



HAL
open science

Etude de l'impact de deux gènes de virulence du Virus de la Peste Porcine Africaine sur l'activation de la voie NF- κ B

Chloé Styraneç

► **To cite this version:**

Chloé Styraneç. Etude de l'impact de deux gènes de virulence du Virus de la Peste Porcine Africaine sur l'activation de la voie NF- κ B. IUT Tours. 2022. hal-04246314

HAL Id: hal-04246314

<https://hal.inrae.fr/hal-04246314v1>

Submitted on 17 Oct 2023

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NoDerivatives 4.0 International License

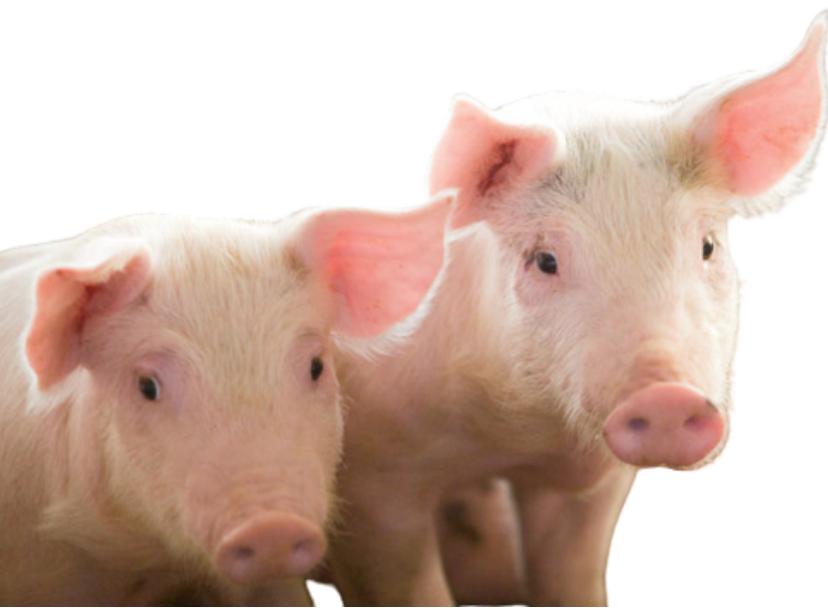
Chloé STYRANEC



Institut Universitaire de Technologie de Tours
Département Génie Biologique - Option Analyses Biologiques et
Biochimiques

Etude de l'impact de deux gènes de virulence du Virus de la Peste Porcine Africaine sur l'activation de la voie NF- κ B

INRAE Centre de recherche Val de Loire
Domaine de l'Orfrasière, 37380 Nouzilly
Unité Infectiologie et Santé Publique
Ignacio CABALLERO POSADAS, Ferdinand ROESCH



Promotion 2020-2022

Photo de deux porcelets:

https://www.planeteanimaux.com/animaux-de-la-ferme-qui-sont-ils-et-a-quoi-servent-ils/#google_vignette

Remerciements

Durant 10 semaines, j'ai évolué au sein du laboratoire de l'INRAE Nouzilly dans lequel j'ai pratiqué de nouvelles techniques et acquis beaucoup de nouvelles connaissances notamment sur le sujet du virus de la Peste Porcine Africaine.

Je remercie Sascha TRAPP de m'avoir accueillie au sein de l'équipe 3IMo pour cette période de stage dans un cadre de travail agréable.

Je veux particulièrement remercier mes maîtres de stage, Ignacio CABALLERO POSADAS et Ferdinand ROESCH pour leur accueil et leur bienveillance à mon égard. Grâce à eux j'ai pu évoluer tout au long de cette expérience en apprenant à leurs côtés.

Je remercie également toute l'équipe 3IMo pour leur convivialité et pour l'accompagnement dans la découverte du laboratoire.

Enfin, je remercie l'équipe pédagogique de l'IUT sans qui je n'aurais pu avoir les compétences requises pour ce stage.

Abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

BET : Bromure d'éthidium

CMV : Cytomegalovirus

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

FACS : *Fluorescence activated cell sorting* (Cytométrie en Flux)

GFP : *Green Fluorescent Protein*

hEF1-HTLV : *Elongation Factor-1 Human T-Cell Leukemia Virus*

IFN : Interféron

kB : Kilo de base

LB : Luria-Bertani

MCS : Site de clonage multiple

NF- κ B : *Nuclear Factor-kappa B*

NK : *Natural Killer*

pB : Paire de base

PBS : *Phosphate Buffered Saline* – Tampon Phosphate Salin

PFA : Paraformaldéhyde

PIB : Produit Intérieur Brut

Poly IC : Acide Polyinosinique-polycytidylique

PPA : Peste Porcine Africaine

PRR : *Pattern Recognition Receptor*

qPCR : Réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel

SOC : *Super Optimal broth with Catabolite repression*

TAE : Tris Acétate EDTA

TLR : *Toll-like Receptors*

VPPA : Virus de la Peste Porcine Africaine

Table des matières

I	INTRODUCTION	1
I.1	LA PESTE PORCINE AFRICAINE	1
I.2	LE VIRUS DE LA PESTE PORCINE AFRICAINE.....	1
I.3	LE SYSTEME IMMUNITAIRE INNE.....	3
I.4	LES VOIES NF-KB ET IFN.....	3
I.5	IMPACTS DES GENES VIRAUX A238L ET A528R SUR LA VOIE NF-KB	4
I.6	LA SYNTHÈSE DES CYTOKINES.....	5
I.7	OBJECTIFS	5
II	MATERIEL ET METHODES	6
II.1	PURIFICATION DES PLASMIDES.....	6
II.2	CULTURE CELLULAIRE : LES CELLULES T3.....	8
II.3	ÉTUDE DE L'ACTIVATION DE LA VOIE NF-KB PAR MICROSCOPIE CONFOCALE	9
II.3.1	<i>Transfection des cellules T3</i>	9
II.3.2	<i>Vérification des niveaux d'expression</i>	10
II.3.3	<i>Stimulation des cellules avec des ligands des TLRs</i>	10
II.3.4	<i>Évaluation de la translocation nucléaire de p65</i>	11
II.4	EFFET DES GENES VIRAUX SUR LA SYNTHÈSE DE CYTOKINES : qPCR.....	12
II.4.1	<i>Transfection des cellules T3 en plaque 24 puits</i>	12
II.4.2	<i>Stimulation des cellules transfectées</i>	12
II.4.3	<i>Extraction de l'ARN : kit NucleoSpin RNA XS</i>	12
II.4.4	<i>PCR quantitative en temps réel (qPCR)</i>	13
III	RESULTATS	14
III.1	VERIFICATION DE LA PURIFICATION DE L'ADN PLASMIDIQUE	14
III.2	PROTOCOLE DE TRANSFECTION : ANALYSE AU FACS	15
III.3	IMMUNOFLUORESCENCE : IMAGERIE CONFOCALE.....	16
III.4	RESULTATS DE LA PCR QUANTITATIVE	20
IV	DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES	22
V	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	25

I Introduction

I.1 La peste porcine africaine

La Peste Porcine Africaine (PPA) est une maladie épizootique sévère. Ses hôtes naturels sont les suidés (principalement le porc domestique et le sanglier) et les arthropodes : en effet, l'agent pathogène responsable de cette maladie, le Virus de la PPA (VPPA) est transmis par les tiques molles *Ornithodoros*. Le VPPA est responsable de fièvres hémorragiques mortelles chez le porc, et a un impact économique très important. Depuis son introduction en Chine en 2018, par exemple, la PPA aurait causé la mort de près de 300 millions d'animaux, résultant en une perte économique approchant 100 milliards de dollars soit 1% du PIB de la Chine [1]. La PPA a été décrite pour la première fois par le docteur Montgomery au Kenya, en 1921 [2]. Depuis, le virus circule en Afrique chez les phacochères et les potamochères, par le biais de la tique, sans causer de maladie [3]. Actuellement, la PPA a été détectée dans près de 60 pays [4] en Asie du Sud Est (Chine, Vietnam, Indonésie), dans les Caraïbes (République Dominicaine). En Europe, où elle a émergé en 2008 en Géorgie, elle a progressé vers l'Ouest jusqu'à l'Allemagne, la Belgique, le Luxembourg et l'Italie. Au mois de mai 2022, un foyer de PPA a été détecté en Allemagne de l'Ouest, à quelques kilomètres seulement de la frontière avec la France, soulignant le danger imminent que cette maladie représente pour les élevages français.

I.2 Le virus de la peste porcine africaine

Le virus de la peste porcine africaine est un virus enveloppé à ADN double brin appartenant à la famille des *Asfarviridae* et du genre *Asfivirus*. Le VPPA a une morphologie icosaédrique (Figure 1). Son génome viral possède une seule molécule d'ADN bicaténaire linéaire. Selon les souches, la taille de ce génome atteint entre 170 et 194 kB [5]. Le virus se réplique principalement au sein d'usines virales cytoplasmiques [6], mais le noyau peut aussi être un site de synthèse d'ADN [7]. Les principales cellules cibles sont les macrophages [8], mais les cellules endothéliales pourraient aussi être atteintes [9]. Aucun vaccin contre le VPPA n'est disponible à ce jour, mais de nombreux candidats sont en cours de développement [10]. En particulier, les efforts de recherche se concentrent sur l'élaboration de vaccin vivant atténué. En effet, il a été décrit que des animaux infectés avec des souches peu virulentes du virus peuvent survivre, et être protégés d'une infection future [10]. Ainsi, l'étude des gènes viraux impliqués dans la virulence est donc primordiale afin de pouvoir développer des vaccins efficaces.

Il existe différentes souches du virus de la PPA, certaines étant plus virulentes que d'autres. En effet, les souches virulentes induisent une maladie sévère avec des symptômes de fièvres hémorragiques (fièvre aiguë, saignements, dysfonctionnement endothélial) alors que les souches atténuées n'induisent que peu de symptômes. De nombreux gènes sont absents chez les souches virales atténuées : ces gènes sont souvent considérés comme des facteurs de virulence, bien que leurs rôles individuels restent assez mal compris [11].

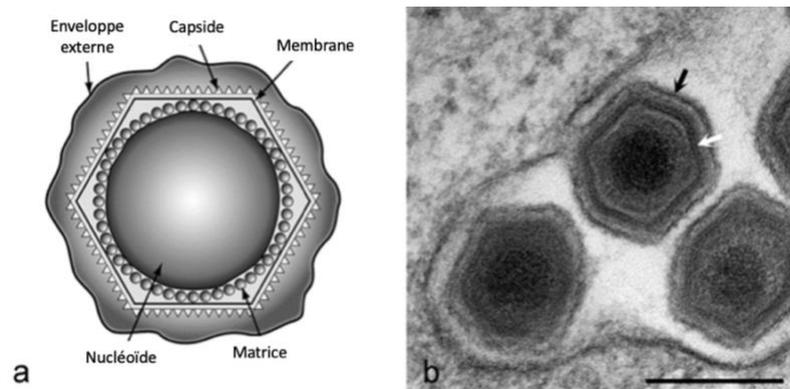


Figure 1: Structure du virus de la PPA. (a) Schéma d'un virion extracellulaire du virus de la peste montrant l'enveloppe externe, la capside, la membrane, la matrice et le nucléoïde. (b) Image de virions intracellulaires. La flèche noire montre l'enveloppe extérieure, la flèche blanche montre la capside. Source : https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/dsdna-viruses/w/asfarviridae

Une expérience de transcriptomique menée au laboratoire, comparant les niveaux d'expression de gènes viraux lors de l'infection de macrophages par la souche Lisbon-60 (virulente) et la souche NHP/68 (atténuée) a mis en évidence une surexpression relative de 5 gènes viraux par la souche virulente (Figure 2). Il s'agit des gènes A238L, A528R, DP96R, I329L et L83L. Ce projet se concentrera sur les gènes viraux A238L et A528R, en raison de leurs rôles d'inhibition de la réponse immunitaire innée précédemment décrits.

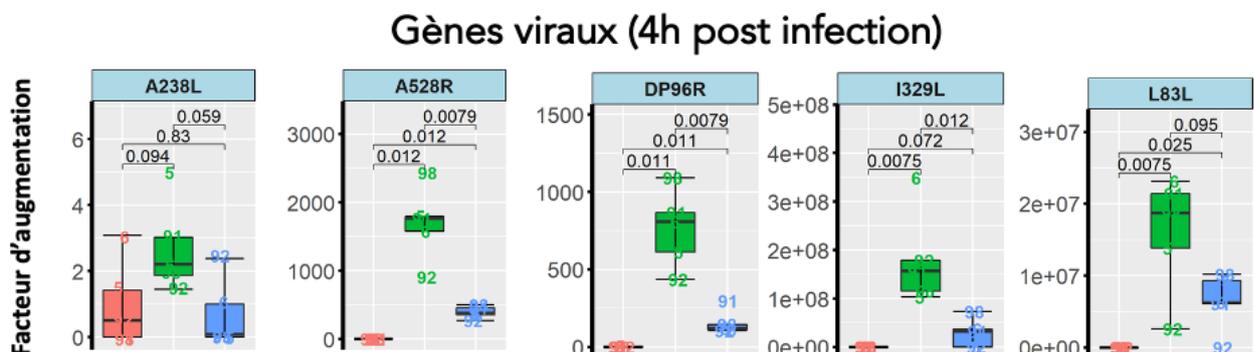


Figure 2 : Expression des gènes A238L, A528R, L83L, DP96R, I329L de virulence du virus de la PPA. La souche virulente Lisbon-60 est représentée en vert, la souche atténuée NHP/68 en bleu. Des cellules non infectées ont été utilisées en contrôle (en rouge). Ce graphique représente la moyenne du facteur d'augmentation des gènes viraux indiqués par rapport moyenne de l'expression des gènes virulents dans des macrophages infectés avec la souche NHP/68 à 2 heures post infection et après normalisation pour l'expression de 3 gènes de ménage. Un test statistique non paramétrique Wilcoxon-Mann-Whitney a été réalisé.

Des résultats préliminaires ont mis en évidence que les gènes A238L, A528R, DP96R, I329L et L83L sont exprimés plus fortement au sein de macrophages primaires infectés par la souche virulente Lisbon-60 (en vert) que lors d'une infection par la souche atténuée NHP/68 (en bleu) (Figure 2). Pour le contrôle négatif, des cellules non infectées sont utilisées (en rouge). Pour chaque condition, des macrophages primaires issus de 5 animaux ont été infectés. Les ARN ont été extraits à 2, 4 et 22 heures post infection et l'expression de différents gènes a été mesurée par PCR quantitative.

I.3 Le système immunitaire inné

Le système immunitaire inné correspond à la première ligne de défense de l'organisme face aux microorganismes, aux substances antigéniques étrangères et à la prolifération des cellules cancéreuses. Les principales cellules impliquées dans le système immunitaire inné sont les macrophages, les polynucléaires neutrophiles, les *natural killers* et les cellules dendritiques.

Il existe différentes voies d'activation de l'immunité innée, qui reposent sur le même principe : un « signal de danger », le plus souvent un composant du pathogène tel que ses acides nucléiques, est reconnu par un « senseur », ou *Pattern Recognition Receptor* (PRR). Cette détection mène à l'activation des voies de l'immunité innée et à la synthèse de cytokines ou de chimiokines, conférant un effet protecteur aux cellules environnantes. Les *Toll-like receptors* (TLR) sont des récepteurs transmembranaires faisant partie de la famille des PRR. Ils permettent la reconnaissance des molécules de surface bactérienne ainsi que l'ARN et l'ADN viral. La reconnaissance de signaux de dangers par les TLR mène à l'activation de différentes voies de signalisation, telles que la voie NF- κ B et à la voie de l'interféron. Deux TLR ont été étudiés au cours de ce projet : TLR3, qui reconnaît les ARNs tels que le Poly (I:C) ; et TLR5, qui reconnaît la flagelline des bactéries invasives.

I.4 Les voies NF- κ B et interféron

La famille des facteurs de transcription NF- κ B est composée de différents membres : RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B1) et p52/p100 (NF- κ B2). Ils jouent un rôle de régulation dans la réponse inflammatoire, en intégrant les signaux déclenchés par différents PRR. De nombreux pathogènes détournent cette voie pour favoriser leur réplication, par exemple en incorporant au sein de leurs promoteurs des éléments de réponse à NF- κ B. L'activation de la

voie NF- κ B mène à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL6, l'IL1 β , le TNF α , etc. La régulation de la voie NF- κ B est un phénomène complexe (Figure 3 a). Lors de l'activation de TLR ou d'autres récepteurs comme le récepteur de l'IL-1 ou le récepteur au TNF, une cascade de signalisation active les kinases IKK. Celles-ci vont phosphoryler et dégrader la protéine I κ B, qui inhibe NF- κ B en le séquestrant dans le cytoplasme des cellules. Les hétérodimères de NF- κ B sont alors libres et peuvent atteindre le noyau, où ils vont se lier aux promoteurs des gènes cibles de NF- κ B et stimuler leur transcription.

En parallèle de la voie NF- κ B, la voie de l'interféron (INF) peut aussi être activée par des pathogènes (Figure 3 b). La reconnaissance d'ARN ou d'ADN d'origine virale par des senseurs tels que les TLRs ou les molécules cytoplasmiques RIGI et cGAS mène à l'activation de IRF3 et IRF7, qui vont dimériser et stimuler la transcription de l'interféron après translocation nucléaire.

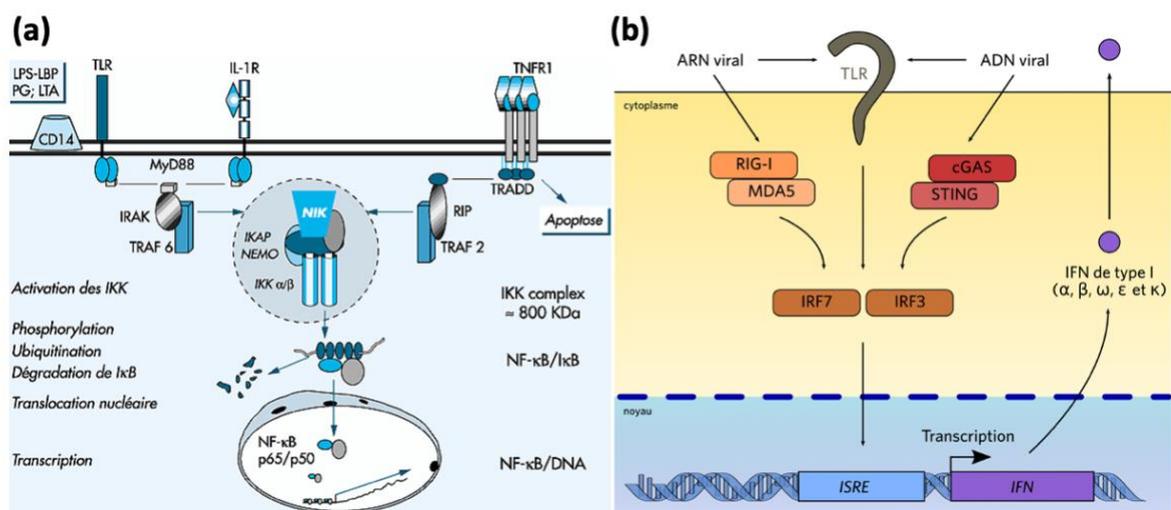


Figure 3 : Mécanismes d'activation des voies NF- κ B et IFN. (a) La voie NF- κ B. Source : https://www.jle.com/fr/revues/met/e-docs/lactivation_du_nf_kb_au_cours_des_infections_bacteriennes_une_reaction_primordiale_de_defense_de_lhote_180072/article.phtml. (b) La voie interféron. Source : <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/animaux/systeme-immunitaire/les-interferons-de-type-i-et-iii-des-effecteurs-de-l>

1.5 Impacts des gènes viraux A238L et A528R sur la voie NF- κ B

Certains gènes du virus de la PPA peuvent perturber la voie NF- κ B à des niveaux différents. Par exemple, le gène A238L est un homologue de I κ B α qui, grâce à sa liaison avec les hétérodimères d'NF- κ B inhibe leur translocation nucléaire [12]-[13] ce qui empêche l'activation de cette voie. De plus, A238L peut interagir avec des protéines co-activatrices de transcription [14], qui ont un rôle essentiel dans la régulation de la voie de NF- κ B [15],

résultant en l'inhibition de la synthèse de TNF- α , une cytokine pro-inflammatoire synthétisée en réponse à l'infection [16] par des souches virulentes du virus de la PPA. Les connaissances sont plus limitées concernant A528R, pour laquelle une seule étude a mis en évidence son action sur la voie NF- κ B. Ce travail a démontré que A528R inhibe la phosphorylation de NF- κ B p65, ce qui inhibe sa translocation nucléaire [17].

I.6 La synthèse des cytokines

Les cytokines sont des glycoprotéines dont le rôle est le dialogue intercellulaire par le biais de régulations de fonctions biologiques variées (prolifération, différenciation, activation, survie ou mort cellulaire). Elles sont principalement impliquées dans l'inflammation et les réponses immunitaires innée et spécifique. Les cytokines sont synthétisées par une cellule activée puis se lient à des récepteurs spécifiques.

Les souches virulentes du VPPA retardent la réponse inflammatoire, ce qui permet au virus de se répliquer et d'échapper à la réponse immunitaire. Il déclenche par la suite une tempête mortelle de cytokines ayant des effets délétères chez les porcs infectés [18]. Les différentes souches du virus induisent différentes cytokines en fonction de leur niveau de virulence : en effet, il a été observé que les souches virulentes induisent plus de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α ou l'IL6, tandis que les souches atténuées induisent des niveaux élevés de cytokines antivirales comme les interférons [16].

I.7 Objectifs

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'impact de la surexpression de 2 gènes de virulence du virus de la PPA sur l'activation de la voie NF- κ B, et la synthèse de cytokines qui s'en suit. Pour cela, les gènes viraux sont clonés au sein de plasmides d'expression permettant par la suite la surexpression de ces gènes par transfection dans des lignées cellulaires porcines. L'effet de ces facteurs de virulence sur l'activation de la voie NF- κ B sera étudié par microscopie confocale, et la synthèse de cytokines sera mesurée par PCR quantitative (qPCR). Ces expériences permettront d'analyser de manière plus fine l'activité inhibitrice de ces gènes viraux sur les voies NF- κ B et interféron.

II Matériel et méthodes

Le clonage des gènes viraux A238L et A528R dans le vecteur pSELECT-EGFP-blasti (Figure 4) a été réalisé par Genewiz (Leipzig, Allemagne). Ce plasmide comporte un promoteur hEF1-HTLV qui produit une expression durable du transgène gène *in vitro*. Le site de clonage multiple contient plusieurs sites de restriction, dont NcoI et Sall qui ont été utilisés ici. Les gènes viraux sont placés sous le même promoteur que la protéine fluorescente GFP, qui est clivé après autoprotéolyse d'un peptide P2A inséré entre ces deux gènes. La GFP permet de visualiser aisément les cellules transfectées durant les différentes manipulations (microscopie confocale, cytométrie en flux). La résistance à la blasticidine est conférée par le gène Bsr sous le contrôle de EM7, un promoteur bactérien qui, en tandem avec le promoteur CMV, un activateur/promoteur, permet la sélection des bactéries transformées.

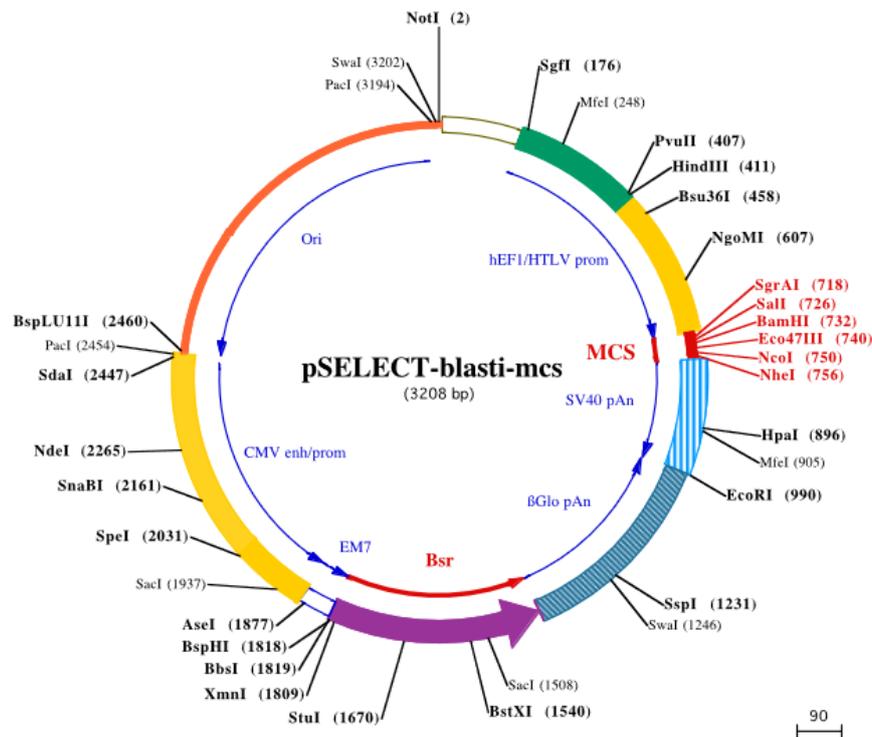


Figure 4 : Carte du plasmide pSELECT-blasti-mcs (3208 bp)

Source : https://www.invivogen.com/sites/default/files/invivogen/products/files/pselect-blasti-mcs_tds.pdf

II.1 Purification des plasmides

Des bactéries DH5α *Escherichia coli* (ThermoFisher, Waltham, États Unis) ont été transformées avec les plasmides par choc thermique. Pour cela, 100 ng d'ADN plasmidique sont ajoutés à 50 µL de bactéries. Ce mélange est incubé sur de la glace pendant 30 minutes.

Chaque tube est ensuite choqué en le plaçant dans un bain-marie à 42°C pendant 45 secondes. Les tubes sont remis sur glace pour 2 minutes. 250 µL de *Super Optimal broth with Catabolite repression* (SOC), un milieu de croissance riche et sans antibiotique, (Invivogen, San Diego, États Unis) sont ajoutés aux bactéries, qui sont incubées sous agitation à 37 °C pendant 45 minutes. Les bactéries sont ensemencées sur une plaque de gélose Luria-Bertani (LB) (Sigma, Burlington, États Unis) de 10 cm contenant de la Blastidine (Invivogen, San Diego, États Unis) à 10 mg/mL et incubées 24 heures à 37°C. Après 24 heures, pour chacune des boîtes de bactéries transformées, une colonie est repiquée dans 3 mL de LB liquide (Sigma, Burlington, États Unis) en présence de Blastidine (10 mg/mL) et incubées 7 heures à 37 °C. Avec 100 µL des 3 mL de chaque culture, une culture de 100 mL est réalisée.

Les plasmides sont ensuite purifiés grâce au kit NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). Les 100 mL de culture sont centrifugés à 5000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot cellulaire est resuspendu complètement dans 8 mL de tampon de resuspension (RES) contenant de la RNase A et en vortexant. 8 mL de tampon de lyse (LYS) sont ajoutés à la suspension. Le mélange du tube se fait doucement en inversant le tube 5 fois. Le mélange est incubé à température ambiante pendant 5 minutes. La colonne NucleoBond® Xtra ainsi que le filtre de colonne doivent être équilibrés avec 12 mL du tampon d'équilibrage (EQU). Une fois la colonne vidée par gravité, 8 mL de tampon de neutralisation (NEU) sont ajoutés à la suspension et le lysat est immédiatement mélangé doucement en retournant le tube jusqu'à ce que les échantillons bleus deviennent complètement incolores. Le précipité est éliminé par centrifugation pendant 10 minutes à 5000 g. Le lysat est simultanément nettoyé et chargé sur la colonne. Le lysat clarifié est appliqué sur le filtre équilibré. La colonne NucleoBond® Xtra filtre est lavé avec 5 mL de tampon d'équilibrage (EQU) puis, le filtre est retiré. La colonne NucleoBond® Xtra est lavée avec 8 mL tampon de lavage WASH.

L'ADN plasmidique est élué avec 5 mL tampon d'élution (ELU) et est recueilli dans un tube à centrifuger. 3,5 mL d'isopropanol à température ambiante sont rajoutés afin de précipiter l'ADN plasmidique élué. Le mélange est vortexé et centrifugé à 15000 g pendant 30 minutes à 4 °C. Le surnageant est jeté. 2 mL d'éthanol à 70 % à température ambiante sont ajoutés au culot. Après une nouvelle étape de centrifugation à 15000 g pendant 5 minutes à température ambiante (18-25 °C), le surnageant est aspiré et le culot séché pendant 5 minutes à température ambiante avant d'être repris dans 100 µL d'eau stérile.

Afin de vérifier que les plasmides obtenus sont corrects, une digestion enzymatique est réalisée. Pour cette digestion, 500 ng de chaque ADN plasmidique sont ajoutés à 1 μ L de l'enzyme NcoI, 1 μ L de l'enzyme Sall et 3 μ L de tampon Cutsmart (New England Biolabs Ipswich, États Unis). De l'eau stérile est utilisée pour compléter le volume jusqu'à 30 μ L. La réaction de digestion est incubée pendant 1 heure à 37°C. Les échantillons sont ensuite mis à migrer sur un gel d'agarose contenant 0,5 g d'agarose (Sigma, Burlington, États Unis), 60 mL de tampon de migration Tris Acétate (TAE) et 9 gouttes de bromure d'éthidium (BET) (Sigma, Burlington, États Unis). Sur le gel, 2 μ L de tampon de charge (New England Biolabs Ipswich, États Unis) sont ajoutés à 10 μ L d'échantillon et déposés dans chaque puits. Pour le marqueur de poids moléculaire, 1 μ L de bleu de charge est ajouté à 5 μ L de 1kb Plus DNA Ladder (New England Biolabs Ipswich, États Unis). La migration est effectuée à 90 V pendant 30 minutes. Les résultats sont visualisés grâce à un transilluminateur UV (Bio-print, Vivilber).

II.2 Culture cellulaire : les cellules T3

Les cellules utilisées sont des cellules T3 extraites de poumon de porc qui ont été immortalisées par InSCREENex (Braunschweig, Allemagne). Elles sont retirées de l'azote liquide. Pour cela, 30 mL de Tampon Phosphate Salin (PBS (ThermoFisher, Waltham, États Unis) sont placés dans un tube Falcon de 50 mL. L'ampoule contenant les cellules est décongelée dans un bain marie à température ambiante. Toutes les 5 secondes, l'avancée de la décongélation est vérifiée car la décongélation doit être entamée mais pas terminée. La partie liquide de l'échantillon est ajoutée dans les 30 mL de PBS. Le reste (encore sous forme de glaçon) est dilué avec 2 mL de PBS puis transféré dans le tube. Le tout est ensuite centrifugé 5 minutes à 300 g. Le surnageant est décanté et le culot de cellules est repris dans 5 mL de milieu huAEC complété (6 mL de supplément et 1mL d'antibiotiques pénicilline/streptomycine pour 100 mL de milieu de milieu huAEC (InSCREENex, Braunschweig, Allemagne) complet, c'est-à-dire contenant 1% d'antibiotiques pénicilline/streptomycine (ThermoFisher, Waltham, États Unis) et les suppléments (sérum) fournis par InSCREENex (Braunschweig, Allemagne). La culture est mise dans une flasque de 25 cm² avec bouchon filtrant préalablement traitée pendant 2 heures avec du collagène pour favoriser l'adhérence des cellules.

Après 72 heures de croissance à 37°C en présence de CO₂, les cellules sont passées pour la première fois. Les cellules sont observées au microscope afin de vérifier l'absence de contamination ainsi que le niveau de confluence. Le milieu de culture est retiré de la flaque. 10

mL de PBS sont ajoutés puis retirés après quelques secondes. Afin de décoller les cellules, 1 mL de trypsine (ThermoFisher, Waltham, États Unis) est ajouté et incubé pendant 12 minutes à 37°C. Le bon décollage des cellules est vérifié au microscope. 4 mL de milieu huAEC complétement est ajouté à la trypsine et l'ensemble est ensuite mis dans une nouvelle flasque traitée au collagène pendant 2 heures. 48 heures plus tard, les cellules T3 sont passées une seconde fois selon le même protocole.

Les cellules T3 sont mise en plaque 24 puits. Dans chaque puits, 200 µL de collagène (InSCREENex, Braunschweig, Allemagne) sont incubés à 37°C puis retirés au bout de 2 heures. Les puits sont lavés avec 500 µL de PBS. Le milieu de la flasque contenant les cellules T3 est retiré. La flasque est également lavée avec 10 mL de PBS. 3 mL de trypsine sont incubés dans la flasque pendant 12 minutes, puis, le collage des cellules est vérifié au microscope. 10 mL de milieu sont mélangés à la trypsine. Pour compter les cellules, 50 µL de culture est dilué dans 50 µL de bleu de trypan (ThermoFisher, Waltham, États Unis). Ce mélange est inséré dans une chambre de comptage jetable et est analysé par un compteur Tecan (Männedorf, Suisse). 100 000 cellules sontensemencées dans chaque puits. Le volume est ajusté à 500 µL avec du milieu T3. La plaque est incubée 24 heures à 37°C en présence de CO₂.

II.3 Étude de l'activation de la voie *Nuclear Factor-kappa B* (NF-κB) par microscopie confocale

II.3.1 Transfection des cellules T3

Les cellules T3 sont transfectées selon différents protocoles afin d'obtenir le meilleur taux de transfection et de viabilité. Deux réactifs différents de transfections sont testés : la Lipofectamine 3000 (ThermoFisher, Waltham, États Unis) et JetOptimus (Polyplus, Illkirch-Graffenstaden, France). Les résultats sont analysés 24 heures et 40 heures après transfection. La manipulation est réalisée avec 500 ng et 250 ng d'ADN.

Pour la Lipofectamine 3000, deux mix différents sont réalisés. Le mix 1 contient pour chaque tube, 25 µL de milieu sans sérum OptiMEM (ThermoFisher, Waltham, États Unis), 1 µL de réactif P300 (ThermoFisher, Waltham, États Unis) et 500 ng/µL d'ADN. Deux contrôles négatifs sont réalisés : un non transfecté (sans ADN ni Lipofectamine) et un « mock » (sans ADN mais avec Lipofectamine). Ils contiennent 25 µL de OptiMEM dans leur mix 1. Un contrôle positif *Green Fluorescent Protein* (GFP) est également réalisé et contient 25 µL de

OptiMEM, 1 μ L de P300 et 500 ng de plasmide turboGFP (Lonza, Bâle, Suisse) pour le mix 1. Le mix 2 contient 25 μ L de OptiMEM ainsi que 1,5 μ L de Lipofectamine 3000 pour chaque tube contenant de l'ADN ainsi que le tube GFP. Pour les puits à 250 ng d'ADN, les mix sont identiques mais avec une concentration deux fois moins importante de réactif dans tous les tubes. Après mélange des deux mix, les tubes sont incubés 15 minutes à température ambiante. 50 μ L de mélange de transfection sont ajoutés goutte à goutte sur les cellules. Pour le JetOptimus, 500 ng d'ADN sont ajoutés à 112,4 μ L de tampon et 1,13 μ L de réactifs. Le contrôle négatif mock contient 112,4 μ L de tampon et 1,13 μ L et le contrôle (-) seulement du tampon. Pour les puits à 250 ng d'ADN, la concentration est deux fois moins importante en réactifs dans tous les tubes. Les tubes sont incubés 10 minutes à température ambiante puis 50 μ L de mélange de transfection sont ajoutés sur les cellules. Dans les deux cas, la plaque est agitée doucement pour que le milieu soit homogène dans le puits et incubée à 37°C pendant 24 ou 40 heures.

II.3.2 Vérification des niveaux d'expression

Afin de quantifier les niveaux de transfection, une analyse de cytométrie en flux est réalisée. Un premier lavage des puits est réalisé au PBS, puis, 200 μ L de trypsine sont ajoutés dans les puits et incubés 12 minutes à 37°C. La collecte des cellules est effectuée avec 900 μ L de PBS. Les cellules sont centrifugées pendant 5 minutes à 400 g puis le culot de cellules est resuspendu dans 50 μ L de paraformaldéhyde 4 % (PFA 4%) (Santa Cruz, Dallas, États Unis) sous la hotte chimique. Après 5 minutes, 150 μ L de PBS sont ajoutés, diluant la PFA à 1%. Les échantillons sont gardés à 4°C jusqu'au lendemain. Avant analyse, les échantillons sont centrifugés pendant 5 minutes à 500 g, et le surnageant contenant la PFA est retiré sous la hotte chimique. Les culots sont repris dans 200 μ L de PBS avant d'être analysés sur un FACS Calibur (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, États Unis). Les données sont analysées grâce au logiciel FlowJo v.7.6.3 (Ashland, États Unis).

II.3.3 Stimulation des cellules avec des ligands des TLRs

Les cellules T3 utilisées précédemment sont mises en culture sur 4 lames 8 puits. Chaque puits est traité au collagène pendant 2 heures. 24 heures avant la transfection, 60 000 cellules sont ensemencées par puits pour un volume final de 300 μ L.

Le protocole de transfection utilisé est le réactif Lipofectamine 3000 avec une quantité d'ADN de 250 ng. Deux lames sont transfectées avec 4 puits GFP (contrôle négatif) et 4 puits A238L et les deux autres lames sont transfectées avec 4 puits GFP et 4 puits A528R. Les mix de transfactions (réalisés comme le protocole précédent « Lipofectamine 250 ng 24 heures ») seront incubés 15 minutes avant d'être déposés sur les cellules. 24 heures plus tard, le milieu est changé avec 300 µL de nouveau milieu huAEC complet. La stimulation est ensuite réalisée avec de la flagelline ou de l'acide polyinosinique-polycytidylique (Poly(I:C)) (Invivogen, San Diego, États Unis). Les cellules sont stimulées avec 100 ng/ml de flagelline et 1 µg/ml de Poly(I:C) dans un volume total de 300 µl de milieu huAEC pendant 0, 30, 50 et 100 minutes. A la fin de la période de stimulation, 400 µL de PFA 4% sont ajoutés, afin de fixer les cellules, puis retirés après 15 minutes. Les puits sont ensuite lavés au PBS puis conservés à 4°C avec 200 µl de PBS par puits.

II.3.4 Évaluation de la translocation nucléaire de p65

Les cellules sont rincées au PBS puis traitées avec 200 µL de tampon de perméabilisation (Triton 0,2 %, sérum de chèvre 0,5 %) pour 15 minutes à température ambiante. Les puits sont lavés trois fois au PBS. L'anticorps primaire dirigé contre p65 (Santa Cruz, Dallas, États Unis) dilué au 1/100 est incubé toute la nuit à 4°C (150 µL/puits). Le lendemain, les puits sont lavés trois fois au PBS. L'anticorps secondaire goat-anti-mouse Alexa Fluor 555 (ThermoFisher, Waltham, États Unis) est incubé 1 heure à température ambiante (150 µL/puits). Les puits sont lavés trois fois au PBS. La solution de DAPI (Sigma, Burlington, États Unis) à 1 µg/mL est ensuite ajoutée. Les événements de translocation nucléaire de p65 sont visualisés sur un microscope confocal Leica TCS SP8 avec le logiciel Leica Application Suite AF.

La translocation nucléaire de p65 a été analysée de manière systématique à l'aide du logiciel CellProfiler (v4.2.1) qui permet de segmenter automatiquement les noyaux grâce à l'utilisation du canal DAPI. L'intensité de lumière inégale entre les différentes images est corrigée en utilisant la fonction CorrectIlluminationCalculate. Les cytoplasmes sont identifiés et assignés à chaque noyau grâce à l'analyse des changements de taille des pixels entre les cellules. La qualité de la segmentation est ensuite vérifiée visuellement. L'intensité moyenne de la p65 est calculée dans les différentes régions cellulaires : noyau, cytoplasme et cytoplasme périnucléaire. Les résultats ont été analysés à l'aide de la version R 4.1.3 afin de calculer le rapport moyen du signal p65 nucléaire par rapport au signal p65 cytoplasmique.

II.4 Effet des gènes viraux sur la synthèse de cytokines : qPCR.

II.4.1 Transfection des cellules T3 en plaque 24 puits

Afin d'étudier la synthèse de cytokines, 100 000 cellules T3 sontensemencées par puits de plaque 24 puits. Pour cela, 200 μL de collagène par puits sont incubés 2 heures à 37 °C avant d'être lavés avec 500 μL de PBS. Le milieu est retiré de la flasque de cellules T3 puis la flasque est lavée avec 10 mL de PBS. 2 mL de trypsine sont ajoutés et incubés 10 minutes à 37 °C. La trypsine est diluée dans 10 mL de milieu et les cellules sont ensuite comptées comme précédemment afin de mettre 100 000 cellules par puits.

Les cellules T3 sont ensuite transfectées avec 500 ng/ μL d'ADN avec le réactif Lipofectamine 3000. L'ADN est ajouté à 175 μL de OptiMEM et 7 μL de P3000 afin de constituer le mix 1. Pour le mix 2, 175 μL d'OptiMEM est mélangé à 5,25 μL de Lipofectamine. Les deux mix sont mélangés et le mélange est incubé 15 minutes à température ambiante. 50 μL de mélange sont ensuite appliqués goutte à goutte sur les cellules.

II.4.2 Stimulation des cellules transfectées

Par la suite, les cellules transfectées sont stimulées avec de la flagelline et de le Poly (I:C). Avant la stimulation, les puits sont lavés avec 500 μL de PBS puis 500 μL de milieu par puits sont ajoutés. La flagelline stock (340 ng/ μL) est diluée afin d'atteindre une concentration finale de 100 ng/ μL . Le Poly (I:C) stock (1 mg/ μL) est dilué au 1/1000. Le milieu des puits est retiré et remplacé soit par la flagelline soit par le Poly (I:C). Une plaque 24 puits est stimulée pendant 24 heures et l'autre pendant 4 heures. Une fois la stimulation terminée, les puits sont lavés deux fois avec 500 μL de PBS. Les cellules sont ensuite lysées avec 100 μL de tampon RA1 et 2 μL de TCEP issus du kit NucleoSpin RNA XS (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) puis stockés à -80°C en attendant l'extraction d'ARN.

II.4.3 Extraction de l'ARN : kit NucleoSpin RNA XS

Les cellules lysées sont récupérées dans des tubes et sont vigoureusement mélangées au vortex deux fois pendant 5 secondes. 5 μL de solution de travail de Carrier RNA (20 ng) sont ensuite ajoutés au lysat. Les cellules sont mélangées au vortex deux fois pendant 5 secondes avant d'être centrifugées 1 seconde à 1000 g pour nettoyer le couvercle. Pour fixer l'ARN,

100 µL d'éthanol 70 % sont ajoutés au lysat puis les tubes sont homogénéisés en pipettant de haut en bas 5 fois. Afin de lier l'ARN, une colonne NucleoSpin RNA XS est placée dans un tube de prélèvement. Le lysat est chargé sur la colonne avant d'être centrifugé pendant 1 minute à 11000 g. La colonne est placée dans un nouveau tube de prélèvement. Le dessalage de la membrane de silice se fait grâce à 100 µL de MDB (Membrane Desalting Buffer) qui est par la suite centrifugé à 11000 g pendant 1 minutes pour la sécher. L'élimination du sel rend la digestion par la rDNase beaucoup plus efficace. 25 µL de mélange réactionnel pour rDNase sont directement appliqués sur le centre de la membrane en silice de la colonne pour digérer l'ADN à température ambiante pendant 15 minutes. Pour les lavages de la colonne, 100 µL de tampon RA2 sont incubés pendant 2 minutes à température ambiante et centrifugés pendant 1 minute à 11000 g. La colonne est placée dans un nouveau tube de prélèvement (2 ml). Le tampon RA2 va inactiver la rDNase. 400 µL de tampon RA3 sont ajoutés à la colonne puis centrifugés pendant 1 minute à 11000 g. L'éluât est jeté et la colonne replacée dans le tube de collecte. Pour le dernier lavage, 200 µL de tampon RA3 sont mis sur la colonne qui est centrifugée pendant 3 minutes à 11000 g pour sécher la membrane. La colonne est mise dans un tube de collecte sans nucléase afin d'éluer l'ADN avec 15 µL de H₂O (sans RNase) et centrifugée à 1 000 g pendant 1 minute. Les concentrations d'ARN, ainsi que les ratios 260/230 sont mesurés grâce à un spectrophotomètre Nanodrop (ThermoFisher, Waltham, États Unis).

II.4.4 PCR quantitative en temps réel (qPCR)

Afin de réaliser la PCR quantitative, l'ARN va subir une transcription inverse afin d'obtenir de l'ADN complémentaire. Pour cela, les échantillons sont dilués dans de l'eau afin d'obtenir une concentration de 50 ng/ µL d'ARN. 4 µL de kit RT (iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Biorad, Hercules, États Unis)) sont ensuite ajoutés à l'échantillon avec 6 µL d'eau. La première étape dure 5 minutes à 25°C, la seconde qui permet la synthèse d'ADN à 45°C dure pendant 20 minutes et enfin la dénaturation est de 1 minute à 95°C.

Pour la PCR, un mix est préparé à partir de 269 µL eau, de 50,4 µL de chaque amorce diluée à 10 µM (Eurogentec, Seraing, Belgique) et de 50,4 µL de Kit de qPCR : IQ™ SYBR® Green Supermix (Biorad, Hercules, États Unis). 13 µL de ce mélange est ajouté à 2 µL d'ADNc, en duplicata. La plaque est scellée avec du film adhésif et brièvement centrifugée. Les gènes étudiés sont le gène de ménage B2M dont l'amorce sens est « CGAGACCACTAAC CGGCATCA » et l'amorce antisens est « TGGATTCATCCAACCCAGATGCA », ainsi que

le gène CCL20 ayant l'amorce sens « GCTCCTGGCTGCTTTGATGTC » et l'amorce antisens « GTTGCTTGCTGCTTCTGACTTG ». Pour le cycle de la qPCR, la dénaturation initiale se fait à 95°C pendant 3 minutes. Pendant 40 cycles, les étapes suivantes vont ensuite se répéter : dénaturation à 95°C pendant 10 secondes puis hybridation et l'élongation durant 40 secondes à 60°C.

III Résultats

III.1 Vérification de la purification de l'ADN plasmidique

Afin de vérifier que les plasmides commandés ont bien été purifiés et contiennent bien les gènes viraux attendus, l'ADN plasmidique purifié est soumis à une digestion enzymatique puis est mis à migrer sur gel d'agarose.

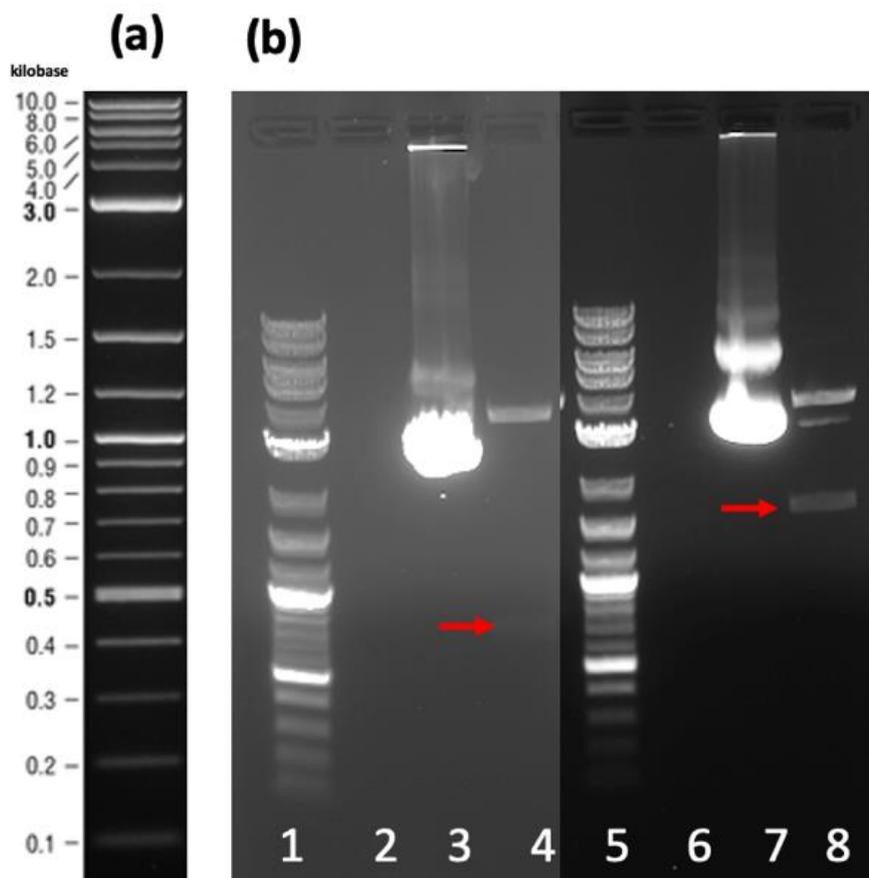


Figure 5 : Gel 1% d'agarose (a) Tailles des bandes du marqueur de poids moléculaire sur site du fournisseur (b) Résultats de l'électrophorèse. 1, 5 : pistes avec le marqueur de poids moléculaire. 2, 6 : pistes vides. 3, 7 : pistes avec les plasmides A238L et A528R non digérés, respectivement. 4, 8 : pistes avec les plasmides A238L et A528R digérés, respectivement. Les bandes de faible intensité sont indiquées par une flèche rouge.

La digestion par les enzymes NcoI et Sall doit conduire à la visualisation de plusieurs bandes : une bande à 3,8 kB, pour les deux constructions, correspondant au vecteur ; dans le cas de A238L, une bande correspondant à l'insert d'environ 700 pb (piste 4) ; et pour A528R, une bande correspondant à l'insert de 1,6 kb (piste 8). C'est bien le résultat obtenu (Figure 5 a-b). Une deuxième bande est observée sur la piste 8 en dessous de celle du vecteur en raison d'une erreur de manipulation lors du dépôt des échantillons. Dans les puits 3 et 7, les plasmides ne sont pas digérés, il est donc normal d'obtenir une seule bande. Cette bande migre plus loin car elle est constituée d'ADN super enroulé et non linéaire comme en 4 et 8.

III.2 Protocole de transfection : analyse au FACS

Les différentes conditions de transfection (réactifs, temps, concentration en ADN) sont analysées par cytométrie en flux afin de déterminer les conditions optimales, au niveau de la viabilité cellulaire (% de viabilité) et de l'efficacité de transfection (% de cellules GFP +). Le pourcentage de viabilité cellulaire est pour la plupart des conditions supérieur à 80%, le plus bas pourcentage est environ 35% pour JetOptimus à 40 heures, le plus haut est JetOptimus 24 heures et Lipofectamine 3000 avec environ 85%. Il est déterminé grâce au rapport de Side Scatter en fonction de Forward Scatter (Figure 6 a). Un faible taux de viabilité est observé pour les cellules non transfectées, mock et GFP 250 ng à 40 heures avec le réactif JetOptimus. Mis à part cela, les différentes transfections ne posent pas de problème particulier sur la viabilité cellulaire. Le pourcentage cellules viables est plus important pour les cellules transfectées à 24 heures (Figure 6 b). Il faut tout de même interpréter ces résultats avec prudence car comme la transfection est réalisée sur des cellules adhérentes, les cellules mortes qui flottaient dans le milieu ne sont pas prises en compte car elles ont été éliminées lors des différents lavages.

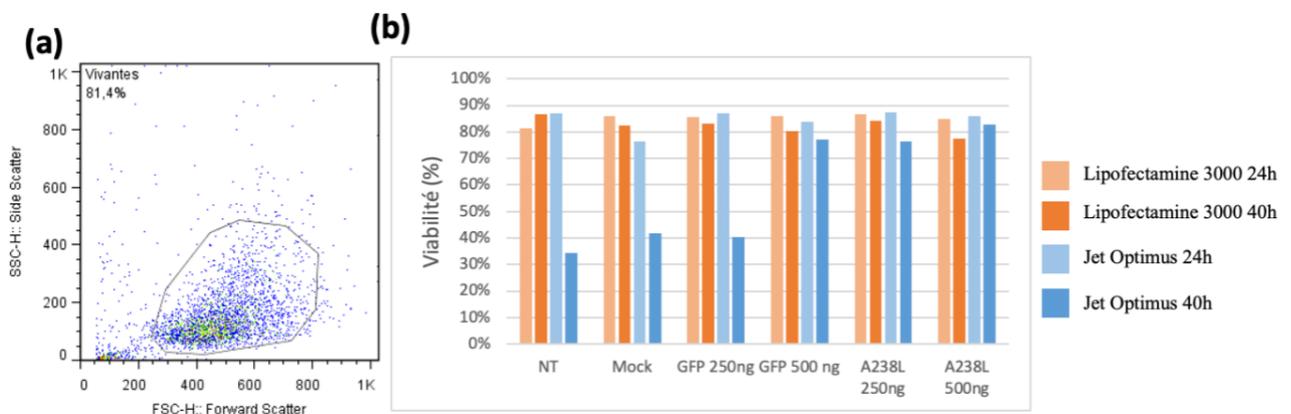


Figure 6 : Analyse de la viabilité cellulaire en cytométrie en flux. (a) Exemple de cellules considérées comme viables sur la base de leur profil Side Scatter / Forward Scatter (b) Pourcentage de viabilité des cellules T3 transfectées selon les différents traitements.

En ce qui concerne le pourcentage de transfection cellulaire, il est aussi déterminé grâce à l'intensité de fluorescence dans le canal GFP (FL1) (Figure 7 a). Comme attendu, les contrôles négatifs montrent bien des niveaux négligeables de GFP. Une condition de transfection se distingue des autres en raison de son efficacité accrue. En effet, la transfection avec la Lipofectamine 3000 à 40 heures donne de bons pourcentages de transfection : 46 % pour la GFP 250 ng et 20 % pour A238L 500 ng. En général, le réactif Lipofectamine 3000 à 40 heures donne de bien meilleurs résultats (jusqu'à 46%) que le JetOptimus (jusqu'à 23 %) (Figure 7 b).

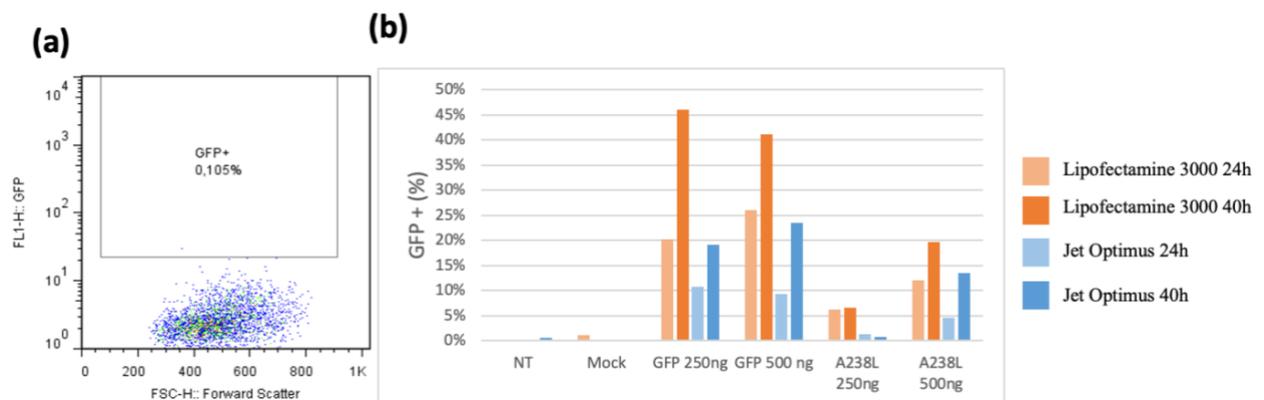


Figure 7 : Analyse du niveau de transfection par cytométrie en flux. (a) Exemple de cellules non transfectées. Le niveau de GFP est représenté en y ; et le Forward Scatter en x. (b) Pourcentage de cellules T3 transfectées estimé grâce à la région (GFP +) en fonction des différentes conditions de transfection.

III.3 Immunofluorescence : imagerie confocale

La localisation de la protéine p65 (sous-unité de NF- κ B) est observée au microscope confocale afin de déterminer l'impact des gènes viraux dans la translocation au noyau de NF- κ B. Différentes images sont générées (Figure 8). En bleu (a, e) est visualisé le 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI), qui marque l'ADN des noyaux. En rouge (b, f) est visualisé p65 au niveau des cytoplasmes et des noyaux des cellules marquées. En vert (c, g) est visualisé la GFP, qui permet de déterminer si la cellule est transfectée ou non. La superposition de ces images est aussi montrée (d, h). Pour les cellules stimulées à la flagelline, le noyau a une fluorescence beaucoup plus importante que pour les cellules non stimulées (Figure 8 b, f). En effet, la flagelline active la cellule ce qui induit la translocation de p65 dans le noyau.

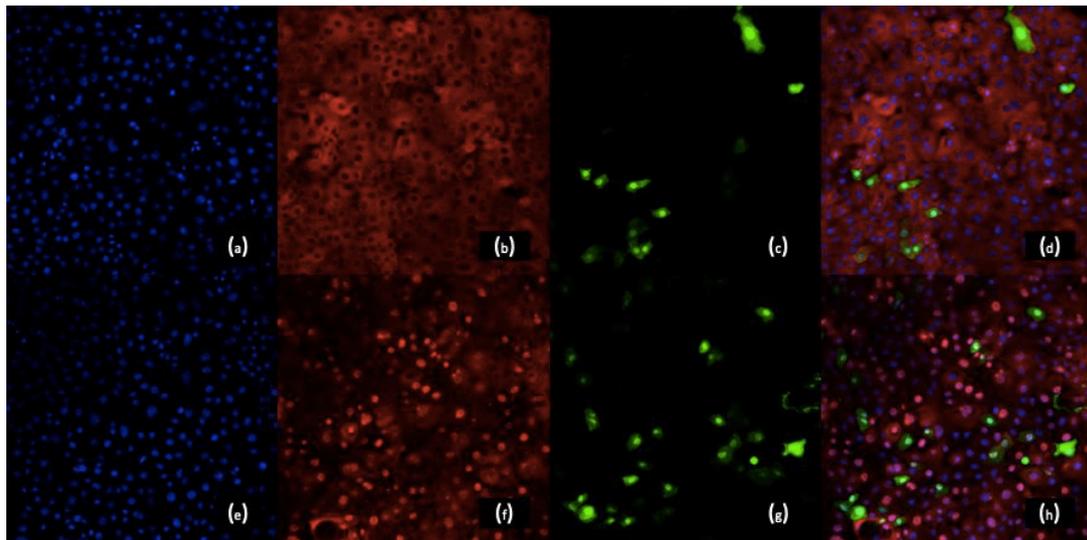


Figure 8 : Résultats des observations au microscope confocal (a) Noyau des cellules transfectées avec A238L et non stimulées mis en évidence par le DAPI (b) Cytoplasme des cellules transfectées avec A238L et non stimulées mis en évidence avec p53 (c) Cellules non stimulées transfectées avec A238L (en vertes) (d) Superposition des images (a) (b) et (c). (e) Noyau des cellules transfectées avec A238L et stimulées à la flagelline mis en évidence par le DAPI (f) Cytoplasme des cellules transfectées avec A238L et stimulées avec la flagelline mis en évidence avec p53 (g) Cellules stimulées avec la flagelline transfectées avec A238L (en vertes) (h) Superposition des images (e) (f) et (g).

Les résultats calculés à partir de ces images sont analysés dans CellProfiler, et les données sont analysées dans le logiciel R afin de calculer le rapport moyen de p53 nucléaire par rapport au p53 cytoplasmique (Figure 9).

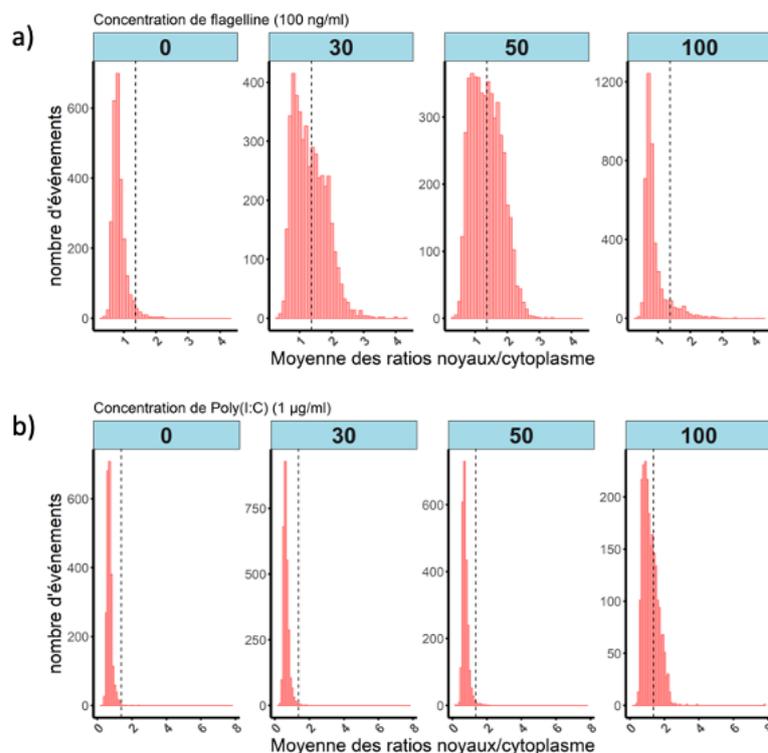


Figure 9 : Représentations graphiques de l'activation des cellules T3. Les histogrammes représentent le signal de p53 dans le noyau par rapport au cytoplasme pour la stimulation avec la flagelline (a) ou avec le Poly (I:C) (b) à 0, 30, 50 et 100 min après la stimulation. La barre représente le seuil à partir du qu'elle les cellules sont activées. Elle est calculée à partir de la moyenne des cellules non stimulées en lui rajoutant 3 écart-types.

Pour la flagelline, les cellules sont activées à partir de 30 minutes jusqu'à 50 minutes (Figure 9 a) et retourne au cytoplasme vers 100 minutes. En revanche, les cellules sont stimulées que seulement à partir de 100 minutes pour le Poly (I:C) (Figure 9 b). Afin de savoir si les gènes viraux jouent un rôle dans la rétention de p65 dans le cytoplasme et donc dans l'inhibition de l'activation des cellules, un diagramme en violon est réalisé avec les résultats bruts (Figure 10 a). La proportion de cellules activées correspond aux cellules dont le rapport de fluorescence moyen entre le noyau et le cytoplasme dépasse le seuil représenté par une ligne rouge (Figure 10). 10 000 simulations de ré échantillonnage ont été réalisées afin de déterminer une distribution de la proportion de cellules activées pour les contrôles et les cellules transfectées avec les gènes viraux respectifs. Les données montrent une diminution de la proportion de cellules activées lorsque le gène A238L est transfecté dans les cellules. Deux pics différents sont observés à 30 et 50 minutes après la stimulation par la flagelline ($p < 0,0001$) (Figure c, d). Un effet similaire a été observé dans les cellules transfectées avec A238L à 100 minutes après la stimulation par le Poly(I:C) (Figure 10 b) ($p < 0,0001$).

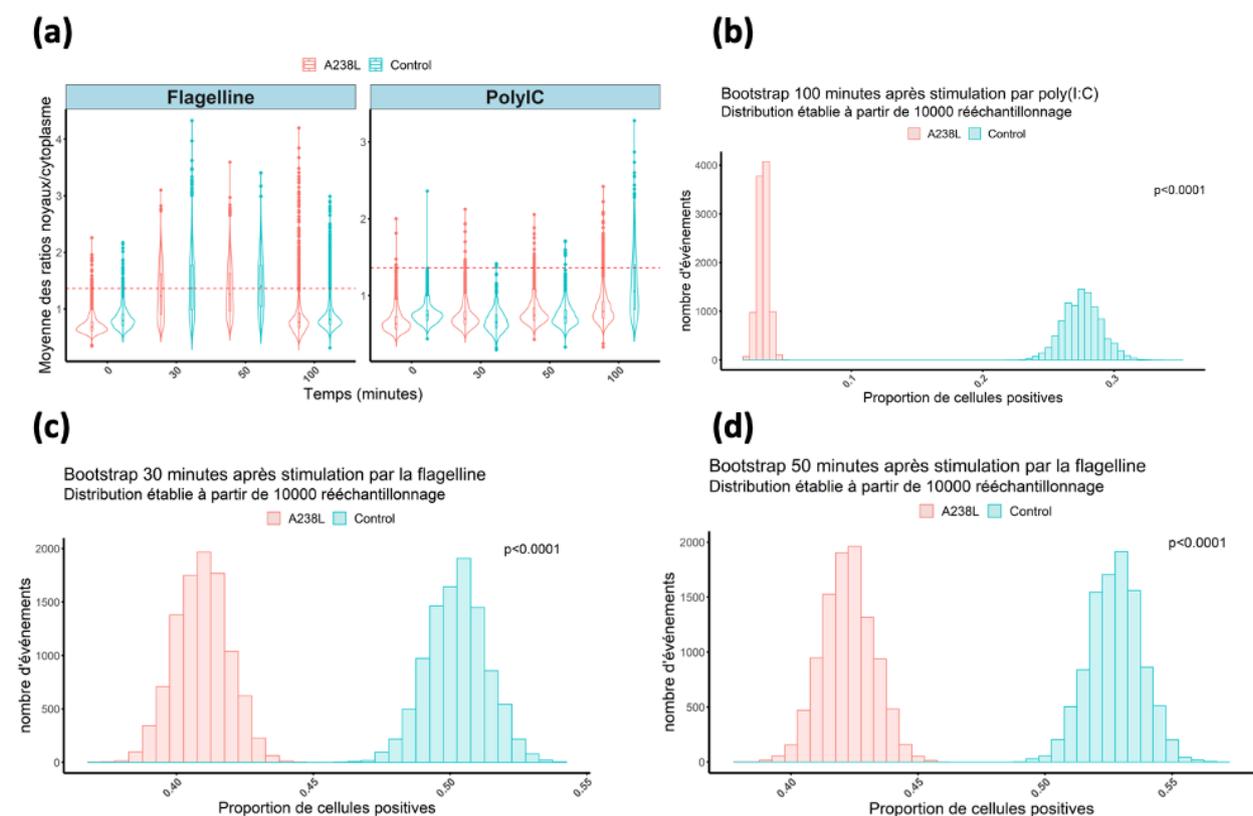


Figure 10 : Bilan des données de localisation de p65. (a) Diagramme en violon représentant la moyenne des ratios du noyau en fonction du cytoplasme en fonction du temps en comparant le contrôles au gène A238L pour la stimulation à a flagelline et celle au Poly (I:C) (b) Bootstrap à 100 minutes après la stimulation par Poly (I :C) réalisé à l'aide de 10000 échantillonnage (c) Bootstrap à 30 minutes après la stimulation par flagelline réalisé à l'aide de 10000 échantillonnage (d) Bootstrap à 50 minutes après la stimulation par flagelline réalisé à l'aide de 10000 échantillonnage. Les p-values sont calculées à partir d'un test de permutation. La barre horizontale représente le seuil à partir du qu'elle les cellules sont activées. Elle est calculée à partir de la moyenne des cellules non stimulées en lui rajoutant 3 écart-types.

Un effet similaire aux résultats précédent avec A238L a été observé lorsque les cellules ont été transfectées avec A528R et stimulées avec du Poly (I:C) pendant 100 minutes. La proportion de cellules activées est beaucoup plus faible dans les cellules exprimant A528R, comme le montre la séparation entre les deux populations dans l'histogramme (Figure 11 d) ($p < 0,0001$). Cependant, il faut être prudent lors de l'interprétation des résultats pour les cellules A528R stimulées par la flagelline. Bien qu'il semble y avoir une diminution à 30 minutes, aucune différence n'est observée à 50 minutes (Figure 11 c, d).

La même tendance est observée entre le contrôle et le gène viral sur l'augmentation de la proportion de cellules activées à 50 minutes post flagelline ($p = 0,053$). D'autres études sont nécessaires pour confirmer ces résultats.

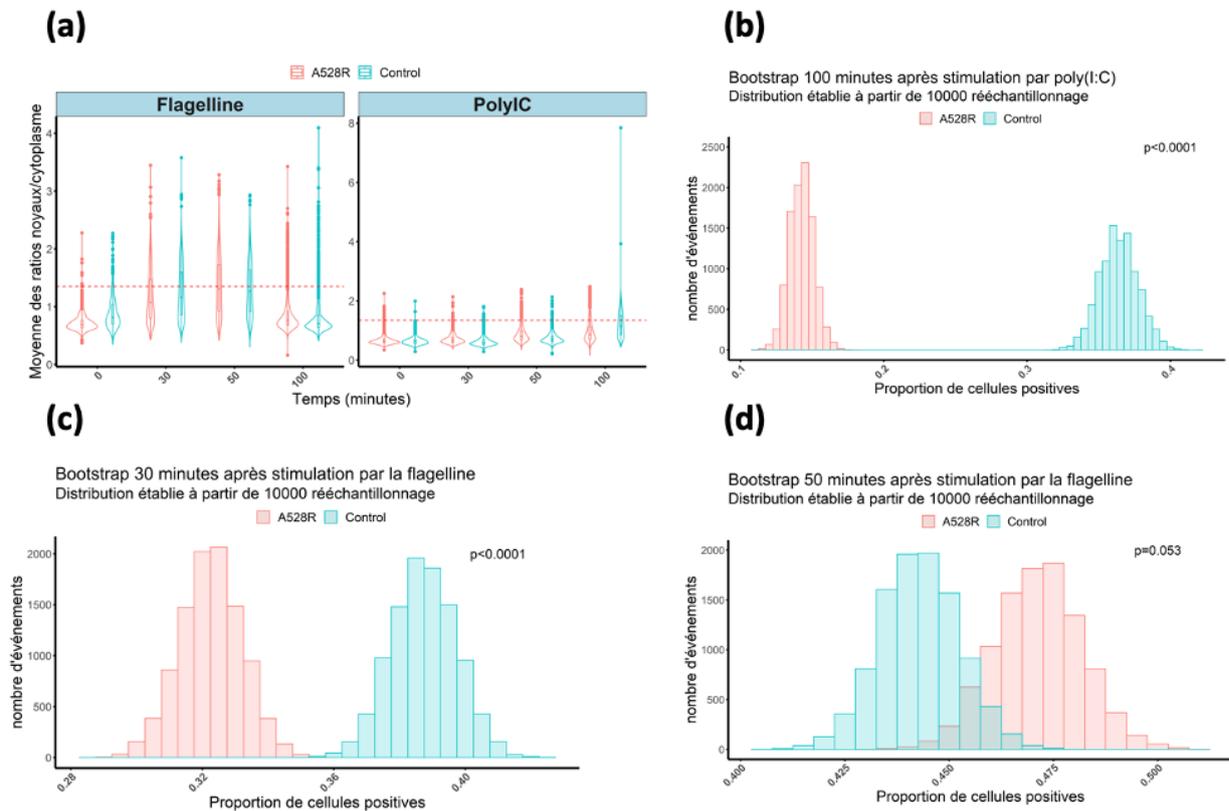


Figure 11 : Bilan des données de localisation de p65. (a) Diagramme en violon représentant la moyenne des ratios du noyau en fonction du cytoplasme en fonction du temps en comparant le contrôle au gène A238L pour la stimulation à la flagelline et celle au Poly (I:C) (b) Bootstrap à 100 minutes après la stimulation par Poly (I:C) réalisé à l'aide de 10000 échantillonnages (c) Bootstrap à 30 minutes après la stimulation par flagelline réalisé à l'aide de 10000 échantillonnages (d) Bootstrap à 50 minutes après la stimulation par flagelline réalisé à l'aide de 10000 échantillonnages. Les p-values sont calculées à partir d'un test de permutation. La barre horizontale représente le seuil à partir duquel les cellules sont activées. Elle est calculée à partir de la moyenne des cellules non stimulées en lui rajoutant 3 écarts-types.

III.4 Résultats de la PCR quantitative

Afin de valider l'effet des gènes sur la voie NF- κ B, les niveaux de transcrits de CCL20, une cytokine pro-inflammatoire dont la transcription est contrôlée par cette voie, ont été quantifiés par qPCR. Les courbes d'amplification des contrôles, du gène de ménage (B2M) et du gène d'intérêt (CCL20) sont vérifiées avant l'interprétation des résultats afin de vérifier que les échantillons ont bien été amplifiés et qu'aucune contamination ne peut être détectée. Le contrôle négatif est le contrôle contenant de l'eau sans ARN et le mix réactionnel, et permet de vérifier que le mix n'a pas été contaminé. Le contrôle positif est le pool, il contient du mix et 1 μ L d'ADN complémentaire de chaque échantillon.

Le pool RT (a), qui sert de contrôle positif, est amplifié au bout de 20 cycles, le contrôle est donc validé. Sur la courbe d'amplification de l'eau (b), il n'y a pas d'amplification, le contrôle négatif est donc validé. Les courbes de fusion des gènes B2M et CCL20 ne montrent un seul pic (c,d), ce qui démontre que l'amplification de ces gènes est spécifique (un seul produit d'amplification présent).

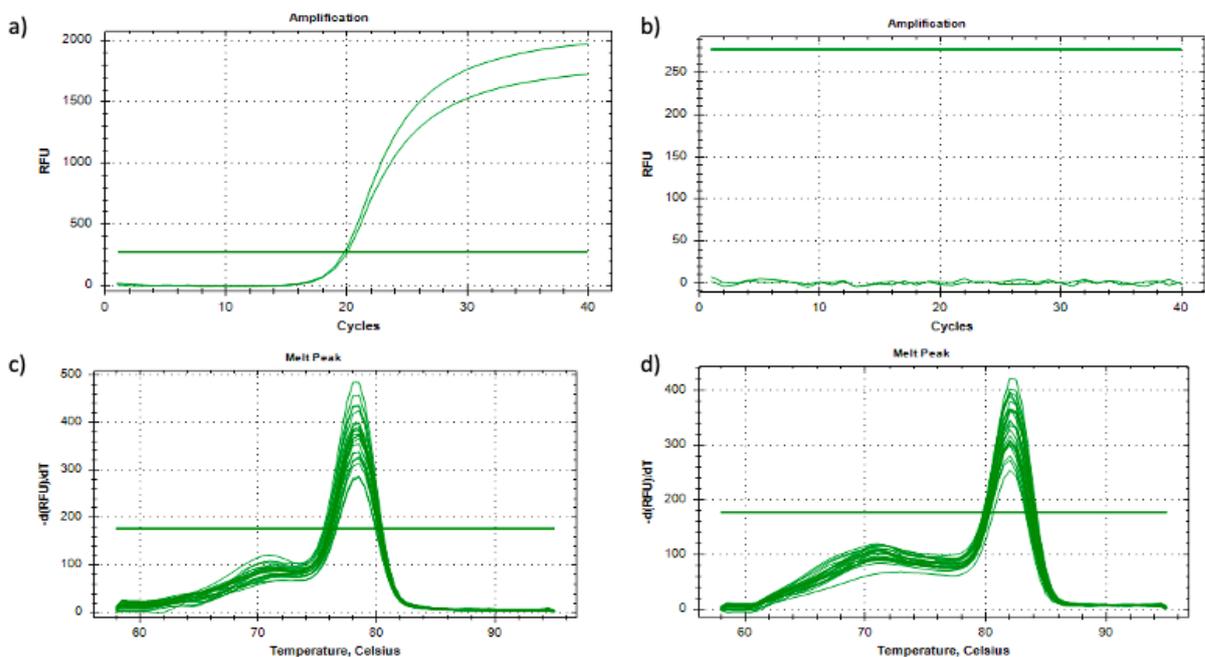


Figure 12 : Résultats de la PCR (a) Courbe d'amplification du pool RT : contrôle positif (b) Courbe d'amplification de l'eau : contrôle négatif (c) Courbe de fusion du gène de ménage B2M (d) Courbe de fusion du gène CCL20

Par la suite, la reproductibilité des résultats basé sur l'écart type des valeurs de Ct pour les duplicats est regardée afin de savoir si les résultats peuvent être analysés correctement (Tableau 1). Les écarts de valeurs de Ct sont assez faibles, avec des valeurs d'écart type comprises entre

0.01 et 0.2. Pour la suite de l'analyse, il sera donc considéré que les résultats avec des différences de Ct largement supérieures à ces valeurs sont fiables.

Tableau 1 : Écart entre les Ct pour les répliquas

	B2M	CCL20
MOCK 4H	0,064	0,202
GFP 4H	0,059	0,203
A238L 4H	0,101	0,011
A528R 4H	0,065	0,098
MOCK 4H + Flagelline	0,208	0,054
GFP 4H + Flagelline	0,185	0,036
A238L 4H + Flagelline	0,176	0,164
A528R 4H + Flagelline	0,187	0,171

Les résultats de la PCR des deux gènes, le gène de ménage (B2M) ainsi que le gène d'intérêt (CCL20) sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 2).

Tableau 2 : Résultats de la PCR quantitative pour le gène de ménage B2M et le gène d'intérêt CCL20.

	CCL20	B2M	Δ CT CCL20-B2M	$\Delta\Delta$ CT (MOCK 4 heures)	Facteur d'augmentation
MOCK	32,12	21,19	10,93	0,00	1,00
GFP	30,64	20,2	10,44	-0,49	1,40
A238L	31,21	21,07	10,14	-0,79	1,73
A528R	30,42	20,36	10,06	-0,87	1,83
MOCK + Flagelline 4 heures	25,54	21,22	4,32	-6,61	97,68
GFP + Flagelline 4 heures	26,02	21,08	4,94	-5,99	63,56
A238L + Flagelline 4 heures	25,45	21,03	4,42	-6,51	91,14
A528R + Flagelline 4 heures	25,91	21,34	4,57	-6,36	82,14

Dans un premier temps, le calcul du Δ Ct est effectué : il correspond au Ct du gène d'intérêt (CCL20) moins le Ct du gène de ménage (B2M). Il permet de tenir compte de la qualité (et quantité) des ADNc, de la viabilité des cellules, etc. Ensuite, le $\Delta\Delta$ Ct est calculé : il correspond au Δ Ct de l'échantillon d'intérêt moins le Δ Ct de l'échantillon contrôle. L'échantillon de contrôle est Mock. Ceci est ensuite transformé en facteur d'augmentation avec la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Les échantillons MOCK, GFP, A238L et A528R n'ont pas été stimulés, ils permettent de voir si la transfection des gènes viraux a un effet sur les niveaux de transcrits de CCL20 ainsi

qu'avoir un contrôle négatif (MOCK). Il est à noter que la transfection des gènes viraux et de la GFP a un petit effet sur la transcription de CCL20 (1,40 à 1,83). Plus surprenant, la transfection des gènes A238L et A528R n'inhibe que très peu la transcription de la protéine CCL20 induite par la flagelline (91,14 et 82,14 contre 97,68 pour MOCK).

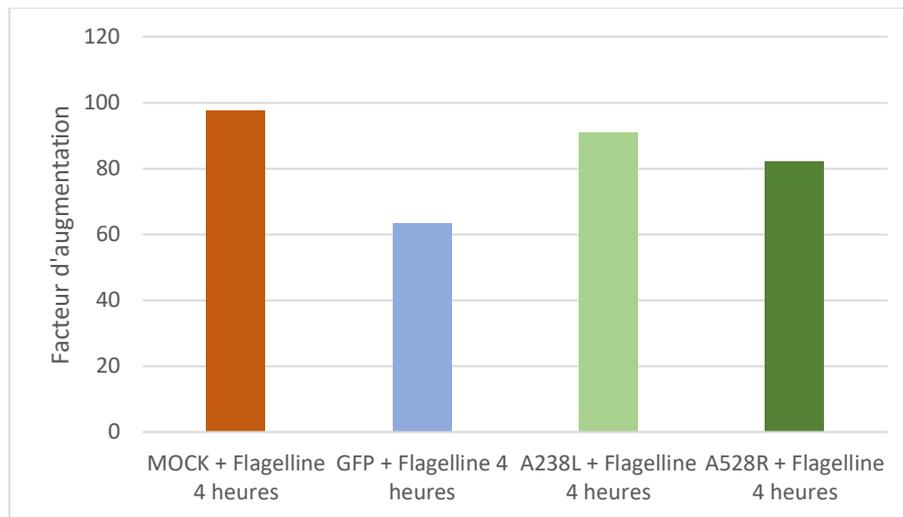


Figure 13 : Facteur d'augmentation en fonction des échantillons. Pour chacun des échantillons indiqués, nous avons calculé le facteur d'augmentation par rapport à l'échantillon contrôle (MOCK), après normalisation par le gène de ménage B2M, grâce à la méthode de calcul $\Delta\Delta Ct$.

IV Discussion, conclusion et perspectives

L'objectif principal de ce projet était d'évaluer l'impact de la surexpression de A238L et A528R, deux gènes de virulence du virus de la PPA sur l'activation de la voie NF- κ B, et la synthèse de cytokines qui s'en suit.

Nous avons réussi à mettre au point le protocole de transfection de cellules T3, avec un taux de viabilité d'environ 80% et des taux de transfection variables pouvant aller jusqu'à de 46% obtenus avec la Lipofectamine 3000. Bien que ces conditions soient suffisantes pour étudier l'effet des gènes viraux sur la translocation nucléaire de NF- κ B, ce protocole pourrait être amélioré. En effet, selon les données publiées par les fournisseurs, le pourcentage de transfection avec le JetOptimus peut atteindre 80% ; et 75% pour la Lipofectamine 3000 (d'après la notice commerciale). Le pourcentage de viabilité cellulaire, en particulier pour le JetOptimus, a été plus faible qu'attendu. Plusieurs pistes pourraient permettre de pallier ces problèmes :

- Réaliser une expérience de cinétique plus fine afin de déterminer le timing optimal pour l'efficacité de transfection et la viabilité cellulaire. En effet, dans cette expérience, il a été testé uniquement les temps 24 heures et 40 heures, il est donc possible qu'un temps intermédiaire présente de meilleurs résultats.
- Utiliser d'autres réactifs de transfection, tels que le JetPEI ou le FuGene.
- Il est également envisageable d'utiliser d'autres cellules porcines pour la transfection, bien que peu d'autres lignées cellulaires porcines soient disponibles au laboratoire. Les lignées 3D4 (macrophages porcins) ou WSL (cellules de poumons de sanglier) pourraient par exemple être utilisées.

Malgré ces limitations, l'objectif principal du projet a bien été atteint car nous avons pu étudier l'effet de A238L et A528R, deux gènes de virulence du virus de la PPA, sur l'activation de la voie NF- κ B. En effet, nous avons observé qu'après 30 et 50 minutes de stimulation avec la flagelline, le gène A238L inhibe significativement la translocation de p65 dans le noyau (Figure 10 c, d). A528R a un effet similaire à A238L après 30 minutes de stimulation avec la flagelline, mais cet effet ne semble plus significatif après 50 minutes (Figure 11 c, d). Avant de pouvoir conclure sur l'effet de ces deux gènes viraux, il conviendra de répéter l'expérience plusieurs fois dans les mêmes conditions. Afin de continuer à optimiser les conditions expérimentales, une cinétique plus fine pourrait être effectuée, par exemple avec des prélèvements à 30, 35, 40, 45 et 50 minutes de stimulation avec la flagelline. Plusieurs concentrations de flagelline pourraient aussi être utilisées. Pour les stimulations avec le Poly (I:C), les gènes viraux commencent à avoir un effet sur le ratio noyau/cytoplasme de p65 à partir de 100 minutes, il est donc prématuré de dire que les gènes viraux ont un effet sur la translocation de p65. Encore une fois, il faudrait faire une cinétique en répliques après les 100 minutes afin de déterminer si l'effet observé est significatif. Les différences observées entre les 2 types de stimulations sont sûrement dues au fait TLR5 (dont le ligand est la flagelline) a une localisation intracellulaire endosomale, alors TLR3 (stimulé par le Poly (I:C) est membranaire.

Compte tenu de ces résultats sur la translocation nucléaire de NF- κ B, nous nous attendions à voir un effet inhibiteur de A238L (et peut être de A528R) sur les niveaux de transcrits de CCL20, une cytokine pro-inflammatoire dont l'expression est stimulée par la flagelline et dépend de NF- κ B [19]. Ce n'est pas ce qui est observé : en effet, comme présenté en Figure 13,

la flagelline induit l'expression de CCL20 d'un facteur 97,68 (comme attendu), mais A238L a un effet comparable (91,14). La transfection avec le plasmide contrôle GFP, lui, donne des résultats proches (63,56). Ce dernier résultat est tout de même à interpréter avec prudence, car ce plasmide est commercial et n'est pas basé sur le même vecteur que les plasmides contenant les gènes viraux. Un meilleur contrôle négatif serait donc d'utiliser le plasmide pSELECT-EGFP-blasti vide, sans gènes viraux. Comment expliquer ce résultat ? Bien que la transcription de CCL20 dépende en grande partie de NF- κ B, d'autres facteurs de transcription susceptibles d'être induits par la flagelline, tels que AP1 ou Sp1 [20] pourraient compenser l'inhibition de la voie NF- κ B par A238L. Afin de trancher toutes ces questions, il serait souhaitable de mesurer les niveaux de transcription d'autres cytokines pro-inflammatoires stimulées par NF- κ B : les niveaux d'IL β , d'IL6, de CXCL2, ou de CXCL8 pourraient par exemple être quantifiés par qPCR, comme nous l'avons fait pour CCL20. Ce projet s'est focalisé sur l'effet des gènes viraux sur la voie NF- κ B ; cependant, leurs effets sur la voie de l'Interféron seraient aussi intéressants à évaluer.

Les résultats obtenus dans cette étude de 10 semaines sont encourageants car ils ont permis de démontrer les effets des deux gènes de virulence du virus de la PPA sur l'activation de la voie NF- κ B. Il serait intéressant de reproduire ces expériences sur les autres gènes viraux identifiés par le laboratoire tels que L83L, I329L ou encore DP96R. La caractérisation des mécanismes d'action des gènes viraux est une voie prometteuse afin de faciliter la recherche sur les vaccins vivants atténués pour la PPA.

V Références bibliographiques

- [1] « The \$100-billion toll of a pig epidemic in China », *Nature*, vol. 598, n° 7879, p. 11-11, oct. 2021, doi: 10.1038/d41586-021-02642-z.
- [2] R. Eustace Montgomery, « On A Form of Swine Fever Occurring in British East Africa (Kenya Colony) », *J. Comp. Pathol. Ther.*, vol. 34, p. 159-191, janv. 1921, doi: 10.1016/S0368-1742(21)80031-4.
- [3] C. A. Oura, P. P. Powell, E. Anderson, et R. M. Parkhouse, « The pathogenesis of African swine fever in the resistant bushpig », *J. Gen. Virol.*, vol. 79 (Pt 6), p. 1439-1443, juin 1998, doi: 10.1099/0022-1317-79-6-1439.
- [4] N. N. Gaudreault, D. W. Madden, W. C. Wilson, J. D. Trujillo, et J. A. Richt, « African Swine Fever Virus: An Emerging DNA Arbovirus », *Front. Vet. Sci.*, vol. 7, p. 215, 2020, doi: 10.3389/fvets.2020.00215.
- [5] A. Malogolovkin et D. Kolbasov, « Genetic and antigenic diversity of African swine fever virus », *Virus Res.*, vol. 271, p. 197673, oct. 2019, doi: 10.1016/j.virusres.2019.197673.
- [6] C. L. Netherton et T. E. Wileman, « African swine fever virus organelle rearrangements », *Virus Res.*, vol. 173, n° 1, p. 76-86, avr. 2013, doi: 10.1016/j.virusres.2012.12.014.
- [7] M. Simões, F. B. Freitas, A. Leitão, C. Martins, et F. Ferreira, « African swine fever virus replication events and cell nucleus: New insights and perspectives », *Virus Res.*, vol. 270, p. 197667, sept. 2019, doi: 10.1016/j.virusres.2019.197667.
- [8] G. Franzoni *et al.*, « Characterization of the interaction of African swine fever virus with monocytes and derived macrophage subsets », *Vet. Microbiol.*, vol. 198, p. 88-98, janv. 2017, doi: 10.1016/j.vetmic.2016.12.010.
- [9] I. Vallée, S. W. Tait, et P. P. Powell, « African swine fever virus infection of porcine aortic endothelial cells leads to inhibition of inflammatory responses, activation of the thrombotic state, and apoptosis », *J. Virol.*, vol. 75, n° 21, p. 10372-10382, nov. 2001, doi: 10.1128/JVI.75.21.10372-10382.2001.
- [10] D. P. Gladue et M. V. Borca, « Recombinant ASF Live Attenuated Virus Strains as Experimental Vaccine Candidates », *Viruses*, vol. 14, n° 5, p. 878, avr. 2022, doi: 10.3390/v14050878.
- [11] L. K. Dixon, M. Islam, R. Nash, et A. L. Reis, « African swine fever virus evasion of host defences », *Virus Res.*, vol. 266, p. 25-33, juin 2019, doi: 10.1016/j.virusres.2019.04.002.
- [12] P. P. Powell, L. K. Dixon, et R. M. Parkhouse, « An IkappaB homolog encoded by African swine fever virus provides a novel mechanism for downregulation of proinflammatory cytokine responses in host macrophages », *J. Virol.*, vol. 70, n° 12, p. 8527-8533, déc. 1996, doi: 10.1128/jvi.70.12.8527-8533.1996.
- [13] R. N. Silk, G. C. Bowick, C. C. Abrams, et L. K. Dixon, « African swine fever virus A238L inhibitor of NF-kappaB and of calcineurin phosphatase is imported actively into the nucleus and exported by a CRM1-mediated pathway », *J. Gen. Virol.*, vol. 88, n° Pt 2, p. 411-419, févr. 2007, doi: 10.1099/vir.0.82358-0.
- [14] A. G. Granja *et al.*, « The viral protein A238L inhibits TNF-alpha expression through a CBP/p300 transcriptional coactivators pathway », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 176, n° 1, p. 451-462, janv. 2006, doi: 10.4049/jimmunol.176.1.451.
- [15] S. P. Mukherjee, M. Behar, H. A. Birnbaum, A. Hoffmann, P. E. Wright, et G. Ghosh, « Analysis of the RelA:CBP/p300 Interaction Reveals Its Involvement in NF-κB-Driven Transcription », *PLoS Biol.*, vol. 11, n° 9, p. e1001647, sept. 2013, doi: 10.1371/journal.pbio.1001647.
- [16] S. Gil, N. Sepúlveda, E. Albina, A. Leitão, et C. Martins, « The low-virulent African swine fever virus (ASFV/NH/P68) induces enhanced expression and production of relevant regulatory cytokines (IFNalpha, TNFalpha and IL12p40) on porcine macrophages in comparison to the highly virulent ASFV/L60 », *Arch. Virol.*, vol. 153, n° 10, p. 1845-1854, 2008, doi: 10.1007/s00705-008-0196-5.
- [17] X. Liu *et al.*, « African Swine Fever Virus A528R Inhibits TLR8 Mediated NF-κB Activity by Targeting p65 Activation and Nuclear Translocation », *Viruses*, vol. 13, n° 10, p. 2046, oct. 2021, doi: 10.3390/v13102046.
- [18] S. Wang *et al.*, « Cytokine Storm in Domestic Pigs Induced by Infection of Virulent African Swine Fever Virus », *Front. Vet. Sci.*, vol. 7, p. 601641, 2020, doi: 10.3389/fvets.2020.601641.
- [19] R. López-Gálvez *et al.*, « Airway Administration of Flagellin Regulates the Inflammatory Response to *Pseudomonas aeruginosa* », *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 65, n° 4, p. 378-389, oct. 2021, doi: 10.1165/rcmb.2021-0125OC.
- [20] L. Zhao, J. Xia, X. Wang, et F. Xu, « Transcriptional regulation of CCL20 expression », *Microbes Infect.*, vol. 16, n° 10, p. 864-870, oct. 2014, doi: 10.1016/j.micinf.2014.08.005.

Résumé

Le Virus de la Peste Porcine Africaine est l'agent responsable de la Peste Porcine Africaine (PPA), une fièvre hémorragique touchant les suidés (principalement le porc domestique et le sanglier) et transmise dans certains cas par les tiques. Il existe différentes souches du virus de la PPA, certaines étant plus virulentes que d'autres.

Le but de ce projet est d'étudier les liens entre ces mécanismes de virulence du virus de la PPA et la réponse immunitaire innée des cellules porcines. Deux gènes de virulence du virus de la PPA (A238L et A528R) ont été sélectionnés et clonés au sein de plasmides d'expression. Cette approche permet de surexprimer ces gènes de virulence par transfection et d'étudier leur effet sur la voie NF- κ B, qui est un régulateur central de l'inflammation ; et la voie antivirale de l'Interféron. Le potentiel d'inhibition de ces voies par les gènes de virulence du virus de la PPA sera étudié par le biais de techniques de microscopie confocale. La synthèse de cytokines est aussi étudiée grâce à une PCR quantitative comparant le gène CCL20 à un gène de ménage.

Les résultats obtenus au cours de ce projet ont permis d'optimiser les protocoles de transfusions de gènes viraux au sein des cellules porcines, et de mettre en évidence l'inhibition de la translocation nucléaire de p65 par le gène viral A238L. En revanche, la surexpression de A238L n'a eu aucun effet sur la transcription du gène CCL20.