisation des techniques de biologie moléculaire a permis la construction de virus chimériques alliant les caractères atténués ou inadaptés de certaines souches virales aux potentiels antigéniques de leurs proches parents. À titre d'exemple, le vaccin Chimerivax-JE<sup>®</sup> ou IMOJEV<sup>®</sup> (Sanofi-Pasteur) est un vaccin chimérique vivant-atténué constitué du génome de la souche vaccinale atténué 17D du virus de la fièvre jaune (YFV) mais dont les séquences codant pour les glycoprotéines de la membrane préM et E ont été remplacées par celle de son proche parent, le virus de l'encephalite japonaise (JEV) (Appaiahgari et Vрати 2010). La proximité génétique qui existe entre ces deux flavivirus permet au virus chimérique de se répliquer et, bien que plus atténué que la souche parentale, de conférer une immunité protectrice contre à la fois le YFV et le JEV. Des recherches sont en cours pour élargir le potentiel de cette plateforme vaccinale au virus de la dengue (DEN) dans un vaccin chimérique tétravalent DEN/17D (Mantel *et al.*, 2011, Osorio *et al.*, 2011). Également, un vaccin chimérique contre le virus parainfluenza humain de type 3 (HPIV3) est actuellement en essai clinique. Il est constitué du génome du virus parainfluenza bovin de type 3 (BPIV3) auquel le gène codant pour les glycoprotéines HN et F ont été remplacées par celle du HPIV3. L'immunité induite lors de la vaccination avec ce virus permet l'induction d'anticorps neutralisant et inhibant l'hémagglutination à des niveaux protecteurs (Karron *et al.*, 2011).

Lors de mon doctorat, nous avons évalué le potentiel vaccinal d'un virus recombinant CDV/MeV chez le furet, une espèce hautement susceptible aux CDV. Nous avons démontré que les enveloppes du CDV et du virus de la rougeole étaient fonctionnellement interchangeables. Même si le virus chimérique est capable d'infecter les PBMCs de furets *in vitro*, il est complètement atténué *in vivo*. Toutefois, le virus chimérique induit une production d'anticorps spécifiquement dirigés contre le CDV capable de protéger les furets lors d'un défi avec une souche hautement pathogène. Ce virus chimérique pourrait jouer un rôle significatif comme

vaccin dans des efforts de protection d'espèces sauvages hautement susceptibles au CDV qui sont à risque de développer une maladie sévère même mortelle après une immunisation avec les vaccins vivants-atténués disponibles pour les chiens.

Une utilisation de virus chimériques similaires pourrait également être envisagée dans une approche économique telles que dans les élevages aviaires en ciblant le virus de Newcastle (NDV) et les différents souche de paramyxovirus aviaire (Alexander 2000) ou encore dans les fermes d'aquaculture en ciblant les paramyxovirus du saumon atlantique (ASPV) ou pacifique (PSPV) ou encore les rhabdovirus tels que le virus de la septicémie hémorragique virale (VHSV) (Gomez-Casado, Estepa et Coll 2010). Ainsi, l'utilisation de virus chimériques comme vaccin ouvre de nombreuses possibilités; l'exploitation des homologies génétiques et fonctionnelles qui existe entre différents virus d'un même genre peut permettre le développement de vaccins efficaces et sécuritaires pour l'hôte.

#### **4- Les virus de l'ordre des *Mononegavirales* comme plateforme vaccinale**

Les plateformes vaccinales virales sont définies comme des virus dont les génomes ont été modifiés pour exprimer un ou plusieurs antigènes ciblés afin d'induire une immunité contre le pathogène souhaité. Plusieurs approches vaccinales contre le virus de l'influenza ont été étudiées utilisant des vecteurs recombinants à partir de virus à ADN ou ARN. Les adénovirus ont été envisagés comme vecteur recombinant, notamment dû à leur capacité immunogénique (Matzinger *et al.*, 2010). Toutefois, la prévalence d'une immunité préexistente dans la population contre ce vecteur freine son utilisation (revue par Bangari et Mittal 2006). La souche modifiée Ankara du virus vaccinia (MVA), de la famille *poxviridae*, exprimant la protéine HA de virus d'influenza s'avère être un vaccin efficace chez la souris (Kreijtz *et al.*, 2007) et chez le macaque (Kreijtz *et al.*, 2009) contre des virus de l'influenza de type H5N1 et constituent donc un autre candidat intéressant.

En comparaison, les virus à ARN de polarité négative de l'ordre *Mononegavirales* présentent plusieurs avantages comme virus recombinants contre le virus de l'influenza.

Premièrement, l'immunité induite par ces virus est à la fois sérique et mucosale et entraîne une réponse immunitaire humorale et cellulaire. Dans un contexte de vaccination contre le virus influenza, il a été démontré que l'utilisation conjointe de virus de la stomatite vésiculaire (VSV)

recombinant VSV-NP et VSV-HA exprimant respectivement les protéines NP et HA d'influenza, induisait une réponse immunitaire cellulaire et humorale contre le virus influenza capable de protéger des souris lors d'un défi avec une souche létale (Barefoot *et al.*, 2009, Barefoot, Sample et Ramsburg 2009). Une forte protection a également été observée chez des macaques après vaccination avec une VSV-HA (Schwartz *et al.*, 2011).

Deuxièmement, les virus de l'ordre *Mononegavirales* acceptent des insertions génétiques de grande taille sans affecter leur réplication. L'ajout du gène codant pour la protéine de l'attachement (H) du MeV dans le génome du HPIV3 ne diminue pas l'efficacité de réplication du virus dans le tractus respiratoire de macaque et permet l'induction d'une réponse immunitaire protectrice contre le HPIV3 et l'induction d'anticorps dirigés contre la glycoprotéine H du MeV (Skiadopoulos *et al.*, 2001). L'insertion de deux gènes dans le génome du HPIV3 a diminué l'efficacité de réplication du virus *in vitro* et *in vivo* mais le virus recombinant a conservé sa capacité immunogène à la fois contre le vecteur et l'antigène intégré (Skiadopoulos *et al.*, 2002).

Troisièmement, le niveau d'expression de l'antigène est modulable selon le site d'intégration de l'exogène dans le génome du vecteur de par le gradient de transcription propre aux Mononégavirus (voir chapitre d'introduction 4.3). L'impact du positionnement du génome du gène HA du virus de l'influenza a récemment été évalué dans le génome du virus de la maladie de Newcastle (NDV). Cette étude a démontré que l'intégration de HA entre P et M ou M et F du génome du NDV entraînait la synthèse d'un niveau détectable de protéine HA (Ramp *et al.*, 2011). Chez la souris, l'insertion du gène *gag* du VIH entre les différents gènes du génome du vecteur NDV n'empêchait pas la réplication du virus recombinant mais que l'efficacité de la réponse immunitaire cellulaire contre *gag* diminuait lorsque il était intégré de plus en plus en aval du génome du vecteur (Carnero *et al.*, 2009). Une étude effectuée chez le macaque, utilisant le MeV comme vecteur, a démontré que l'intégration du gène codant pour la protéine de surface du virus VHB entre les gènes H et L du virus de la rougeole menait à une expression détectable, permettait la réplication du virus et induisait une immunité dirigée contre le vecteur et l'antigène exogène (del Valle *et al.*, 2007).

Finalement, ils existent plusieurs vaccins déjà utilisés contre certains de ces virus sous la forme de virus atténués. De ce fait, les réponses immunitaires induites par ces virus-vecteurs sont sécuritaires, bien connues et référencées. La souche vaccinale de la rougeole notamment est utilisée depuis les années 1950 et a déjà été étudiée comme plateforme vaccinale contre le VHB

(del Valle *et al.*, 2007), le VIH (Lorin *et al.*, 2004, Guerbois *et al.*, 2009) ou le virus du Nil occidental (Despres *et al.*, 2005).

## **5- Les virus recombinants CDV–NP/HA comme modèles d'étude de la plateforme vaccinale morbillivirus**

Tel qu'expliqué précédemment, les morbillivirus sont des candidats prometteurs comme plateforme vaccinale. Ils infectent directement les cellules présentatrices d'antigènes telles que les macrophages et les cellules dendritiques (Esolen *et al.*, 1993). L'utilisation d'un vecteur recombinant basé sur un morbillivirus permettrait donc d'introduire directement la protéine d'intérêt dans ces cellules. La disponibilité d'une plateforme CDV ainsi que du modèle animal furet permettra la validation des morbillivirus comme plateforme vaccinale contre l'influenza.

L'efficacité du LAIV atténué d'influenza est dépendante de l'immunité préexistante ce qui s'applique également aux vecteurs vaccinaux viraux. Par contre, dans le cas du MeV, il a été démontré que malgré la réponse humorale induite par cette première immunisation après un an, les singes développaient une forte réponse immunitaire contre la protéine de l'enveloppe du VIH lorsque immunisés avec un virus recombinant Mev-VIHenv (Lorin *et al.*, 2004). Également, une seconde vaccination avec le virus du MeV chez des enfants stimule et augmente la réponse immunitaire contre le MeV. Ceci sous-entend que le virus est tout de même capable de se répliquer et de stimuler une nouvelle fois l'immunité préexistante chez l'humain (Dilraj *et al.*, 2000).

L'un des risques associés au virus recombinant est le possible changement de tropisme du virus lorsque la protéine exogène est une protéine médiant l'entrée virale. Toutefois, il a été démontré en utilisant la plateforme du virus parainfluenza humain de type 3 (HPIV3), un paramyxovirus, exprimant la glycoprotéine d'attachement GP du virus Ebola que l'expression de la protéine additionnelle à la surface du virus n'affectait pas son tropisme. En effet, dans le modèle du cochon d'Inde, un modèle hautement susceptible aux HPIV3 et aux virus Ebola, la diffusion du virus HPIV3 recombinant n'a pas changé comparativement au virus contrôle (Bukreyev *et al.*, 2006). Dans le cas des morbillivirus exprimant la protéine HA d'influenza, les enjeux sont moindres. En effet, malgré le fait que nous n'ayons pas détecté de protéines HA dans les particules virales, nous ne pouvons exclure que certaines protéines HA se retrouvent à la surface des virions. Cependant, même si la protéine HA est exprimée à la surface du virus et

même si celle-ci est fonctionnelle, le tropisme ne devrait pas être affecté puisque les morbillivirus et le virus de l'influenza ciblent tous les deux les cellules de l'épithélium du tractus respiratoire (Steinhauer 1999, Muhlebach *et al.*, 2011). Toutefois, l'infection des épithéliums par les morbillivirus se déroule lors de la seconde phase d'infection du virus. Il sera donc nécessaire lors d'études animales d'évaluer le niveau d'infection des épithéliums du tractus respiratoires tôt et tardivement par des coupes histologiques et des marquages immunohistochimiques. La question du tropisme du virus recombinant est particulièrement importante à vérifier dans le cas où la protéine exogène est une hémagglutinine d'origine aviaire telles que les H5 ou H7, dont le récepteur d'attachement est un acide sialique de type  $\alpha$ 2-3 préférentiellement exprimé au niveau de la partie inférieure du tractus respiratoire chez l'homme (Thanh, van Doorn et de Jong 2008).

## **6- Application de la plateforme morbillivirale dans un contexte de virus pandémique d'origine aviaire**

Les virus influenza d'origine aviaire aux potentiels pandémiques tels que les H5N1 et H7N7 sont hautement pathogènes chez l'humain. Les cas référencés d'infections par des virus H5N1 ont été associés à un taux de mortalité avoisinant les 60% (Subbarao et Joseph 2007). De plus, la production de vaccins par des méthodes traditionnelles contre ces virus présente plusieurs difficultés. Outre la nécessité de sites de production adaptés, les virus influenza aviaires hautement pathogènes sont difficiles à produire dans les œufs (El Sahly et Keitel 2008), ce qui limite la quantité de glycoprotéines virales récupérables. De plus, il a été observé lors des premiers essais cliniques effectués avec des vaccins IV ou LAIV dirigés contre les H5N1 que ces derniers étaient moins immunogènes que les vaccins traditionnels (Treanor *et al.*, 2001).

Cependant, contrairement aux vaccins contre des souches humaines circulantes d'influenza, les vaccins dirigés contre des souches non-circulantes d'influenza (SNCI) ne peuvent être évalués que sur leur immunogénicité et non pas sur leur niveau de protection puisqu'il est impossible d'effectuer des suivis épidémiologiques. Les corrélats de protections associés aux SNCI sont ainsi basés sur des extrapolations depuis les modèles animaux tels que les furets ou les macaques (Fan *et al.*, 2009). Ainsi grâce à ces modèles animaux, des recherches sont en cours afin d'augmenter l'immunogénicité des procédés de vaccination contre ces virus. L'utilisation d'adjuvants (Vela *et al.*, 2011), de VLP (Mahmood *et al.*, 2008) ou de plateformes recombinantes adenovirales (Vemula et Mittal 2010), VSV (Schwartz *et al.*, 2011), ou vaccinia (Kreijtz *et al.*, 2009), ont d'ores et déjà été évaluées.

Les recherches en cours dans ce domaine sont basés, dans la grande majorité, sur l'induction d'une réponse immunitaire spécifiquement dirigée contre les glycoprotéines HA et NA. La réponse humorale dirigée contre la protéine HA permet d'empêcher l'entrée du virus. Au contraire, la réponse immunitaire cellulaire quant à elle ne bloque pas l'infection mais permet de limiter la diffusion du virus. Une diminution du taux d'infection le plus tôt possible coïncide avec une diminution des symptômes ce qui permet de limiter la gravité de la maladie (Abdel-Ghafar *et al.*, 2008). Bien que limiter l'infection ne soit pas suffisant comme objectif pour un vaccin saisonnier, une limitation de l'infection, une diminution de la sévérité de la maladie et du taux de mortalité sont des objectifs non-négligeables dans le contexte d'un virus pandémique hautement virulent. Pour cette raison, nous pensons qu'un morbillivirus exprimant les protéines NP et HA répondrait à ces besoins.

De plus, il est possible que le vecteur recombinant stimule l'immunité préexistante. Il a été démontré qu'une immunisation avec un premier virus atténué du HRSV, un pneumovirus de la famille *paramyxoviridae*, suivi d'un virus recombinant du parainfluenza (HPIV), de la famille *paramyxoviridae*, exprimant le gène codant pour la protéine F du HRSV est deux fois plus immunogénique contre la protéine F que lors d'une double immunisation avec le HRSV (Bukreyev *et al.*, 2006). Une telle approche pourrait être envisagée pour stimuler la réponse immunitaire contre un antigène d'influenza peu immunogène tel que les HPIV. Après une première vaccination avec un IV anti-H5N1, un virus recombinant MeV-NP/HA pourrait donc amplifier la réponse immunitaire induite contre le virus H5N1, diminuant la quantité de vaccin IV nécessaire pour protéger la population.

## **7- Application du modèle CDV comme plateforme morbillivirale dans l'étude des traitements viraux oncolytiques.**

Comme mentionné dans le chapitre d'introduction 4.7, les morbillivirus ont un potentiel oncolytique attrayant pour le développement de traitement contre le cancer. Les premières études effectuées avec le MeV ont amenés des résultats prometteurs. La disponibilité d'une plateforme morbillivirale basée sur une souche vaccinale comparable à celui contre le MeV et d'un modèle d'étude animale permettra une évaluation et une optimisation plus rapide de ce système. Une fois le virus recombinant caractérisé *in vivo*, la substitution des gènes codant pour les protéines d'influenza par des antigènes associés aux tumeurs tels que le CEA ou par le gène codant pour le



NIS sera aisée grâce aux cassettes d'intégration génomiques unique que nous avons intégrées dans le génome de la souche vaccinale du CDV. La proximité phylogénique qui existe entre le CDV et le MeV laisse penser que les observations effectuées dans le modèle furet seront applicables chez l'humain. Il sera ainsi possible d'optimiser les traitements actuels et les essais cliniques tels que l'effet de l'immunité préexistante, l'effet synergique ou antagonique des autres drogues anti-tumorales, le tropisme spécifique des virus oncolytiques et la fréquence des traitements (revue par Msaouel, Dispenzieri et Galanis 2009).

## **8- Conclusions et perspectives**

Dans la première partie de mes travaux de doctorat, nous avons pu démontrer le potentiel des SOFA-HDV ribozymes comme traitement contre le virus de l'influenza dans le modèle souris. Les SOFA-HDV ribozymes sont capables de limiter la charge virale tôt au moment de l'infection lorsqu'administrés de manière prophylactique. Cette diminution du niveau d'infection est associée à une amélioration du score clinique de souris. Bien que des expériences additionnelles soient nécessaires afin d'optimiser les couples de ribozymes, de déterminer les paramètres temps et dose ainsi que l'étendue de la protection conférée, nous pensons que les SOFA-HDV ribozymes sont de bons candidats pour de futurs traitements préventifs et curatifs contre les virus d'influenza, quels qu'ils soient.

Grâce au protocole de vaccination par le CDV que nous avons établi chez le furet, à l'optimisation des tests de suivi de la réponse immunitaire cellulaire dans ce modèle ainsi que grâce aux virus recombinants produits, nous sommes désormais dans la possibilité d'évaluer le potentiel des morbillivirus comme plateforme recombinante vaccinale contre le virus de l'influenza dans le modèle furet. Les études qui découleront de nos travaux permettront le développement et l'optimisation de nouveaux vaccins contre les virus de l'influenza et possiblement d'autre virus. Nous pensons que la plateforme vaccinale morbillivirale sera sécuritaire, sans risque de réassortiments et efficace à induire ou stimuler l'immunité contre le virus de l'influenza.

La disponibilité d'un vecteur viral avec un modèle animal optimisé ouvre un grand nombre d'axes de recherches aussi bien dans la caractérisation des réponses immunitaires aux vaccins, dans l'optimisation des vaccins et, voire même, dans le développement de traitement anti-cancéreux.

## **RÉFÉRENCES**

- Abdel-Ghafar, A. N., Chotpitayasunondh, T., Gao, Z., Hayden, F. G., Nguyen, D. H., *et al.* (2008). Update on avian influenza A (H5N1) virus infection in humans. *N Engl J Med* 358: 261-73.
- Alexander, D. J. (2000). Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Rev Sci Tech* 19: 443-62.
- Alkhatib, G., Shen, S. H., Briedis, D., Richardson, C., Massie, B., *et al.* (1994). Functional analysis of N-linked glycosylation mutants of the measles virus fusion protein synthesized by recombinant vaccinia virus vectors. *J Virol* 68: 1522-31.
- Altstein, A. D., Gitelman, A. K., Smirnov, Y. A., Piskareva, L. M., Zakharova, L. G., *et al.* (2006). Immunization with influenza A NP-expressing vaccinia virus recombinant protects mice against experimental infection with human and avian influenza viruses. *Arch Virol* 151: 921-31.
- Ambrose, C. S., Levin, M. J. et Belshe, R. B. (2010). The relative efficacy of trivalent live attenuated and inactivated influenza vaccines in children and adults. *Influenza Other Respi Viruses* 5: 67-75.
- Ansaldi, F., Canepa, P., Parodi, V., Bacilieri, S., Orsi, A., Compagnino, F., Icardi, G. et Durando, P. (2009). Adjuvanted seasonal influenza vaccines and perpetual viral metamorphosis: the importance of cross-protection. *Vaccine* 27: 3345-8.
- Appaiahgari, M. B. et Vрати, S. (2010). IMOJEV((R)): a Yellow fever virus-based novel Japanese encephalitis vaccine. *Expert Rev Vaccines* 9: 1371-84.
- Appel, M. J., Shek, W. R., Shesberadaran, H. et Norrby, E. (1984). Measles virus and inactivated canine distemper virus induce incomplete immunity to canine distemper. *Arch Virol* 82: 73-82.
- Avota, E., Gassert, E. et Schneider-Schaulies, S. (2010). Measles virus-induced immunosuppression: from effectors to mechanisms. *Med Microbiol Immunol* 199: 227-37.
- Baccam, P., Beauchemin, C., Macken, C. A., Hayden, F. G. et Perelson, A. S. (2006). Kinetics of influenza A virus infection in humans. *J Virol* 80: 7590-9.
- Bangari, D. S. et Mittal, S. K. (2006). Development of nonhuman adenoviruses as vaccine vectors. *Vaccine* 24: 849-62.

- Barefoot, B. E., Athearn, K., Sample, C. J. et Ramsburg, E. A. (2009). Intramuscular immunization with a vesicular stomatitis virus recombinant expressing the influenza hemagglutinin provides post-exposure protection against lethal influenza challenge. *Vaccine* 28: 79-89.
- Barefoot, B. E., Sample, C. J. et Ramsburg, E. A. (2009). Recombinant vesicular stomatitis virus expressing influenza nucleoprotein induces CD8 T-cell responses that enhance antibody-mediated protection after lethal challenge with influenza virus. *Clin Vaccine Immunol* 16: 488-98.
- Barnard, D. L. (2009). Animal models for the study of influenza pathogenesis and therapy. *Antiviral Res* 82: A110-22.
- Baron, M. D., Banyard, A. C., Parida, S. et Barrett, T. (2005). The Plowright vaccine strain of Rinderpest virus has attenuating mutations in most genes. *J Gen Virol* 86: 1093-101.
- Barr, I. G., McCauley, J., Cox, N., Daniels, R., Engelhardt, O. G., *et al.* (2010). Epidemiological, antigenic and genetic characteristics of seasonal influenza A(H1N1), A(H3N2) and B influenza viruses: basis for the WHO recommendation on the composition of influenza vaccines for use in the 2009-2010 Northern Hemisphere season. *Vaccine* 28: 1156-67.
- Barrett, T. (1999). Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. *Vet Microbiol* 69: 3-13.
- Baskin, C. R., Bielefeldt-Ohmann, H., Tumpey, T. M., Sabourin, P. J., Long, J. P., *et al.* (2009). Early and sustained innate immune response defines pathology and death in nonhuman primates infected by highly pathogenic influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*: 3455-60.
- Beauverger, P., Buckland, R. et Wild, T. F. (1993). Measles virus antigens induce both type-specific and canine distemper virus cross-reactive cytotoxic T lymphocytes in mice: localization of a common Ld-restricted nucleoprotein epitope. *J Gen Virol* 74 ( Pt 11): 2357-63.
- Been, M. D. et Wickham, G. S. (1997). Self-cleaving ribozymes of hepatitis delta virus RNA. *Eur J Biochem* 247: 741-53.
- Beineke, A., Puff, C., Seehusen, F. et Baumgartner, W. (2008). Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Vet Immunol Immunopathol*: 1-18.
- Bellini, W. J. et Rota, P. A. (1998). Genetic diversity of wild-type measles viruses: implications for global measles elimination programs. *Emerg Infect Dis* 4: 29-35.

- Belshe, R. B., Gruber, W. C., Mendelman, P. M., Mehta, H. B., Mahmood, K., *et al.* (2000). Correlates of immune protection induced by live, attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine. *J Infect Dis* 181: 1133-7.
- Belz, G. T., Wodarz, D., Diaz, G., Nowak, M. A. et Doherty, P. C. (2002). Compromised influenza virus-specific CD8(+)-T-cell memory in CD4(+)-T-cell-deficient mice. *J Virol* 76: 12388-93.
- Benton, K. A., Misplon, J. A., Lo, C. Y., Brutkiewicz, R. R., Prasad, S. A. et Epstein, S. L. (2001). Heterosubtypic immunity to influenza A virus in mice lacking IgA, all Ig, NKT cells, or gamma delta T cells. *J Immunol* 166: 7437-45.
- Bergeron, L. J., Reymond, C. et Perreault, J. P. (2005). Functional characterization of the SOFA delta ribozyme. *Rna* 11: 1858-68.
- Biswas, S. K., Boutz, P. L. et Nayak, D. P. (1998). Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *J Virol* 72: 5493-501.
- Bukreyev, A., Skiadopoulos, M. H., Murphy, B. R. et Collins, P. L. (2006). Nonsegmented negative-strand viruses as vaccine vectors. *J Virol* 80: 10293-306.
- Bukreyev, A., Yang, L., Zaki, S. R., Shieh, W. J., Rollin, P. E., Murphy, B. R., Collins, P. L. et Sanchez, A. (2006). A single intranasal inoculation with a paramyxovirus-vectored vaccine protects guinea pigs against a lethal-dose Ebola virus challenge. *J Virol* 80: 2267-79.
- Butler, D. (2012). Lab flu may not aid vaccines. *Nature* 482: 142-3.
- Carnero, E., Li, W., Borderia, A. V., Moltedo, B., Moran, T. et Garcia-Sastre, A. (2009). Optimization of human immunodeficiency virus gag expression by newcastle disease virus vectors for the induction of potent immune responses. *J Virol* 83: 584-97.
- Carrat, F. et Flahault, A. (2007). Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine* 25: 6852-62.
- Cattaneo, R., Kaelin, K., Baczko, K. et Billeter, M. A. (1989). Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell* 56: 759-64.
- Chen, J., Lee, K. H., Steinhauer, D. A., Stevens, D. J., Skehel, J. J. et Wiley, D. C. (1998). Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. *Cell* 95: 409-17.
- Christensen, J. P., Doherty, P. C., Branum, K. C. et Riberdy, J. M. (2000). Profound protection against respiratory challenge with a lethal H7N7 influenza A virus by increasing the magnitude of CD8(+) T-cell memory. *J Virol* 74: 11690-6.

- Clements, M. L., Betts, R. F., Tierney, E. L. et Murphy, B. R. (1986). Resistance of adults to challenge with influenza A wild-type virus after receiving live or inactivated virus vaccine. *J Clin Microbiol* 23: 73-6.
- Clements, M. L., Betts, R. F., Tierney, E. L. et Murphy, B. R. (1986). Serum and nasal wash antibodies associated with resistance to experimental challenge with influenza A wild-type virus. *J Clin Microbiol* 24: 157-60.
- Cochrane, J. C. et Strobel, S. A. (2008). Catalytic strategies of self-cleaving ribozymes. *Acc Chem Res* 41: 1027-35.
- Compans, R. W., Content, J. et Duesberg, P. H. (1972). Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J Virol* 10: 795-800.
- Couch, R. B. (2008). Seasonal inactivated influenza virus vaccines. *Vaccine* 26 Suppl 4: D5-9.
- Cox, N. J. et Subbarao, K. (1999). Influenza. *Lancet* 354: 1277-82.
- Cross, K. J., Langley, W. A., Russell, R. J., Skehel, J. J. et Steinhauer, D. A. (2009). Composition and functions of the influenza fusion peptide. *Protein Pept Lett* 16: 766-78.
- Crowe, C. R., Chen, K., Pociask, D. A., Alcorn, J. F., Krivich, C., Enelow, R. I., Ross, T. M., Witztum, J. L. et Kolls, J. K. (2009). Critical role of IL-17RA in immunopathology of influenza infection. *J Immunol* 183: 5301-10.
- de Jong, J. C., Beyer, W. E., Palache, A. M., Rimmelzwaan, G. F. et Osterhaus, A. D. (2000). Mismatch between the 1997/1998 influenza vaccine and the major epidemic A(H3N2) virus strain as the cause of an inadequate vaccine-induced antibody response to this strain in the elderly. *J Med Virol* 61: 94-9.
- del Valle, J. R., Devaux, P., Hodge, G., Wegner, N. J., McChesney, M. B. et Cattaneo, R. (2007). A vectored measles virus induces hepatitis B surface antigen antibodies while protecting macaques against measles virus challenge. *J Virol* 81: 10597-605.
- Despres, P., Combredet, C., Frenkiel, M. P., Lorin, C., Brahic, M. et Tangy, F. (2005). Live measles vaccine expressing the secreted form of the West Nile virus envelope glycoprotein protects against West Nile virus encephalitis. *J Infect Dis* 191: 207-14.
- Dharan, N. J., Gubareva, L. V., Meyer, J. J., Okomo-Adhiambo, M., McClinton, R. C., et al. (2009). Infections with oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in the United States. *Jama* 301: 1034-41.

- Dias, A., Bouvier, D., Crepin, T., McCarthy, A. A., Hart, D. J., Baudin, F., Cusack, S. et Ruigrok, R. W. (2009). The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* 458: 914-8.
- Dilraj, A., Cutts, F. T., de Castro, J. F., Wheeler, J. G., Brown, D., Roth, C., Coovadia, H. M. et Bennett, J. V. (2000). Response to different measles vaccine strains given by aerosol and subcutaneous routes to schoolchildren: a randomised trial. *Lancet* 355: 798-803.
- Doherty, E. A. et Doudna, J. A. (2000). Ribozyme structures and mechanisms. *Annu Rev Biochem* 69: 597-615.
- Doherty, P. C., Turner, S. J., Webby, R. G. et Thomas, P. G. (2006). Influenza and the challenge for immunology. *Nat Immunol* 7: 449-55.
- Dowdle, W. R., Downie, J. C. et Laver, W. G. (1974). Inhibition of virus release by antibodies to surface antigens of influenza viruses. *J Virol* 13: 269-75.
- Eccles, R. (2005). Understanding the symptoms of the common cold and influenza. *Lancet Infect Dis* 5: 718-25.
- Eichelberger, M. C., Wang, M. L., Allan, W., Webster, R. G. et Doherty, P. C. (1991). Influenza virus RNA in the lung and lymphoid tissue of immunologically intact and CD4-depleted mice. *J Gen Virol* 72 ( Pt 7): 1695-8.
- El Mubarak, H. S., Yuksel, S., van Amerongen, G., Mulder, P. G., Mukhtar, M. M., Osterhaus, A. D. et de Swart, R. L. (2007). Infection of cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) and rhesus macaques (*Macaca mulatta*) with different wild-type measles viruses. *J Gen Virol* 88: 2028-34.
- El Sahly, H. M. et Keitel, W. A. (2008). Pandemic H5N1 influenza vaccine development: an update. *Expert Rev Vaccines* 7: 241-7.
- Enders, J. F. et Peebles, T. C. (1954). Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc Soc Exp Biol Med* 86: 277-86.
- Epstein, S. L., Kong, W. P., Misplon, J. A., Lo, C. Y., Tumpey, T. M., Xu, L. et Nabel, G. J. (2005). Protection against multiple influenza A subtypes by vaccination with highly conserved nucleoprotein. *Vaccine* 23: 5404-10.
- Epstein, S. L., Lo, C. Y., Misplon, J. A., Lawson, C. M., Hendrickson, B. A., Max, E. E. et Subbarao, K. (1997). Mechanisms of heterosubtypic immunity to lethal influenza A virus infection in fully immunocompetent, T cell-depleted, beta2-microglobulin-deficient, and J chain-deficient mice. *J Immunol* 158: 1222-30.
- Esolen, L. M., Ward, B. J., Moench, T. R. et Griffin, D. E. (1993). Infection of monocytes during measles. *J Infect Dis* 168: 47-52.

- Fan, S., Gao, Y., Shinya, K., Li, C. K., Li, Y., *et al.* (2009). Immunogenicity and protective efficacy of a live attenuated H5N1 vaccine in nonhuman primates. *PLoS Pathog* 5: e1000409.
- Forrest, B. D., Pride, M. W., Dunning, A. J., Capeding, M. R., Chotpitayasunondh, T., Tam, J. S., Rappaport, R., Eldridge, J. H. et Gruber, W. C. (2008). Correlation of cellular immune responses with protection against culture-confirmed influenza virus in young children. *Clin Vaccine Immunol* 15: 1042-53.
- Francis, T. et Magill, T. P. (1935). Immunological Studies with the Virus of Influenza. *J Exp Med* 62: 505-16.
- Galanis, E., Hartmann, L. C., Cliby, W. A., Long, H. J., Peethambaram, P. P., *et al.* (2010). Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer. *Cancer Res* 70: 875-82.
- Gamblin, S. J. et Skehel, J. J. (2010). Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J Biol Chem* 285: 28403-9.
- Gerdil, C. (2003). The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine* 21: 1776-9.
- Gerlier, D. et Valentin, H. (2009). Measles virus interaction with host cells and impact on innate immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 329: 163-91.
- Gomez-Casado, E., Estepa, A. et Coll, J. M. (2010). A comparative review on European-farmed finfish RNA viruses and their vaccines. *Vaccine* 29: 2657-71.
- Govorkova, E. A., Rehg, J. E., Krauss, S., Yen, H. L., Guan, Y., *et al.* (2005). Lethality to ferrets of H5N1 influenza viruses isolated from humans and poultry in 2004. *J Virol* 79: 2191-8.
- Green, R. G. et Stulberg, C. S. (1946). Distemper virus interference in canine distemper. *Science* 103: 497.
- Griffin, D. E. (2001). Measles virus. In *Fields Virology, 4th ed, vol.1*, edited by B.N.F.a.D.M. Knipe. Philadelphia, PA : Lippincott Williams & Wilkins.
- Griffin, D. E. et Pan, C. H. (2009). Measles: old vaccines, new vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol* 330: 191-212.
- Griffin, D. E. et Ward, B. J. (1993). Differential CD4 T cell activation in measles. *J Infect Dis* 168: 275-81.



- Guerbois, M., Moris, A., Combredet, C., Najburg, V., Ruffie, C., *et al.* (2009). Live attenuated measles vaccine expressing HIV-1 Gag virus like particles covered with gp160DeltaV1V2 is strongly immunogenic. *Virology*.
- Hale, B. G., Randall, R. E., Ortin, J. et Jackson, D. (2008). The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol* 89: 2359-76.
- Harrison, S. C. (2008). Viral membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* 15: 690-8.
- Helfand, R. F., Kebede, S., Gary, H. E., Jr., Beyene, H. et Bellini, W. J. (1999). Timing of development of measles-specific immunoglobulin M and G after primary measles vaccination. *Clin Diagn Lab Immunol* 6: 178-80.
- Ho, A. W., Prabhu, N., Betts, R. J., Ge, M. Q., Dai, X., *et al.* (2011). Lung CD103+ dendritic cells efficiently transport influenza virus to the lymph node and load viral antigen onto MHC class I for presentation to CD8 T cells. *J Immunol* 187: 6011-21.
- Hoft, D. F., Babusis, E., Worku, S., Spencer, C. T., Lottenbach, K., *et al.* (2011). Live and inactivated influenza vaccines induce similar humoral responses, but only live vaccines induce diverse T-cell responses in young children. *J Infect Dis* 204: 845-53.
- Hoopes, J. D., Driebe, E. M., Kelley, E., Engelthaler, D. M., Keim, P. S., Perelson, A. S., Rong, L., Went, G. T. et Nguyen, J. T. (2011). Triple combination antiviral drug (TCAD) composed of amantadine, oseltamivir, and ribavirin impedes the selection of drug-resistant influenza A virus. *PLoS One* 6: e29778.
- Hussey, G. D. et Clements, C. J. (1996). Clinical problems in measles case management. *Ann Trop Paediatr* 16: 307-17.
- Ichinohe, T., Watanabe, I., Ito, S., Fujii, H., Moriyama, M., *et al.* (2005). Synthetic double-stranded RNA poly(I:C) combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. *J Virol* 79: 2910-9.
- Itoh, Y., Shinya, K., Kiso, M., Watanabe, T., Sakoda, Y., *et al.* (2009). In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature*: 1021-5.
- Jegerlehner, A., Schmitz, N., Storni, T. et Bachmann, M. F. (2004). Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2: weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity. *J Immunol* 172: 5598-605.
- Kamps, Hoffmann, E. et Preiser (2006). Influenza report. *Flying Publisher*.

- Karron, R. A., Thumar, B., Schappell, E., Surman, S., Murphy, B. R., Collins, P. L. et Schmidt, A. C. (2011). Evaluation of two chimeric bovine-human parainfluenza virus type 3 vaccines in infants and young children. *Vaccine*.
- Katz, S. L. (2009). John F. Enders and measles virus vaccine--a reminiscence. *Curr Top Microbiol Immunol* 329: 3-11.
- Katz, S. L., Enders, J. F. et Holloway, A. (1960). Studies on an attenuated measles-virus vaccine. II. Clinical, virologic and immunologic effects of vaccine in institutionalized children. *N Engl J Med* 263: 159-61.
- Kauffman, C. A., Bergman, A. G. et O'Connor, R. P. (1982). Distemper virus infection in ferrets: an animal model of measles-induced immunosuppression. *Clin Exp Immunol* 47: 617-25.
- Kolakofsky, D., Pelet, T., Garcin, D., Hausmann, S., Curran, J. et Roux, L. (1998). Paramyxovirus RNA synthesis and the requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited. *J Virol* 72: 891-9.
- Kreijtz, J. H., Suezer, Y., de Mutsert, G., van den Brand, J. M., van Amerongen, G., et al. (2009). Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing the hemagglutinin gene confers protection against homologous and heterologous H5N1 influenza virus infections in macaques. *J Infect Dis* 199: 405-13.
- Kreijtz, J. H., Suezer, Y., van Amerongen, G., de Mutsert, G., Schnierle, B. S., et al. (2007). Recombinant modified vaccinia virus Ankara-based vaccine induces protective immunity in mice against infection with influenza virus H5N1. *J Infect Dis* 195: 1598-606.
- Kreijtz, J. H., Suzer, Y., Bodewes, R., Schwantes, A., van Amerongen, G., et al. (2010). Evaluation of a modified vaccinia virus Ankara (MVA)-based candidate pandemic influenza A/H1N1 vaccine in the ferret model. *J Gen Virol* 91: 2745-52.
- Krumbholz, A., Philipps, A., Oehring, H., Schwarzer, K., Eitner, A., Wutzler, P. et Zell, R. (2011). Current knowledge on PB1-F2 of influenza A viruses. *Med Microbiol Immunol* 200: 69-75.
- Kugel, D., Kochs, G., Obojes, K., Roth, J., Kobinger, G. P., Kobasa, D., Haller, O., Staeheli, P. et von Messling, V. (2009). Intranasal administration of alpha interferon reduces seasonal influenza A virus morbidity in ferrets. *J Virol* 83: 3843-51.
- Kunzel, W., Glathe, H., Engelmann, H. et Van Hoecke, C. (1996). Kinetics of humoral antibody response to trivalent inactivated split influenza vaccine in subjects previously vaccinated or vaccinated for the first time. *Vaccine* 14: 1108-10.

- Kutzler, M. A. et Weiner, D. B. (2008). DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev Genet* 9: 776-88.
- Lalor, P. A., Webby, R. J., Morrow, J., Rusalov, D., Kaslow, D. C., Rolland, A. et Smith, L. R. (2008). Plasmid DNA-based vaccines protect mice and ferrets against lethal challenge with A/Vietnam/1203/04 (H5N1) influenza virus. *J Infect Dis* 197: 1643-52.
- Lam, W. Y., Yeung, A. C., Chu, I. M. et Chan, P. K. (2010). Profiles of cytokine and chemokine gene expression in human pulmonary epithelial cells induced by human and avian influenza viruses. *Virol J* 7: 344-353.
- Lamb, R. A. et Krug, R. M. (1996). Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. *Fields Virology 3rd edition Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia*: 1353-1396. in B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, et D.E.Griffin.
- Legge, K. L. et Braciale, T. J. (2003). Accelerated migration of respiratory dendritic cells to the regional lymph nodes is limited to the early phase of pulmonary infection. *Immunity* 18: 265-77.
- Levesque, D., Choufani, S. et Perreault, J. P. (2002). Delta ribozyme benefits from a good stability in vitro that becomes outstanding in vivo. *Rna* 8: 464-77.
- Liang, S., Mozdzanowska, K., Palladino, G. et Gerhard, W. (1994). Heterosubtypic immunity to influenza type A virus in mice. Effector mechanisms and their longevity. *J Immunol* 152: 1653-61.
- Liljeroos, L., Huiskonen, J. T., Ora, A., Susi, P. et Butcher, S. J. (2011). Electron cryotomography of measles virus reveals how matrix protein coats the ribonucleocapsid within intact virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 18085-90.
- Lindsley, W. G., Blachere, F. M., Thewlis, R. E., Vishnu, A., Davis, K. A., et al. (2010). Measurements of airborne influenza virus in aerosol particles from human coughs. *PLoS One* 5: e15001-7.
- Longhi, S. (2009). Nucleocapsid structure and function. *Curr Top Microbiol Immunol* 329: 103-28.
- Lorin, C., Mollet, L., Delebecque, F., Combredet, C., Hurtrel, B., Charneau, P., Brahic, M. et Tangy, F. (2004). A single injection of recombinant measles virus vaccines expressing human immunodeficiency virus (HIV) type 1 clade B envelope glycoproteins induces neutralizing antibodies and cellular immune responses to HIV. *J Virol* 78: 146-57.
- Lu, X., Tumpey, T. M., Morken, T., Zaki, S. R., Cox, N. J. et Katz, J. M. (1999). A mouse model for the evaluation of pathogenesis and immunity to influenza A (H5N1) viruses isolated from humans. *J Virol* 73: 5903-11.

- Maher, J. A. et DeStefano, J. (2004). The ferret: an animal model to study influenza virus. *Lab Anim (NY)* 33: 50-3.
- Mahmood, K., Bright, R. A., Mytle, N., Carter, D. M., Crevar, C. J., Achenbach, J. E., Heaton, P. M., Tumpey, T. M. et Ross, T. M. (2008). H5N1 VLP vaccine induced protection in ferrets against lethal challenge with highly pathogenic H5N1 influenza viruses. *Vaccine* 26: 5393-9.
- Maines, T. R., Jayaraman, A., Belser, J. A., Wadford, D. A., Pappas, C., et al. (2009). Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses in ferrets and mice. *Science* 325: 484-7.
- Malvoisin, E. et Wild, F. (1990). Contribution of measles virus fusion protein in protective immunity: anti-F monoclonal antibodies neutralize virus infectivity and protect mice against challenge. *J Virol* 64: 5160-2.
- Manicassamy, B., Medina, R. A., Hai, R., Tsibane, T., Stertz, S., Nistal-Villan, E., Palese, P., Basler, C. F. et Garcia-Sastre, A. (2010). Protection of mice against lethal challenge with 2009 H1N1 influenza A virus by 1918-like and classical swine H1N1 based vaccines. *PLoS Pathog* 6: e1000745 1-14.
- Mantel, N., Girerd, Y., Geny, C., Bernard, I., Pontvianne, J., Lang, J. et Barban, V. (2011). Genetic stability of a dengue vaccine based on chimeric yellow fever/dengue viruses. *Vaccine* 29: 6629-35.
- Marcelin, G., DuBois, R., Rubrum, A., Russell, C. J., McElhaney, J. E. et Webby, R. J. (2011). A contributing role for anti-neuraminidase antibodies on immunity to pandemic H1N1 2009 influenza A virus. *PLoS One* 6: e26335 1-10.
- Martin, K. et Helenius, A. (1991). Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* 67: 117-30.
- Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A. et Klenk, H. D. (2004). Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4620-4.
- Matsuoka, Y., Lamirande, E. W. et Subbarao, K. (2009). The mouse model for influenza. *Curr Protoc Microbiol* Chapter 15: Unit 15G 3.
- Matzinger, S. R., Carroll, T. D., Fritts, L., McChesney, M. B. et Miller, C. J. (2010). Exogenous IFN-alpha administration reduces influenza A virus replication in the lower respiratory tract of rhesus macaques. *PLoS One* 6: e29255 1-5.

- McGill, J., Van Rooijen, N. et Legge, K. L. (2008). Protective influenza-specific CD8 T cell responses require interactions with dendritic cells in the lungs. *J Exp Med* 205: 1635-46.
- McKee, A. S., Munks, M. W., MacLeod, M. K., Fleenor, C. J., Van Rooijen, N., Kappler, J. W. et Marrack, P. (2009). Alum induces innate immune responses through macrophage and mast cell sensors, but these sensors are not required for alum to act as an adjuvant for specific immunity. *J Immunol* 183: 4403-14.
- McNamee, L. A. et Harmsen, A. G. (2006). Both influenza-induced neutrophil dysfunction and neutrophil-independent mechanisms contribute to increased susceptibility to a secondary *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun* 74: 6707-21.
- Medina, R. A., Manicassamy, B., Stertz, S., Seibert, C. W., Hai, R., et al. (2010). Pandemic 2009 H1N1 vaccine protects against 1918 Spanish influenza virus. *Nat Commun* 1: 28-33.
- Mishin, V. P., Nedyalkova, M. S., Hayden, F. G. et Gubareva, L. V. (2005). Protection afforded by intranasal immunization with the neuraminidase-lacking mutant of influenza A virus in a ferret model. *Vaccine* 23: 2922-7.
- Moldoveanu, Z., Clements, M. L., Prince, S. J., Murphy, B. R. et Mestecky, J. (1995). Human immune responses to influenza virus vaccines administered by systemic or mucosal routes. *Vaccine* 13: 1006-12.
- Montali, R. J., Bartz, C. R., Teare, J. A., Allen, J. T., Appel, M. J. et Bush, M. (1983). Clinical trials with canine distemper vaccines in exotic carnivores. *J Am Vet Med Assoc* 183: 1163-7.
- Monto, A. S., Ohmit, S. E., Petrie, J. G., Johnson, E., Truscon, R., Teich, E., Rotthoff, J., Boulton, M. et Victor, J. C. (2009). Comparative efficacy of inactivated and live attenuated influenza vaccines. *N Engl J Med* 361: 1260-7.
- Morel, S., Didierlaurent, A., Bourguignon, P., Delhay, S., Baras, B., et al. (2011). Adjuvant System AS03 containing alpha-tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. *Vaccine* 29: 2461-73.
- Morens, D. M., Taubenberger, J. K. et Fauci, A. S. (2008). Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J Infect Dis* 198: 962-70.
- Mori, I., Komatsu, T., Takeuchi, K., Nakakuki, K., Sudo, M. et Kimura, Y. (1995). In vivo induction of apoptosis by influenza virus. *J Gen Virol* 76 ( Pt 11): 2869-73.
- Moscona, A. (2005). Neuraminidase inhibitors for influenza. *N Engl J Med* 353: 1363-73.

- Moskophidis, D. et Kioussis, D. (1998). Contribution of virus-specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells to virus clearance or pathologic manifestations of influenza virus infection in a T cell receptor transgenic mouse model. *J Exp Med* 188: 223-32.
- Moss, R. B., Davey, R. T., Steigbigel, R. T. et Fang, F. (2010). Targeting pandemic influenza: a primer on influenza antivirals and drug resistance. *J Antimicrob Chemother* 65: 1086-93.
- Moss, W. J. et Griffin, D. E. (2006). Global measles elimination. *Nat Rev Microbiol* 4: 900-8.
- Moss, W. J., Ota, M. O. et Griffin, D. E. (2004). Measles: immune suppression and immune responses. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 1380-5.
- Mozdzanowska, K., Furchner, M., Maiese, K. et Gerhard, W. (1997). CD4<sup>+</sup> T cells are ineffective in clearing a pulmonary infection with influenza type A virus in the absence of B cells. *Virology* 239: 217-25.
- Mozdzanowska, K., Furchner, M., Washko, G., Mozdzanowski, J. et Gerhard, W. (1997). A pulmonary influenza virus infection in SCID mice can be cured by treatment with hemagglutinin-specific antibodies that display very low virus-neutralizing activity in vitro. *J Virol* 71: 4347-55.
- Mozdzanowska, K., Maiese, K., Furchner, M. et Gerhard, W. (1999). Treatment of influenza virus-infected SCID mice with nonneutralizing antibodies specific for the transmembrane proteins matrix 2 and neuraminidase reduces the pulmonary virus titer but fails to clear the infection. *Virology* 254: 138-46.
- Msaouel, P., Dispenzieri, A. et Galanis, E. (2009). Clinical testing of engineered oncolytic measles virus strains in the treatment of cancer: an overview. *Curr Opin Mol Ther* 11: 43-53.
- Mueller, S. N., Langley, W. A., Carnero, E., Garcia-Sastre, A. et Ahmed, R. (2010). Immunization with live attenuated influenza viruses that express altered NS1 proteins results in potent and protective memory CD8<sup>+</sup> T-cell responses. *J Virol* 84: 1847-55.
- Muhlebach, M. D., Mateo, M., Sinn, P. L., Prufer, S., Uhlig, K. M., et al. (2011). Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature*: 530-3.
- Munster, V. J., de Wit, E., van den Brand, J. M., Herfst, S., Schrauwen, E. J., et al. (2009). Pathogenesis and transmission of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza virus in ferrets. *Science* 325: 481-3.
- Murphy, B. et Webster, R. G. (1996). Orthomyxoviruses. *Fields Virology 3rd edition* Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia: 1397-1445.

- Murphy, K., Travers, P., Walport, M. et Janeway, C. (2008). Immunobiology. 6th ed.
- Nakai, M. et Imagawa, D. T. (1969). Electron microscopy of measles virus replication. *J Virol* 3: 187-97.
- Nakamura, R., Maeda, N., Shibata, K., Yamada, H., Kase, T. et Yoshikai, Y. (2010). Interleukin-15 is critical in the pathogenesis of influenza a virus-induced acute lung injury. *J Virol* 84: 5574-82.
- Nanan, R., Carstens, C. et Kreth, H. W. (1995). Demonstration of virus-specific CD8+ memory T cells in measles-seropositive individuals by in vitro peptide stimulation. *Clin Exp Immunol* 102: 40-5.
- Narasaraju, T., Sim, M. K., Ng, H. H., Phoon, M. C., Shanker, N., Lal, S. K. et Chow, V. T. (2009). Adaptation of human influenza H3N2 virus in a mouse pneumonitis model: insights into viral virulence, tissue tropism and host pathogenesis. *Microbes Infect* 11: 2-11.
- Nguyen, H. H., Moldoveanu, Z., Novak, M. J., van Ginkel, F. W., Ban, E., Kiyono, H., McGhee, J. R. et Mestecky, J. (1999). Heterosubtypic immunity to lethal influenza A virus infection is associated with virus-specific CD8(+) cytotoxic T lymphocyte responses induced in mucosa-associated tissues. *Virology* 254: 50-60.
- Niewiesk, S. (2009). Current animal models: cotton rat animal model. *Curr Top Microbiol Immunol* 330: 89-110.
- Noda, T. et Kawaoka, Y. (2010). Structure of influenza virus ribonucleoprotein complexes and their packaging into virions. *Rev Med Virol* 20: 380-91.
- Norrby, E., Sheshberadaran, H., McCullough, K. C., Carpenter, W. C. et Orvell, C. (1985). Is rinderpest virus the archevirus of the Morbillivirus genus? *Intervirology* 23: 228-32.
- Noyce, R. S., Bondre, D. G., Ha, M. N., Lin, L. T., Sisson, G., Tsao, M. S. et Richardson, C. D. (2011). Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *PLoS Pathog* 7: e1002240 1-24.
- Osorio, J. E., Huang, C. Y., Kinney, R. M. et Stinchcomb, D. T. (2011). Development of DENVax: a chimeric dengue-2 PDK-53-based tetravalent vaccine for protection against dengue fever. *Vaccine* 29: 7251-60.
- Palese, P. et Shaw, M. L. (2007). Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology, 5th ed, vol.1*, edited by B.N.F.a.D.M. Knipe. Philadelphia, PA : Lippincott Williams & Wilkins.

- Palladino, G., Mozdzanowska, K., Washko, G. et Gerhard, W. (1995). Virus-neutralizing antibodies of immunoglobulin G (IgG) but not of IgM or IgA isotypes can cure influenza virus pneumonia in SCID mice. *J Virol* 69: 2075-81.
- Permar, S. R., Klumpp, S. A., Mansfield, K. G., Kim, W. K., Gorgone, D. A., *et al.* (2003). Role of CD8(+) lymphocytes in control and clearance of measles virus infection of rhesus monkeys. *J Virol* 77: 4396-400.
- Perrone, L. A., Szretter, K. J., Katz, J. M., Mizgerd, J. P. et Tumpey, T. M. (2010). Mice lacking both TNF and IL-1 receptors exhibit reduced lung inflammation and delay in onset of death following infection with a highly virulent H5N1 virus. *J Infect Dis* 202: 1161-70.
- Perrotta, A. T. et Been, M. D. (1990). The self-cleaving domain from the genomic RNA of hepatitis delta virus: sequence requirements and the effects of denaturant. *Nucleic Acids Res* 18: 6821-7.
- Pfleiderer, M., Lower, J. et Kurth, R. (2002). Cold-attenuated live influenza vaccines, a risk-benefit assessment. *Vaccine* 20: 886-94.
- Pillet, S., Svitek, N. et von Messling, V. (2009). Ferrets as a model for morbillivirus pathogenesis, complications, and vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol* 330: 73-87.
- Piqueras, B., Connolly, J., Freitas, H., Palucka, A. K. et Banchereau, J. (2006). Upon viral exposure, myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce 3 waves of distinct chemokines to recruit immune effectors. *Blood* 107: 2613-8.
- Pittet, L. A., Hall-Stoodley, L., Rutkowski, M. R. et Harmsen, A. G. (2010). Influenza virus infection decreases tracheal mucociliary velocity and clearance of *Streptococcus pneumoniae*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42: 450-60.
- Plumet, S., Duprex, W. P. et Gerlier, D. (2005). Dynamics of viral RNA synthesis during measles virus infection. *J Virol* 79: 6900-8.
- Poch, O., Blumberg, B. M., Bougueleret, L. et Tordo, N. (1990). Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *J Gen Virol* 71 ( Pt 5): 1153-62.
- Polack, F. P. (2007). Atypical measles and enhanced respiratory syncytial virus disease (ERD) made simple. *Pediatr Res* 62: 111-5.
- Potter, C. W. (2001). A history of influenza. *J Appl Microbiol* 91: 572-9.
- Potter, C. W. et Oxford, J. S. (1979). Determinants of immunity to influenza infection in man. *Br Med Bull* 35: 69-75.



- Powell, T. J., Strutt, T., Reome, J., Hollenbaugh, J. A., Roberts, A. D., Woodland, D. L., Swain, S. L. et Dutton, R. W. (2007). Priming with cold-adapted influenza A does not prevent infection but elicits long-lived protection against supralethal challenge with heterosubtypic virus. *J Immunol* 178: 1030-8.
- Quan, F. S., Huang, C., Compans, R. W. et Kang, S. M. (2007). Virus-like particle vaccine induces protective immunity against homologous and heterologous strains of influenza virus. *J Virol* 81: 3514-24.
- Ramp, K., Skiba, M., Karger, A., Mettenleiter, T. C. et Romer-Oberdorfer, A. (2011). Influence of insertion site of the avian influenza virus haemagglutinin (HA) gene within the Newcastle disease virus genome on HA expression. *J Gen Virol* 92: 355-60.
- Reiss, C. S. et Schulman, J. L. (1980). Cellular immune responses of mice to influenza virus vaccines. *J Immunol* 125: 2182-8.
- Renegar, K. B., Small, P. A., Jr., Boykins, L. G. et Wright, P. F. (2004). Role of IgA versus IgG in the control of influenza viral infection in the murine respiratory tract. *J Immunol* 173: 1978-86.
- Riberdy, J. M., Christensen, J. P., Branum, K. et Doherty, P. C. (2000). Diminished primary and secondary influenza virus-specific CD8(+) T-cell responses in CD4-depleted Ig(-/-) mice. *J Virol* 74: 9762-5.
- Riedel, S. (2005). Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 18: 21-5.
- Rima, B. K. et Duprex, W. P. (2009). The measles virus replication cycle. *Curr Top Microbiol Immunol* 329: 77-102.
- Rimmelzwaan, G. F. et McElhaney, J. E. (2008). Correlates of protection: novel generations of influenza vaccines. *Vaccine* 26 Suppl 4: D41-4.
- Rossmann, J. S. et Lamb, R. A. (2011). Influenza virus assembly and budding. *Virology* 411: 229-36.
- Runkler, N., Pohl, C., Schneider-Schaulies, S., Klenk, H. D. et Maisner, A. (2007). Measles virus nucleocapsid transport to the plasma membrane requires stable expression and surface accumulation of the viral matrix protein. *Cell Microbiol* 9: 1203-14.
- Scherle, P. A. et Gerhard, W. (1986). Functional analysis of influenza-specific helper T cell clones in vivo. T cells specific for internal viral proteins provide cognate help for B cell responses to hemagglutinin. *J Exp Med* 164: 1114-28.

- Schulman, J. L. et Kilbourne, E. D. (1965). Induction of Partial Specific Heterotypic Immunity in Mice by a Single Infection with Influenza a Virus. *J Bacteriol* 89: 170-4.
- Schwartz, J. A., Buonocore, L., Suguitan, A., Jr., Hunter, M., Marx, P. A., Subbarao, K. et Rose, J. K. (2011). Vesicular stomatitis virus-based H5N1 avian influenza vaccines induce potent cross-clade neutralizing antibodies in rhesus macaques. *J Virol* 85: 4602-5.
- Sellin, C. I. et Horvat, B. (2009). Current animal models: transgenic animal models for the study of measles pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 330: 111-27.
- Semizarov, D., Frost, L., Sarthy, A., Kroeger, P., Halbert, D. N. et Fesik, S. W. (2003). Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 6347-52.
- Sheshberadaran, H., Norrby, E., McCullough, K. C., Carpenter, W. C. et Orvell, C. (1986). The antigenic relationship between measles, canine distemper and rinderpest viruses studied with monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 67 ( Pt 7): 1381-92.
- Shimizu, T., Takizawa, N., Watanabe, K., Nagata, K. et Kobayashi, N. (2011). Crucial role of the influenza virus NS2 (NEP) C-terminal domain in M1 binding and nuclear export of vRNP. *FEBS Lett* 585: 41-6.
- Singh, M., Cattaneo, R. et Billeter, M. A. (1999). A recombinant measles virus expressing hepatitis B virus surface antigen induces humoral immune responses in genetically modified mice. *J Virol* 73: 4823-8.
- Skiadopoulos, M. H., Surman, S. R., Riggs, J. M., Collins, P. L. et Murphy, B. R. (2001). A chimeric human-bovine parainfluenza virus type 3 expressing measles virus hemagglutinin is attenuated for replication but is still immunogenic in rhesus monkeys. *J Virol* 75: 10498-504.
- Skiadopoulos, M. H., Surman, S. R., Riggs, J. M., Orvell, C., Collins, P. L. et Murphy, B. R. (2002). Evaluation of the replication and immunogenicity of recombinant human parainfluenza virus type 3 vectors expressing up to three foreign glycoproteins. *Virology* 297: 136-52.
- Smith, E. C., Popa, A., Chang, A., Masante, C. et Dutch, R. E. (2009). Viral entry mechanisms: the increasing diversity of paramyxovirus entry. *Febs J* 276: 7217-27.
- Smith, G. J., Vijaykrishna, D., Bahl, J., Lycett, S. J., Worobey, M., et al. (2009). Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 459: 1122-5.

- Solovyev, V. D. et Lozovskaya, L. B. (1961). Inactivated measles vaccine. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 5: 454-60.
- Steinhauer, D. A. (1999). Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* 258: 1-20.
- Steitz, J., Barlow, P. G., Hossain, J., Kim, E., Okada, K., Kenniston, T., Rea, S., Donis, R. O. et Gambotto, A. (2010). A candidate H1N1 pandemic influenza vaccine elicits protective immunity in mice. *PLoS One* 5: e10492 1-6.
- Stephensen, C. B., Welter, J., Thaker, S. R., Taylor, J., Tartaglia, J. et Paoletti, E. (1997). Canine distemper virus (CDV) infection of ferrets as a model for testing Morbillivirus vaccine strategies: NYVAC- and ALVAC-based CDV recombinants protect against symptomatic infection. *J Virol* 71: 1506-13.
- Storms, A. D., Gubareva, L. V., Su, S., Wheeling, J. T., Okomo-Adhiambo, M., et al. (2012). Oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus infections, United States, 2010-11. *Emerg Infect Dis* 18: 308-11.
- Stricker, R., Mottet, G. et Roux, L. (1994). The Sendai virus matrix protein appears to be recruited in the cytoplasm by the viral nucleocapsid to function in viral assembly and budding. *J Gen Virol* 75 ( Pt 5): 1031-42.
- Subbarao, K. et Joseph, T. (2007). Scientific barriers to developing vaccines against avian influenza viruses. *Nat Rev Immunol* 7: 267-78.
- Summers, B. A., Greisen, H. A. et Appel, M. J. (1984). Canine distemper encephalomyelitis: variation with virus strain. *J Comp Pathol* 94: 65-75.
- Suryanarayana, K., Baczko, K., ter Meulen, V. et Wagner, R. R. (1994). Transcription inhibition and other properties of matrix proteins expressed by M genes cloned from measles viruses and diseased human brain tissue. *J Virol* 68: 1532-43.
- Suzuki, H., Saito, R., Masuda, H., Oshitani, H., Sato, M. et Sato, I. (2003). Emergence of amantadine-resistant influenza A viruses: epidemiological study. *J Infect Chemother* 9: 195-200.
- Suzuki, Y. (2005). Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. *Biol Pharm Bull* 28: 399-408.
- Svitek, N., Rudd, P. A., Obojes, K., Pillet, S. et von Messling, V. (2008). Severe seasonal influenza in ferrets correlates with reduced interferon and increased IL-6 induction. *Virology* 376: 53-9.
- Takeda, M. (2008). Measles virus breaks through epithelial cell barriers to achieve transmission. *J Clin Invest* 118: 2386-9.

- Takeda, M., Pekosz, A., Shuck, K., Pinto, L. H. et Lamb, R. A. (2002). Influenza A virus M2 ion channel activity is essential for efficient replication in tissue culture. *J Virol* 76: 1391-9.
- Tamura, M., Webster, R. G. et Ennis, F. A. (1994). Subtype cross-reactive, infection-enhancing antibody responses to influenza A viruses. *J Virol* 68: 3499-504.
- Tatsuo, H., Ono, N. et Yanagi, Y. (2001). Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *J Virol* 75: 5842-50.
- Taylor, P. M. et Askonas, B. A. (1986). Influenza nucleoprotein-specific cytotoxic T-cell clones are protective in vivo. *Immunology* 58: 417-20.
- Thanh, T. T., van Doorn, H. R. et de Jong, M. D. (2008). Human H5N1 influenza: current insight into pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 2671-4.
- Tompkins, S. M., Lo, C. Y., Tumpey, T. M. et Epstein, S. L. (2004). Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8682-6.
- Tong, S., Li, Y., Rivaller, P., Conrardy, C., Castillo, D. A., et al. (2012). A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 4269-74.
- Topham, D. J. et Doherty, P. C. (1998). Clearance of an influenza A virus by CD4+ T cells is inefficient in the absence of B cells. *J Virol* 72: 882-5.
- Topham, D. J., Tripp, R. A. et Doherty, P. C. (1997). CD8+ T cells clear influenza virus by perforin or Fas-dependent processes. *J Immunol* 159: 5197-200.
- Treanor, J. J., Kotloff, K., Betts, R. F., Belshe, R., Newman, F., Iacuzio, D., Wittes, J. et Bryant, M. (1999). Evaluation of trivalent, live, cold-adapted (CAIV-T) and inactivated (TIV) influenza vaccines in prevention of virus infection and illness following challenge of adults with wild-type influenza A (H1N1), A (H3N2), and B viruses. *Vaccine* 18: 899-906.
- Treanor, J. J., Wilkinson, B. E., Maseoud, F., Hu-Primmer, J., Battaglia, R., et al. (2001). Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin vaccine for H5 influenza in humans. *Vaccine* 19: 1732-7.
- Tumpey, T. M., Renshaw, M., Clements, J. D. et Katz, J. M. (2001). Mucosal delivery of inactivated influenza vaccine induces B-cell-dependent heterosubtypic cross-protection against lethal influenza A H5N1 virus infection. *J Virol* 75: 5141-50.
- Uzicanin, A. et Zimmerman, L. (2011). Field effectiveness of live attenuated measles-containing vaccines: a review of published literature. *J Infect Dis* 204 Suppl 1: S133-48.

- van den Brand, J. M., Kreijtz, J. H., Bodewes, R., Stittelaar, K. J., van Amerongen, G., *et al.* (2011). Efficacy of vaccination with different combinations of MF59-adjuvanted and nonadjuvanted seasonal and pandemic influenza vaccines against pandemic H1N1 (2009) influenza virus infection in ferrets. *J Virol* 85: 2851-8.
- van Riel, D., Munster, V. J., de Wit, E., Rimmelzwaan, G. F., Fouchier, R. A., Osterhaus, A. D. et Kuiken, T. (2007). Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals. *Am J Pathol* 171: 1215-23.
- Vandeveld, M. et Zurbriggen, A. (2005). Demyelination in canine distemper virus infection: a review. *Acta Neuropathol* 109: 56-68.
- Vela, E. M., Buccellato, M. A., Tordoff, K., Stark, G. et Bigger, J. E. (2011). Efficacy of a heterologous vaccine and adjuvant in ferrets challenged with influenza virus H5N1. *Influenza Other Respi Viruses*: in press.
- Vemula, S. V. et Mittal, S. K. (2010). Production of adenovirus vectors and their use as a delivery system for influenza vaccines. *Expert Opin Biol Ther* 10: 1469-87.
- von Messling, V., Milosevic, D. et Cattaneo, R. (2004). Tropism illuminated: lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14216-21.
- von Messling, V., Springfield, C., Devaux, P. et Cattaneo, R. (2003). A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. *J Virol* 77: 12579-91.
- von Messling, V., Svitek, N. et Cattaneo, R. (2006). Receptor (SLAM [CD150]) recognition and the V protein sustain swift lymphocyte-based invasion of mucosal tissue and lymphatic organs by a morbillivirus. *J Virol* 80: 6084-92.
- W.H.O. (2009). Seasonal Influenza Fact Sheet *No 211*.
- Wang, Z., Hangartner, L., Cornu, T. I., Martin, L. R., Zuniga, A., Billeter, M. A. et Naim, H. Y. (2001). Recombinant measles viruses expressing heterologous antigens of mumps and simian immunodeficiency viruses. *Vaccine* 19: 2329-36.
- Wareing, M. D. et Tannock, G. A. (2001). Live attenuated vaccines against influenza; an historical review. *Vaccine* 19: 3320-30.
- Welter, J., Taylor, J., Tartaglia, J., Paoletti, E. et Stephensen, C. B. (1999). Mucosal vaccination with recombinant poxvirus vaccines protects ferrets against symptomatic CDV infection. *Vaccine* 17: 308-18.
- Wilkinson, T. M., Li, C. K., Chui, C. S., Huang, A. K., Perkins, M., *et al.* (2012). Preexisting influenza-specific CD4+ T cells correlate with disease protection against influenza challenge in humans. *Nat Med* 18: 274-80.

- Wise, H. M., Foeglein, A., Sun, J., Dalton, R. M., Patel, S., Howard, W., Anderson, E. C., Barclay, W. S. et Digard, P. (2009). A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol* 83: 8021-31.
- Wu, W. W., Sun, Y. H. et Pante, N. (2007). Nuclear import of influenza A viral ribonucleoprotein complexes is mediated by two nuclear localization sequences on viral nucleoprotein. *Virology* 4: 49.
- Yasuda, J., Nakada, S., Kato, A., Toyoda, T. et Ishihama, A. (1993). Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology* 196: 249-55.
- Yetter, R. A., Barber, W. H. et Small, P. A., Jr. (1980). Heterotypic immunity to influenza in ferrets. *Infect Immun* 29: 650-3.
- Yewdell, J. W., Bennink, J. R., Smith, G. L. et Moss, B. (1985). Influenza A virus nucleoprotein is a major target antigen for cross-reactive anti-influenza A virus cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 1785-9.
- Youngner, J. S., Treanor, J. J., Betts, R. F. et Whitaker-Dowling, P. (1994). Effect of simultaneous administration of cold-adapted and wild-type influenza A viruses on experimental wild-type influenza infection in humans. *J Clin Microbiol* 32: 750-4.
- Zhirnov, O. P., Isaeva, E. I., Konakova, T. E., Thoidis, G., Piskareva, L. M., et al. (2007). Protection against mouse and avian influenza A strains via vaccination with a combination of conserved proteins NP, M1 and NS1. *Influenza Other Respi Viruses* 1: 71-79.
- Zhou, B., Li, Y., Belser, J. A., Pearce, M. B., Schmolke, M., et al. (2010). NS-based live attenuated H1N1 pandemic vaccines protect mice and ferrets. *Vaccine* 28: 8015-25.
- Zuniga, A., Wang, Z., Liniger, M., Hangartner, L., Caballero, M., et al. (2007). Attenuated measles virus as a vaccine vector. *Vaccine* 25: 2974-83.