

Université de Montréal

**La pathogenèse du virus du syndrome reproducteur et
respiratoire porcin (VSRRP) dans un nouveau modèle de
cellules épithéliales des voies respiratoires du porc
génétiquement modifiées (NPTr-CD163)**

par Marika Köszegi

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M. Sc.)
en sciences vétérinaires option microbiologie

Avril, 2019

© Marika Köszegi, 2019

Université de Montréal
Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

**La pathogenèse du virus du syndrome reproducteur et
respiratoire porcin (VSRRP) dans un nouveau modèle de
cellules épithéliales des voies respiratoires du porc
génétiquement modifiées (NPTr-CD163)**

Présenté par

Marika Köszegi

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr. Levon Abrahamyan

Président-rapporteur

Dr. Carl A. Gagnon

Directeur de recherche

Dr. Younès Chorfi

Membre du jury

Résumé

Le syndrome reproducteur et respiratoire (SRRP) est une maladie virale répandue en Amérique du Nord et est la source de grandes pertes économiques dans l'industrie porcine. Son agent étiologique, le virus du SRRP (VSRRP), est un virus ayant besoin de plusieurs récepteurs afin d'entrer dans une cellule. Un de ceux-ci est le récepteur CD163 qui est essentiel à l'internalisation complète du virus. En effet, l'ajout du récepteur à des cellules n'étant pas permissives au virus les rendent permissives. Puisque ce récepteur semble crucial à l'infection du VSRRP, des porcs ont été génétiquement modifiés afin de ne pas posséder le récepteur CD163. Ces porcs modifiés sont complètement résistants au virus et ne comportent pas de différences phénotypiques comparativement aux porcs non modifiés. Récemment, dans notre laboratoire, une lignée cellulaire porcine a été génétiquement modifiée afin d'étudier la pathogenèse du VSRRP lors de co-infection avec d'autres pathogènes porcins. Plus précisément, des cellules de trachée de porcelet naissant (NPTr) ont été modifiées afin d'exprimer le récepteur CD163 et permettre la réplication du VSRRP. Cependant, le VSRRP est habituellement connu pour causer la mort des cellules qu'il infecte par apoptose, comme c'est le cas dans les macrophages alvéolaires porcins (PAM) et les MARC-145. Intéressamment, le VSRRP peut se répliquer dans les NPTr-CD163 à une vitesse similaire que dans les MARC-145, mais sans causer de mort cellulaire. De plus, le VSRRP est un virus ayant un haut taux de mutations et ceci pourrait favoriser éventuellement son adaptation pour infecter des cellules sans récepteur CD163. Nos hypothèses, sont que le VSRRP peut s'adapter à des cellules ne possédant pas de récepteur CD163 et que la réponse cellulaire des NPTr-CD163 contre le VSRRP est mieux adaptée ce qui permet la survie des cellules infectées. Afin de déterminer si le VSRRP peut s'adapter à des cellules sans récepteur CD163, la souche québécoise de référence du VSRRP de type 2 IAF-Klop a été répliquée sur des ratios grandissants de cellules NPTr ne possédant pas le récepteur CD163 nommées NPTr-N2. Aussi, afin de déterminer l'impact de l'infection du VSRRP dans les NPTr-CD163 et les MARC-145, la modulation de l'expression des ARNm de ces deux lignées cellulaires a été déterminée par séquençage à haut débit (SHD) en utilisant la technologie Illumina. Les résultats de la première expérience furent étonnants puisque contrairement à notre hypothèse, le virus ne s'est pas adapté aux cellules sans récepteurs CD163.

Au niveau du deuxième objectif concernant la modulation de l'expression des ARNm des cellules MARC-145 et NPTr-CD163 infectées par le VSRRP, les résultats ont permis de démontrer qu'il y a une certaine activation des gènes impliqués dans la voie de signalisation de l'apoptose dans les NPTr-CD163, mais qu'il y a aussi une forte inhibition, ce qui pourrait expliquer la survie de ces cellules. Ces résultats permettent une meilleure compréhension de la réponse de ces deux lignées cellulaires à l'infection virale.

Mots-clés: SRRP, VSRRP, CD163, NPTr, MARC-145, SHD, ARNm, Co-culture

Abstract

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is a widely spread disease in North America that causes huge economic losses in porcine industry. The PRRS virus (PRRSV) needs a lot of receptors to enter the cells. One of them is CD163, a crucial receptor to the virus internalization. Due to the importance of this receptor, researchers have genetically modified pigs to not express the CD163 receptor, providing them a resistance to PRRSV. Recently, a porcine cell-line was genetically modified to study PRRSV co-infection pathogenesis with other swine pathogens. More precisely, newborn pig trachea cells (NPTr) were modified to express the CD163 receptor, to allow PRRSV infection. However, PRRSV is known to trigger death of permissive infected cells through apoptosis, such as porcine alveolar macrophages (PAM), and MARC-145 cells. Interestingly, PRRSV can replicate into NPTr-CD163 cells at a similar rate than in MARC-145 infected cells but without inducing cell death. Also, PRRSV genome possesses high mutation rate, allowing possibility to adapt to cells without CD163 receptor. Those observations lead to the following question: how does PRRSV affect gene expression in MARC-145 cells and in NPTr-CD163 cells. Our hypothesis is that NPTr-CD163 cells response against PRRSV infection is better adapted which allow cells survival compared to MARC-145 infected cells. We also think that PRRSV could adapt to cells without CD163 receptor. Therefore, type-2 PRRSV strain, IAF-Klop, was used to infect cells at several passages containing lower to higher ratios of NPTr cells without CD163 receptor (called NPTr-N2). Also, mRNA expression modulation of the MARC-145 and the NPTr-CD163 infected cells was determined by an RNA-Seq experiment using the Illumina technology. Surprisingly, PRRSV was not able to adapt and infect NPTr-N2 cells. For the RNA-Seq experiment, an activation of the genes involved in the apoptosis pathway could be observed in NPTr-CD163 cells, but a lot of surviving genes were also expressed. This experiment gave us important insights in regards to the different mechanisms involved into PRRSV pathogenicity.

Keywords : PRRS, PRRSV, MARC-145, NPTr, RNA-Seq, mRNA, co-culture

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	5
Table des matières.....	6
Liste des tableaux.....	10
Liste des figures	12
Liste des sigles	15
Remerciements.....	17
Introduction.....	18
Chapitre I : Revue de la littérature.....	21
1. Syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP).....	21
1.1 Historique.....	21
1.2 Symptômes.....	21
1.3. Impact économique.....	21
2. Virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP).....	22
2.1 Agent étiologique.....	22
2.2 Classification	23
2.3 Réplication virale.....	24
2.4 Réponse du système immunitaire dirigée contre le VSRRP et modulation par ce dernier.....	27
3. Entrée du virus dans la cellule	29
3.1 Récepteurs impliqués dans l'entrée du virus du SRRP.....	29
3.2 Importance du récepteur CD163 dans l'entrée du virus	31
3.3 Modification du récepteur CD163 chez les porcs.....	31
4. Mort cellulaire.....	32

4.1 Apoptose	32
4.1.1 Mécanismes de l'apoptose	32
4.1.2 VSRRP et apoptose.....	33
4.2 Nécrose et nécroptose	36
4.2.1 Mécanismes de la nécrose	36
4.2.2 Mécanismes de la nécroptose	36
4.2.3 VSRRP et nécrose.....	37
4.2.4 VSRRP et nécroptose	37
4.3 Autophagie.....	38
4.3.1 Mécanismes de l'autophagie.....	38
4.3.2 VSRRP et autophagie	39
Chapitre II : Hypothèses et objectifs.....	40
1. Problématique	40
2. Hypothèses.....	40
3. Objectifs.....	40
Chapitre III : Matériel et méthodes	42
1. Matériel.....	42
1.1 Cellules	42
1.2 Virus.....	43
1.3 Anticorps.....	43
2. Méthodologie	43

2.1 Production du VSRRP	43
2.2 Titration du VSRRP	44
2.3 Détection du génome viral par RT-qPCR.....	44
2.4 Détection de protéines virales dans les cellules infectées par immunofluorescence indirecte	45
2.5 Adaptation du VSRRP aux cellules sans récepteur CD163 par passages en co-culture	46
2.6 Séquençage du génome viral entier du VSRRP.....	50
2.7 Séquençage des ARNm des cellules infectées par le VSRRP	51
2.7.1 Infection des cellules MARC-145 et NPTr-CD163 par le VSRRP.....	51
2.7.2 Préparation des bibliothèques pour le séquençage des ARNm cellulaires	51
2.8 Analyses.....	52
2.8.1 Statistiques.....	52
2.8.2 Bio-informatiques	52
Chapitre IV : Résultats.....	54
1. Adaptation du VSRRP pour sa réplication dans les cellules CD163 négatives.....	54
1.1 Réplication du VSRRP dans un système de co-culture NPTr-N2/NPTr-CD163	54
1.1.1 Quantification des particules virales infectieuses du VSRRP	54
1.1.2 Détection du génome viral par RT-qPCR.....	55
1.2 Détection de protéines virales par immunofluorescence indirecte dans les cellules infectées	56
1.3 Vérification de l'adaptation du VSRRP à des cellules non-permissives à la réplication virale par l'infection de cellules non-permissives, les NPTr-N2.....	61
1.4 Séquençage du génome du VSRRP des premiers et dix-huitièmes passages dans les cellules NPTr-CD163	63
1.4.1 Pourcentage de mutations du VSRRP	63
1.4.2 Types de mutations	66
1.4.3 Localisation des mutations dans le génome.....	67
1.4.4 Analyse de certaines mutations	68
2. Modulation de l'expression des ARNm.....	70

2.1 Contrôles effectués lors de l'infection des cellules par le VSRRP et de la préparation des librairies	73
2.2 Analyses bio-informatiques	76
2.2.1 Gènes les plus surexprimés et les plus sous-exprimés.....	78
2.2.1.1 Gènes et transcrits les plus surexprimés	78
2.2.1.2 Gènes et transcrits les plus sous-exprimés.....	83
2.2.2 Voies de signalisation potentiellement modulées.....	88
2.2.2.1 Apoptose	88
2.2.2.2 Nécroptose	92
2.2.2.3 Autophagie.....	95
3. Comparaison des gènes orthologues surexprimés dans les cellules MARC-145 et NPTr-CD163 infectées par le VSRRP	97
Chapitre V : Discussion	101
1. Adaptation du virus aux cellules sans CD163, les NPTr-N2.....	101
2. Séquençage du génome entier du VSRRP du premier et du dix-huitième passages	102
3. Modulation des voies de signalisation impliquées dans la mort cellulaire.....	104
3.1 Modulation de l'apoptose	105
3.2 Modulation de la nécroptose.....	106
3.3 Modulation de l'autophagie	107
3.4 Utilisation du logiciel en ligne OrthoVenn afin de comparer les gènes et transcrits différentiellement exprimés dans les MARC-145 et les NPTr-CD163 infectées par le VSRRP.....	108
Conclusion	110
Bibliographie.....	112
Annexes.....	119
I. Liste des bourses obtenues.....	119
II. Liste des publications révisées par les pairs	119
III. Participation à des congrès.....	119
IV. Participation à l'enseignement.....	119

Liste des tableaux

Tableau 1. Séquences des amorces et de la sonde utilisées afin d'amplifier une partie de l'ORF6 du VSRRP par RT-qPCR.....	45
Tableau 2. Protocole de la RT-qPCR visant à amplifier une partie de l'ORF6 du VSRRP.	45
Tableau 3. Proportions de cellules NPTr-CD163 et N2 lors de passages en co-culture (5% de variation du ratio par passage).	48
Tableau 4. Proportions de cellules NPTr-CD163 et N2 lors de passages en co-culture (10% de variation du ratio par passages).....	49
Tableau 5. Taux de mutations du VSRRP de la présente étude en comparaison avec une étude in vivo.	66
Tableau 6. Pourcentage de transversions et de transitions dans les 22 mutations retrouvées dans le dix-huitième passage par rapport au premier passage du VSRRP.....	66
Tableau 7. Position des mutations dans les différents ORFs du dix-huitième passage par rapport au premier du VSRRP.....	68
Tableau 8. Changements en acides aminés provoqués par les mutations dans le dix-huitième par rapport au premier passage du VSRRP.....	70
Tableau 9. Les 10 gènes les plus surexprimés dans les MARC-145 infectées par le VSRRP.	79
Tableau 10. Les 10 transcrits les plus surexprimés dans les MARC-145 infectées par le VSRRP.	80
Tableau 11. Les 10 gènes les plus surexprimés dans les NPTr-CD163 infectées par le VSRRP.	81
Tableau 12. Les 10 transcrits les plus surexprimés dans les NPTr-CD163 infectées par le VSRRP.....	82

Tableau 13. Les 10 gènes les plus sous-exprimés dans les MARC-145 infectées par le VSRRP.
..... 84

Tableau 14. Les 10 transcrits les plus sous-exprimés dans les MARC-145 infectées par le VSRRP..... 85

Tableau 15. Les 10 gènes les plus sous-exprimés dans les NPTr-CD163 infectées par le VSRRP.
..... 86

Tableau 16. Les 10 transcrits les plus sous-exprimés dans les NPTr-CD163 infectées par le VSRRP..... 87

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique d'une particule virale du VSRRP avec l'ARN simple brin (sb) et les protéines structurales le composant.....	23
Figure 2. Schématisation de la réplication du génome du VSRRP.....	25
Figure 3. Transcription du brin d'ARN négatif permettant la réplication et la traduction des ORF2a à 7.	26
Figure 4. Entrée du virus SRRP dans un macrophage primaire porcin.	30
Figure 5.Représentation de la voie de signalisation de l'apoptose par l'activation des caspases et l'impact de certaines protéines du VSRRP sur cette voie.....	35
Figure 6. Réplication virale du VSRRP dans les cellules NPTr-CD63 et NPTr-N2 en co-culture.	55
Figure 7. Triple-marquage par IFA des premier, dixième et quinzième passages avec des changements de 5% moins de cellules sans récepteur CD163 entre chaque passage par IFA.	57
Figure 8. Triple-marquage par IFA des premier, cinquième et huitième passages avec des changements de 10% moins de cellules sans récepteur CD163 entre chaque passage par IFA.	58
Figure 9. Triple-marquage des premier, dixième et quinzième passages du contrôle positif composé de 100% de cellules NPTr-CD163.	59
Figure 10. Triple-marquage par IFA des premier, cinquième et huitième passages du contrôle positif composé de 100% de cellules NPTr-CD163.	60
Figure 11. Onzième passage obtenu en co-culture (5% de différence) sur cellules NPTr-CD163 et NPTr-N2.....	62
Figure 12. Dix-septième et dix-huitième passages du contrôle d'infection au VSRRP contenant 100% de cellules NPTr-CD163.	64
Figure 13. Arbre phylogénique de type « Neighbor joining » du génome entier des premier et dix-huitième passages du VSRRP par rapport à d'autres souches de VSRRP séquencées.	65

Figure 14. Cinétique de réplication de la souche de VSRRP IAF-Klop dans les cellules MARC-145 et NPTr-CD163 à 4, 16, 28, 52, 76 et 100 heures post-infections.	72
Figure 15. Apparition de l'effet cytopathique dans les MARC-145 et maintien de l'infection dans les NPTr-CD163 à différentes heures post-infection (h.p.i).....	73
Figure 16. Production de protéines virales dans les MARC-145 vs NPTr-CD163 à 5 jours post-infection	75
Figure 17. Résultats de la migration dans le Bioanalyzer pour la première réaction de séquençage des ARNm.	76
Figure 18. Tracé de Volcan des ARNm modulés dans les cellules MARC-145 infectées comparés aux cellules non-infectées.....	77
Figure 19. Tracé de volcan des ARNm modulés dans les cellules NPTr-CD163 infectées comparés aux cellules non-infectées.....	77
Figure 20. Voie de signalisation de l'apoptose dans les MARC-145 infectées par le VSRRP.	90
Figure 21. Voie de signalisation de l'apoptose dans les NPTr-CD163 infectées par le VSRRP.	91
Figure 22. Voie de signalisation de la nécroptose dans les MARC-145 infectées par le VSRRP.	93
Figure 23. Voie de signalisation de la nécroptose dans les NPTr-CD163 infectées par le VSRRP.	94
Figure 24. Voie de signalisation de l'autophagie dans les MARC-145 infectées par le VSRRP.	96
Figure 25. Voie de signalisation de l'autophagie dans les cellules NPTr-CD163 infectées. Représentée en utilisant le logiciel gratuit en ligne KEGG pathway [85]......	97
Figure 26. Diagramme de Venn des gènes orthologues chez <i>Chlorocebus sabaëus</i> et <i>Sus scrofa</i>	99

Figure 27. Diagramme de Venn des transcrits surexprimés dans les MARC-145 (*Chlorocebus sabaesus*) et les NPTr-CD163 (*Sus scrofa*) infectées par le VSRRP. 100

Liste des sigles

aa: Acide aminé

ADN: Acide désoxyribonucléique

AIF : Apoptosis inducing factor (Facteur inducteur d'apoptose)

AMPk : AMP-activated protein kinase (Protéine kinase active de l'adénosine monophosphate)

AMΦ : Macrophage alvéolaire

Apaf-1: Apoptotic peptidase activating factor 1 (Facteur d'activation des peptidases apoptotiques 1)

ARN: Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARNsg : ARN subgénomiques

ATG: Autophagy related protein (protéine reliée à l'autophagie)

CHOP : CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein

Cq : Quantitation cycle (cycle de quantification)

DAMP : Damage-associated molecular pattern (Motif associé aux dommages cellulaires)

ECP : Effet cytopathique

FBS : Fœtal bovine serum (Sérum fœtal bovin)

FC: Fold change

FDR: False Discovery Rate (Taux de fausse découverte)

FITC : Fluorescein isothiocyanate (Isothiocyanate de fluorescéine)

HEPES: Acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique

IAF-Klop: Souche de référence québécoise du VSRRP

IFA : Immunofluorescence assay

IFN : Interféron

IL : Interleukine

Kb : Kilobase

MAPK : Mitogen-activated protein kinases (protéines kinase activées par les mitogènes)

Mdm2: murine double minute 2

MLKL: Mixed lineage kinase like

MOI : Multiplicity of infection (multiplicité d'infection)

mTOR: Mechanistic target of rapamycin (Cible mécanique de la rapamycine)
NFκB: Nuclear factor-kappa B (Facteur nucléaire kappa B)
NPTr: Newborn porcine tracheal cells (cellules de trachée de porcelet nouveau-né)
Nm : nanomètre
Nsp : non-structural protein (protéine non-structurale)
ORF : Open reading frame (cadre de lecture)
PAM : Porcine alveolar macrophage (Macrophage alvéolaire porcin)
PAMP : Pathogen-associated molecular pattern (Motif moléculaire associé au pathogène)
PBS : Phosphate buffer saline (Tampon phosphate salin)
PCR: Polymerase chain reaction (réaction de polymérase en chaîne)
PERK: protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (protéine kinase ER kinase à ARN-like)
p.i. : Post-infection
Pp : polyprotéine
RdRp: RNA dependant RNA polymerase (ARN polymérase ARN dépendante)
RFS : Ribosomal frame shift (changement de cadre de lecture ribosomal)
RIPK1 et RIPK3: Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 et 3 (Sérine/thréonine protéine kinase interagissant avec les récepteurs 1 et 3)
ROS : Reactive oxygen species (Dérivés réactifs de l'oxygène)
RNA-seq : ribonucleic acid sequencing (séquençage des ARNm)
SHD : Séquençage à haut débit
SRCR : Récepteur éboueur riche en cystéine
SRRP: Syndrome reproducteur et respiratoire porcin
TLR: Toll-like receptor (récepteur de type toll)
TRS : Transcriptional regulation switch (Facteur de régulation de la transcription)
UPR : Unfolded protein response (réponse aux protéines mal repliées)
VSRRP: Virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin

Remerciements

J'aimerais remercier les membres de mon laboratoire pour le support qu'ils ont pu m'apporter au cours de mes années d'études aux cycles supérieurs. Particulièrement, Chantale Provost pour son aide dans la résolution des problèmes persistants au laboratoire. J'aimerais aussi remercier Christian Lalonde pour son aide et sa bonne humeur. Malgré ses messages subliminaux, je ne serai pas restée pour faire un doctorat.

J'aimerais remercier mon directeur Carl A. Gagnon pour m'avoir donné la chance de poursuivre mes études au stade de maîtrise et pour m'avoir amené à me surpasser au cours de mes années d'études.

J'aimerais remercier le centre de recherche en infectiologie aviaire et porcine (CRIPA) (supporté financièrement par le FRQNT) et le conseil de recherche en sciences naturelles et génie du Canada (CRSNG) pour leur soutien financier au cours de ces deux années.

J'aimerais aussi remercier ma famille qui a su me supporter au cours de ces années.

Finalement, j'aimerais remercier mon chat Macska qui était toujours là pour me réconforter lorsque je revenais de mes dures et longues journées de laboratoire. Ceux qui me connaissent bien savent que mon chat, c'est le meilleur de tous les chats.

Introduction

Le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP) est le virus causant le plus de pertes économiques dans l'industrie porcine. Plus précisément, le VSRRP peut causer des pertes d'environ 120 millions de dollars canadiens par année [1]. Le VSRRP fait partie de l'ordre viral *Nidovirales*, de la famille *Arteriviridae* et du genre *Porarterivirus* avec le virus éleveur de la lactate déshydrogénase et l'artérovirus du rat de type 1 [2]. C'est un virus ayant un génome à ARN simple brin à polarité positive d'une longueur d'environ 15 Kb. La réplication de son génome requiert l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) responsable de la grande variabilité du génome du VSRRP [3]. Il existe deux types de VSRRP, type 1 et type 2. Le type 1 est retrouvé majoritairement en Europe, tandis que le type 2 se retrouve majoritairement en Amérique du Nord et en Asie [4, 5]. Dans les deux types, il existe des souches hautement pathogéniques. Au Québec, la souche type 2, IAF-Klop est utilisée comme souche de référence. Le VSRRP est un virus ayant besoin de plusieurs récepteurs pour entrer dans une cellule. Il y a tout d'abord l'héparane sulfate qui permet un premier attachement du virus à la membrane cellulaire. Par la suite, la sialoadhésine permettra le recrutement de clathrines qui vont permettre la formation d'un endosome dans lequel la particule virale sera internalisée. Par la suite, le récepteur CD163 permettra la décapsidation du virus et le relâchement du génome viral [6]. Or, il a été démontré que ce dernier est essentiel à l'entrée complète du virus dans une cellule [7]. Le récepteur CD163 est un récepteur éboueur ayant habituellement pour rôle d'entraîner l'élimination des complexes hémoglobines-haptoglobines [8].

Afin d'avoir une lignée cellulaire porcine immortalisée permettant l'étude du VSRRP, des cellules de trachées de porcelets (NPTr) n'étant pas naturellement permissives au VSRRP, ont été modifiées à l'aide d'un rétrovirus afin d'exprimer le récepteur CD163, donnant ainsi les cellules NPTr-CD163. Ce modèle permet ainsi d'étudier la co-infection du VSRRP avec d'autres pathogènes porcins tels que le circovirus porcin (CVP). Étonnamment, le VSRRP ne cause pas d'effet cytopathique (ECP) dans les NPTr-CD163. En effet, ce virus cause habituellement la mort de la cellule qu'il infecte. Cette mort cellulaire apparaît autour de 48 heures post-infection (p.i.) dans les cellules MARC-145. Or, dans les NPTr-CD163, aucun ECP n'a été observé, et ce, même à 5 jours p.i.

Puisque le récepteur CD163 est essentiel à l'entrée du virus dans les cellules, certains chercheurs ont modifié le récepteur CD163 chez des porcs [9]. Une modification du domaine SRCR numéro 5 (SRCR5) du récepteur empêche les souches virales de VSRRP de type 1 d'infecter les porcs, mais pas les souches VSRRP de type 2. Par contre, une inhibition complète du récepteur CD163 empêche les souches de VSRRP des deux types d'infecter les porcs. De plus, les porcs n'ayant pas de récepteur CD163 ne possédaient pas de changement phénotypique comparativement aux porcs ayant le récepteur CD163 [10]. Les porcs modifiés génétiquement pourraient donc devenir un avantage considérable pour l'industrie porcine. Cependant, le VSRRP est un virus ayant un haut taux de mutation et il serait possible que celui-ci soit capable éventuellement de s'adapter aux porcs ne possédant pas de récepteur CD163. De plus, le VSRRP induit habituellement de l'ECP dans les cellules qu'il infecte comme les MARC-145 et les PAM [11, 12]. Or, il n'en cause pas dans les NPTr-CD163. Ceci pourrait être causé par plusieurs facteurs. Nos hypothèses sont donc que le VSRRP peut s'adapter à des cellules NPTr sans récepteur CD163 et que les NPTr-CD163 sont mieux adaptées pour survivre à l'infection au VSRRP que les MARC-145. Plus précisément, nos objectifs sont de déterminer la capacité d'adaptation du VSRRP à une lignée cellulaire n'ayant pas le récepteur CD163 et de déterminer les gènes surexprimés lors d'une infection par la souche IAF-Klop dans les cellules MARC-145 et NPTr-CD163 par séquençage à haut débit (RNA-seq). Afin de répondre au premier objectif, il est nécessaire de déterminer la répllication du virus produit sur différentes quantités de cellules ayant le récepteur CD163 par titration. Par la suite, il est nécessaire de déterminer la présence de virus dans des cellules ayant ou n'ayant pas le récepteur CD163 par immunofluorescence en co-marquage (VSRRP et CD163). Afin de répondre au deuxième objectif, le séquenceur MiSeq de la compagnie Illumina a été utilisé afin de séquencer les ARNm des deux lignées cellulaires infectées et non-infectées par le VSRRP. Les résultats obtenus ont démontré que les deux lignées cellulaires avaient un patron de gènes surexprimés différents lors de l'infection. Dans les MARC-145, comme déjà montré dans la littérature, des gènes pro-apoptotiques et pro-survie étaient surexprimés puisque l'apoptose des cellules infectées ne serait déclenchée qu'à 48 heures p.i.[13]. Dans les NPTr-CD163, des gènes pro-survie et pro-apoptotiques sont aussi surexprimés. En revanche, une plus grande quantité de gènes pro-survie se retrouvent dans les 10 gènes et transcrits les plus surexprimés. De plus, moins de gènes et de transcrits sont modulés

lors de l'infection virale dans les NPTr-CD163 comparativement chez les MARC-145 infectées, démontrant ainsi que les NPTr-CD163 sont probablement mieux adaptés à l'infection virale.

Chapitre I : Revue de la littérature

1. Syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP)

1.1 Historique

Au cours des années 1980, une maladie mystérieuse sévissait dans l'industrie porcine, causant beaucoup de pertes économiques [1]. Plus précisément, le syndrome a été identifié pour la première fois aux États-Unis en 1987 et en Europe en 1990 [14]. Au Canada, la présence d'anticorps contre son agent étiologique a tout d'abord été observée dans l'est du pays suggérant ainsi que l'est du Canada ait été la première zone affectée par ce syndrome [15].

1.2 Symptômes

Le syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) est une maladie de grande envergure dans l'industrie porcine. Au niveau du système reproducteur, il peut causer des avortements, une momification des fœtus et des mort-nés. Les porcelets atteints montrent une mauvaise condition, de la diarrhée, de la dyspnée et une mortalité élevée. Chez la truie, il peut causer un retard du retour en chaleur [16]. Les symptômes respiratoires atteints les porcs de tous âges, mais sont plus sévères chez les porcelets en pouponnière et en début d'engraissement généralement âgés de 1 à 4 mois. On observe des pneumonies interstitielles avec zones de nécroses multifocales [16]. L'agent pathogène causant cette maladie peut se retrouver dans l'air sous forme d'aérosol et ainsi entrer dans les voies oro-nasales d'autres porcs[6].

1.3. Impact économique

Le SRRP est le syndrome causant le plus de pertes au niveau monétaire dans l'industrie porcine en Amérique du Nord. Aux États-Unis, les pertes sont estimées à 664 millions de dollars américains par années [17], tandis qu'au Canada des pertes d'environ 120 millions de dollars

canadiens sont enregistrées annuellement. Il est à noter que les pertes annuelles au Canada peuvent atteindre 219 millions de dollars canadiens [18]

2. Virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP)

2.1 Agent étiologique

Ce n'est qu'en 1991 que l'agent étiologique, le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP), a été identifié après que deux souches aient été isolées simultanément aux États-Unis et aux Pays-Bas [19, 20]. Les deux souches proviendraient d'une seule et même souche qui aurait évolué différemment sur les continents européen et américain. L'hôte de ce virus est le porc, aucun autre hôte n'a été répertorié [3], à l'exception d'une démonstration en laboratoire que le virus pouvait s'adapter à des hôtes aviaires [21]. Le VSRRP est un virus enveloppé, ayant un diamètre d'environ 55 nm. La structure de sa capsid est contestée. Certaines études disent qu'elle est icosaédrique [15, 22, 23]. Par contre, Spilman et al. (2009), démontrent qu'il s'agirait plutôt d'une forme sphérique et d'une structure hélicoïdale [24]. Son génome, d'une longueur entre 15 et 15,5 Kb, est sous forme d'ARN simple brin à polarité positive [24]. Sa réplication nécessite donc une ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) responsable de sa grande variation génétique. L'extrémité 3' de son génome comporte une queue poly-A et une coiffe se retrouve à l'extrémité 5'. Il est divisé en, au moins, 10 cadres de lectures (ORFs) dont deux, l'ORF1a et 1b, codent pour des protéines non-structurales et 8, l'ORF2a, 2b, 3, 4, 5, 5a, 6 et 7, pour des protéines structurales [3]. Ces protéines structurales peuvent se retrouver dans l'enveloppe virale, comme c'est le cas avec la glycoprotéine 2a (GP2a), la protéine E, la glycoprotéine 3 (GP3), la glycoprotéine 4 (GP4), la glycoprotéine 5 (GP5) et la protéine de la matrice (M). La protéine de la nucléocapside (N) quant à elle se retrouve liée au génome donc au niveau de la nucléocapside. La protéine GP3 peut aussi être sécrétée sous forme soluble à partir des cellules infectées par le VSRRP [25] (Figure 1.)

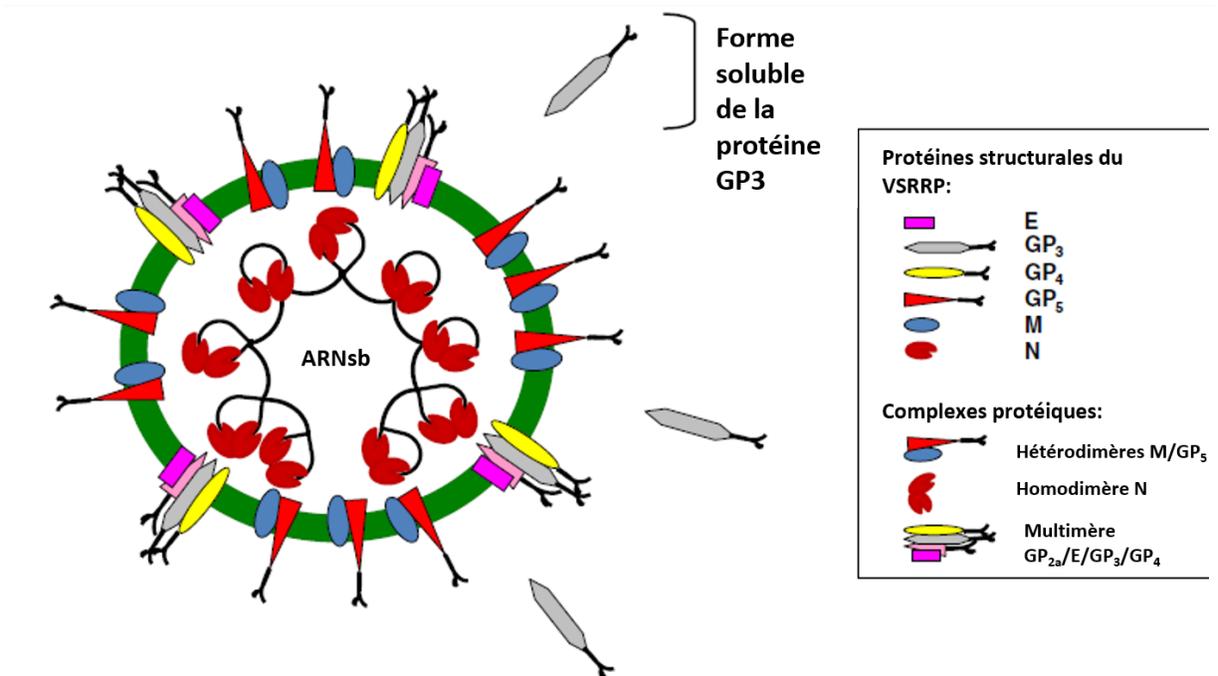


Figure 1. Représentation schématique d'une particule virale du VSRRP avec l'ARN simple brin (sb) et les protéines structurales le composant. En vert est représentée l'enveloppe virale et au centre le génome à ARN simple brin à polarité positive. Adapté de Music et al, 2010 [25].

2.2 Classification

Le VSRRP est classé dans l'ordre viral *Nidovirales*, famille *Arteriviridae* et du genre *Porarterivirus* avec deux autres virus: le virus augmentant la lactate déshydrogénase et l'artériverus du rat de type 1 [2]. Le VSRRP est divisé en deux types ou génotypes: le type 1 (ou anciennement Européen) qui comprend la 1^{ère} souche isolée au monde, soit la souche de référence Lelystad et le type 2 (ou anciennement Nord-Américain) qui comprend la souche de référence québécoise IAF-Klop et la souche de référence nord-américaine ATCC VR-2332. Le VSRRP de type 1 est principalement retrouvé en Europe, mais certaines souches ont été identifiées aux États-Unis. Quant à lui, le VSRRP de type 2 se retrouve principalement en Amérique du nord et en Asie [4], mais ce type se retrouve également en Europe [5]. En Asie, on retrouve des sous-types hautement pathogènes. Puisqu'il possède un génome sous forme d'ARN, le VSRRP varie beaucoup d'une souche à l'autre, pouvant varier de 40% entre le génome du type 1 et celui du type 2 [3]. Seulement au sein du type 2, les génomes de différents

cas cliniques peuvent avoir 22% de différence nucléotidiques (données non-publiées). Cette grande variation génétique vient donc rendre potentiellement difficile le développement d'un vaccin efficace contre plusieurs souches du même type.

2.3 Réplication virale

Il y a deux phases d'infections: une première où le virus est peu produit et peu de cellules sont infectées et une seconde où il y a dispersion du virus d'une cellule à une autre, augmentant ainsi considérablement le nombre de cellules infectées [11]. Lors de ces deux phases d'infection, le génome viral est répliqué et traduit afin de produire les protéines virales pour lesquelles elles codent. L'ORF1a/b a une façon particulière d'être transcrit et traduit. Il est transcrit et traduit en une seule chaîne peptidique, nommée polyprotéine (Pp), qui sera par la suite clivée en plusieurs protéines non-structurales. Il possède aussi deux changements du cadre de lecture ribosomal (RFS) à la position 3889 du génome (ce qui donne le -1RFS1) et l'autre à la position 7895 du génome (ce qui donne le -2RFS2) [3]. L'ORF1a code pour plusieurs protéines, la transcription de ce dernier est donc faite d'un seul trait, donnant une seule polyprotéine appelée pp1a (Figure 2a) [26]. Afin d'obtenir des protéines non-structurales distinctes à partir de l'ORF1a, la polyprotéine est coupée par quatre protéases virales: la protéinase « papaine-like cystéine 1 α » (PLP1 α), la « papaine-like cystéine 1 β » (PLP1 β), la « papaine-like cystéine 2 » (PLP2) et la sérine protéinase (SP) [3]. La PLP1 α clive entre les protéines nps1 α et nsp1 β . La protéinase PLP1 β , quant à elle, clive entre nsp1 β et nsp2. Pour les deux protéinases restantes, PLP2 et SP, elles clivent respectivement entre les protéines nsp2 et nsp3 et entre toutes les protéines non-structurales restantes, donc de 3 à 12 (Figure 2). Récemment, un nouveau RFS a été découvert. Ce nouveau RFS donnerait deux variants de la protéine nsp2, soit nsp2TF et nsp2N [27, 28]. Ces deux formes de la protéine non-structurales nsp2 auraient d'ailleurs pour impact d'inhiber la réponse immunitaire innée de l'hôte [28]. L'occurrence approximative des RFS est de 6 à 7% pour le -1RFS de la protéine nsp2 et 16 à 20% pour le -2RFS [27]. Pour ce qui est du RFS permettant la transcription de l'ORF1b, et donc les protéines nsp9 à 12, l'occurrence approximative est d'environ 15% [3].

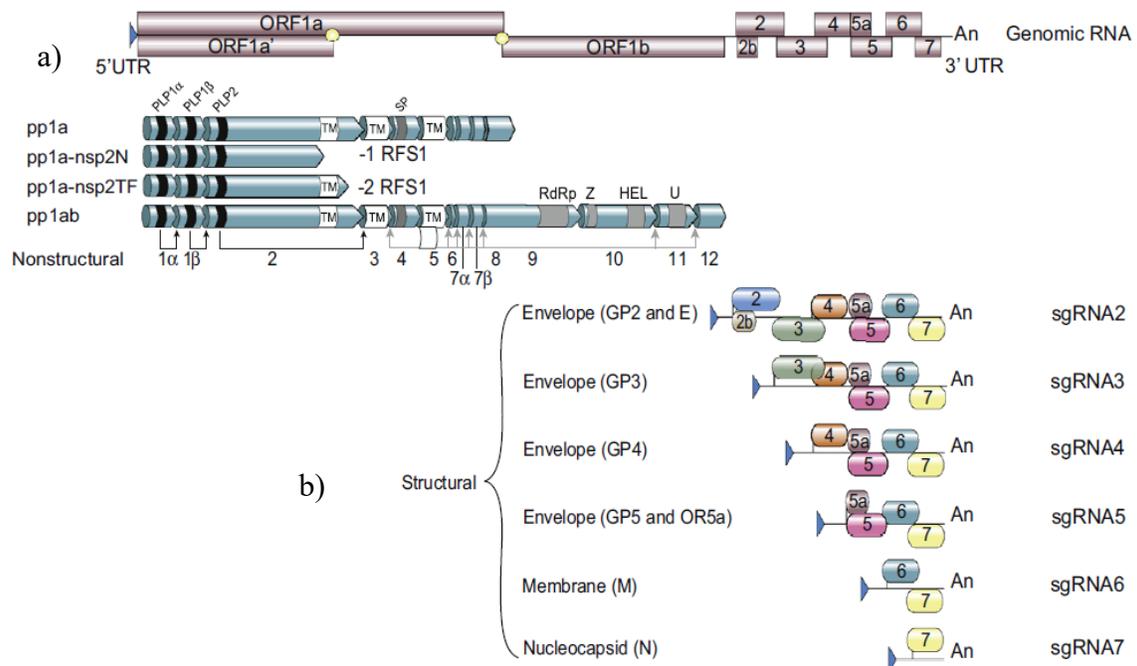


Figure 2. Schématisation de la réplication du génome du VSRRP. En « a » est représentée la réplication des protéines non-structurales et en « b » celles des protéines structurales. Modifié de Kappes et al, 2015 [3].

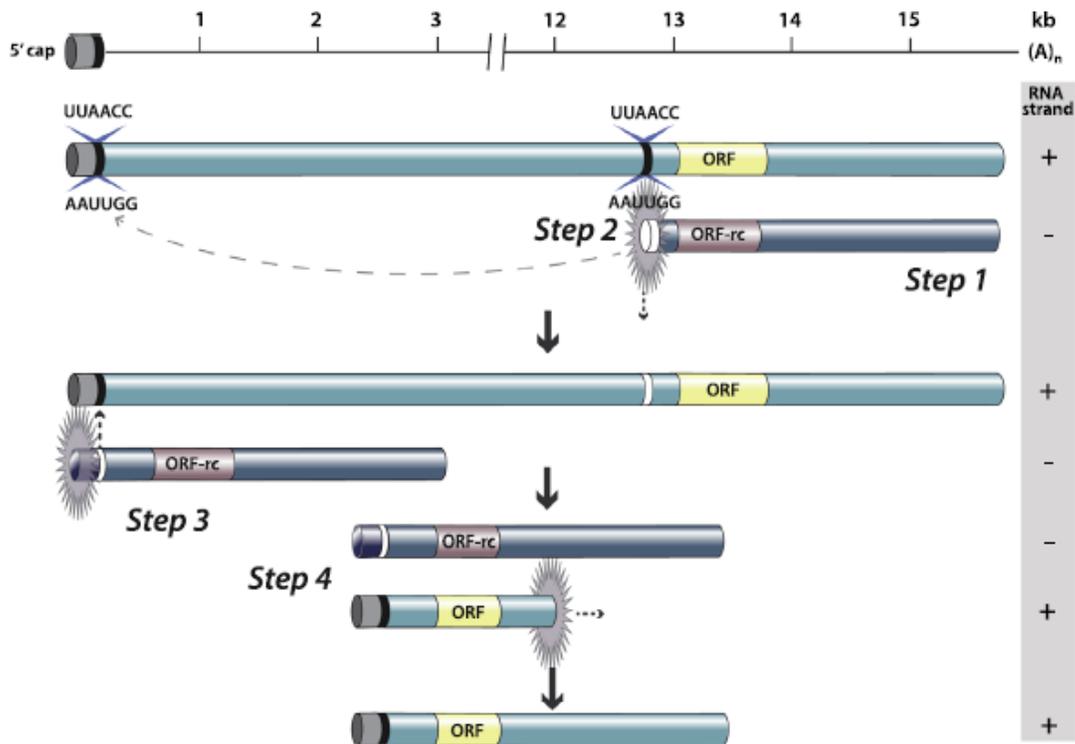


Figure 3. Transcription du brin d'ARN négatif permettant la réplication et la traduction des ORF2a à 7. Modifié de Kappes et al, 2015 [3].

Au niveau des protéines structurales, donc de l'ORF2a à 7, la transcription et la traduction se font à l'aide d'un mécanisme d'ARN subgénomiques (ARNsg) discontinu. Ce mécanisme est répandu chez tous les virus de la famille *Arteriviridae* [29] (Figure 2b). Plus précisément, ce type de mécanisme s'effectue par la liaison de séquence de régulation de la transcription (TRS). Chez le VSRRP, cette séquence est « UUAACC » (Figure 3). Un TRS est situé à l'extrémité 5' du génome et d'autres sont situés au début de chaque ORF. Le TRS de l'extrémité 5' se lie ensuite à l'ORF à transcrire, ce qui permettra l'initiation de la transcription de l'ARNm en un brin d'ARN à sens négatif. À partir de ce brin négatif composé du TRS en 5' et de l'ORF, un brin positif est synthétisé. C'est ce brin qui servira à la traduction et ainsi à la production de la protéine structurale qu'il encode [3]. L'ARNsg 2, codé par l'ORF2a/b, code donc pour les protéines structurales GP2 et E. Les deux ARNsg suivants (ORF3 et 4) codent pour les protéines structurales GP3 et GP4. L'ARNsg 5 (ou ORF5 et 5a) code respectivement

pour les protéines GP5 et pour GP5a [3]. L'ARNsg 6 et 7 (ORF6 et 7), codent pour les protéines M et N, respectivement.

2.4 Réponse du système immunitaire dirigée contre le VSRRP et modulation par ce dernier

Le VSRRP est connu pour moduler le système immunitaire de l'hôte qu'il infecte [30]. Si l'hôte a déjà été infecté par le virus, il y a la reconnaissance de l'agent pathogène par des anticorps. Plusieurs protéines structurales et non-structurales sont ciblées par les anticorps de l'hôte. Dans les protéines non-structurales, trois sont particulièrement ciblées par les anticorps induits de l'hôte infecté: nsp1, nsp2 et nsp7 [31]. Dans les protéines structurales, la première à être ciblée par les IgG est la protéine N, suivi de la protéine M et de GP5.

Les protéines virales ont aussi un impact sur la réponse immunitaire innée. Par exemple, selon Gao et al. (2014), la protéine GP5 du VSRRP induirait la production d'interféron- β (IFN- β) dans les cellules MARC-145 [32]. Cet interféron inhiberait ensuite à son tour la réplication du VSRRP. À l'opposé, Chen et al. (2010) ont démontré que les protéines nsp1 α et nsp1 β avaient pour effet d'inhiber la production d'INF- β dans cette même lignée cellulaire [33]. La reconnaissance d'un pathogène par les macrophages diminue la signalisation de mTOR, ce qui entraînerait un blocage de la transcription du génome viral par la coiffe virale [26]. Ceci entraînerait par la suite une production de cytokines inflammatoires qui vont permettre l'activation de plusieurs autres voies de signalisation, dont celles liées à la régulation de la mort cellulaire [34]. Une production d'IFN- γ peut aussi être observée chez des porcs infectés par le VSRRP [35]. Zhang et al. (2012) ont démontré que le VSRRP inhibait la production d'interféron- α (IFN- α) [36]. Ce qui pourrait être une explication à l'activation tardive de la réponse immunitaire adaptative. Le VSRRP inhiberait l'IFN- α en activant la voie de signalisation PI3K/Akt. Par contre, ceci va à l'encontre d'autres études [37, 38] qui supportent que le VSRRP n'a aucun effet sur l'IFN- α . Tout de même, en support à ce que Zhang et al. (2012) auraient démontré, certaines protéines non-structurales du VSRRP ont pour effet

d'inhiber l'immunité innée de la cellule [36]. En effet, une étude datant de 2017 a démontré que la protéine nsp2 aurait pour effet d'inhiber l'IFN- α . Les deux produits obtenus après le glissement ribosomal, nsp2TF et nsp2N, auraient aussi cet effet [28]. L'inhibition des interférons par le VSRRP pourrait être contrée par une molécule promouvant la surexpression de ceux-ci, la saponine-quil A [39]. La saponine-quil A est un adjuvant utilisé dans le milieu vétérinaire [40]. Cette molécule pourrait donc éventuellement être utilisée *in vivo* pour contrer l'impact du VSRRP sur la voie des interférons. Une autre protéine non-structurale virale, la nsp1 α , aurait elle aussi pour effet de moduler l'induction de la voie des interférons par l'entremise du facteur nucléaire κ B (NF κ B) [41]. La protéine non-structurale nsp1 α causerait aussi une augmentation de CD83 qui est un marqueur des cellules dendritiques [42]. Par contre, les mécanismes d'action exacte de la protéine nsp1 α sur NF κ B et sur la production de CD83 ne sont pas encore bien caractérisés. Une infection par le VSRRP augmenterait aussi la production d'IL-15 [43]. L'IL-15 est une molécule essentielle à l'activation et la prolifération des cellules NK et pour l'activation et la survie des cellules CD8 $^{+}$ et CD4 $^{+}$ [44]. Selon Fu et al. (2012), ce serait la protéine N du virus qui aurait pour effet d'activer la voie du facteur nucléaire NF κ B qui a ensuite un impact sur la production d'IL-15 [43]. Le VSRRP est aussi connu pour avoir un impact sur la réponse au stress du réticulum endoplasmique. En effet, selon Chen et al. (2018), l'infection par le VSRRP augmenterait l'accumulation de protéines mal repliées (UPR) par la surexpression de la phosphorylation de la protéine elf2a par la protéine kinase ER kinase à ARN-like (PERK) [45]. La protéine homologue augmentant la liaison à la séquence CCAT, CHOP, qui est une protéine ayant plusieurs fonctions dans la réponse au stress du réticulum endoplasmique [46], serait aussi surexprimée lors de l'infection par le VSRRP dans les PAM et les AM Φ . Il a aussi été démontré par ces chercheurs que la voie IRE1-TRAF2 était surexprimée dans les AM Φ et les PAM. Il est donc possible de déduire que le virus a un impact à plusieurs niveaux sur le fonctionnement de la cellule.

3. Entrée du virus dans la cellule

3.1 Récepteurs impliqués dans l'entrée du virus du SRRP

Ce virus a besoin de plusieurs récepteurs afin d'entrer dans une cellule. Comme représenté à la Figure 4a, la première étape est la liaison entre le récepteur cellulaire, l'héparane sulfate et le complexe protéique de l'enveloppe virale, GP5 et M. Ce complexe protéique se liera aussi à la sialoadhésine qui est le deuxième récepteur cellulaire utilisé par le VSRRP (Figure 4b). Il y a plusieurs types de sialoadhésine. Celui identifié comme permettant l'entrée du virus est SIGLEC-1, mais récemment SIGLEC-10 a été ajouté à ce groupe [47]. Cette liaison permettra le recrutement de tri-squelette de clathrines qui formeront un endosome de clathrines. C'est à ce moment que le virus serait internalisé dans la cellule (Figure 4c). Pour terminer, un dernier récepteur cellulaire est nécessaire : le récepteur CD163. Son mécanisme d'action est peu connu, par contre il a été démontré que les protéines virales GP2 et/ou GP4 interagissent avec ce récepteur (Figure 4c). En plus de cette liaison, des protéases cellulaires vont diminuer le pH de l'endosome, ce qui va induire la décapsidation du virus. Selon Gao et al. (2016), la protéine cellulaire MYH9 serait importante dans l'internalisation du virus en interagissant avec la protéine virale GP5 [48]. Cependant, l'étape exacte à laquelle la protéine MYH9 serait essentielle n'a pas été clairement identifiée et ces résultats n'ont pas été confirmés par d'autres études.

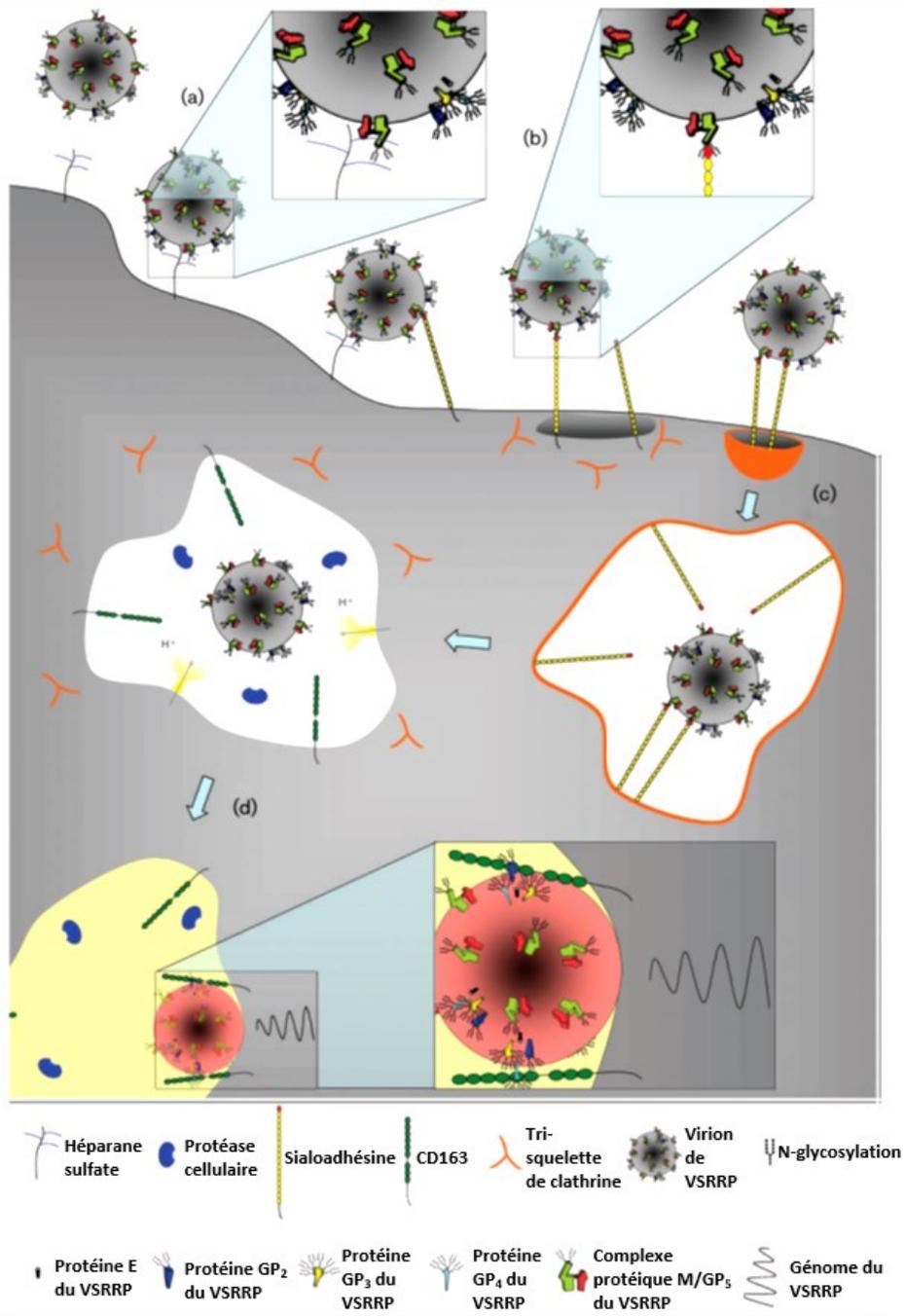


Figure 4. Entrée du virus SRRP dans un macrophage primaire porcine. En a) est démontré l'attachement des particules virales à l'héparane sulfate et en b) à la sialoadhésine. En c) est représenté l'internalisation de la particule virale à l'aide des tri-squelettes de clathrine. En d) est démontré la liaison au récepteur CD163 et la décapsidation de la particule virale. Modifié de Van Breedam et al, 2010 [6].

3.2 Importance du récepteur CD163 dans l'entrée du virus

Le récepteur CD163 est essentiel à l'infection virale. Il a été démontré que la transfection du récepteur dans des cellules non permissives au VSRRP les rendait permissives [7]. Le récepteur CD163 est un récepteur de la famille des récepteurs éboueurs riches en cystéines. Son rôle dans la cellule est d'agir en tant que récepteur « éboueur » se liant aux complexes hémoglobine-haptoglobine afin de les éliminer [49]. Ce récepteur serait aussi lié au système immunitaire inné puisque la liaison aux complexes hémoglobine-haptoglobine augmenterait la production d'interleukine-10 (IL-10) [8]. Ce récepteur est divisé en neuf domaines de récepteurs éboueurs riches en cystéine, SRCR (Récepteur éboueur riche en cystéines), deux interdomaines et un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique. Le domaine SRCR 5 serait le domaine où les protéines virales GP2 et GP4 se lient, permettant ainsi l'entrée du virus dans la cellule [10]. Van Gorp et al. (2009), ont démontré que le récepteur CD163 servait à la formation de l'endosome et à la décapsidation du génome viral par la suite [50]. L'abondance du récepteur joue beaucoup sur la capacité d'infection par le VSRRP. Wang et al. (2018) ont démontré qu'avec moins de 20% de récepteurs CD163, une cellule n'était pas permissive au virus [51].

3.3 Modification du récepteur CD163 chez les porcs

Il a été démontré qu'en remplaçant le domaine SRCR 5 du récepteur pour le domaine 8 du récepteur CD163 humain (CD163L) chez des porcs, ceux-ci devenaient résistants au VSRRP de type 1, mais pas au type 2, suggérant ainsi que les deux types de VSRRP utilisent probablement des domaines différents du récepteur [7]. Une invalidation génique complète du récepteur CD163 rend par contre les porcs résistants aux deux types de VSRRP sans changer leur phénotype [9, 52].

4. Mort cellulaire

4.1 Apoptose

4.1.1 Mécanismes de l'apoptose

Il existe plusieurs types de morts cellulaires et l'un de ceux-ci est l'apoptose. Il y a deux types d'apoptose: une avec caspase et l'autre caspase indépendante [53]. Les deux voies de signalisation sont inhibées par Bcl-2 [54]. Les causes de l'enclenchement de ce processus peuvent être soit intrinsèques, extrinsèques ou par le relâchement de granules cytotoxiques. Par exemple, une activation par le relâchement de Granzyme B est du troisième type d'activation mentionné précédemment. Les Granzyme B sont des molécules relâchées par le système immunitaire à l'encontre d'un pathogène ou d'une cellule infectée par un pathogène intracellulaire tel qu'un virus [55]. Pour l'enclenchement de la voie par des facteurs extrinsèque ce fait par l'activation du récepteur à ligand Fas suite à sa liaison à des facteurs externes induisant l'apoptose. Dans ces facteurs il est possible de retrouver la liaison à un lymphocyte T cytotoxique (Figure 5). Le type intrinsèque est lié au relâchement de cytochrome C dans le cytoplasme par les mitochondries [55]. Ces types de stress vont activer la protéine Bax qui entraînera la production de cytochrome C par la mitochondrie dans la double membrane. L'une des molécules importantes au contrôle de l'apoptose est la protéine Bcl-2 qui agit comme un inhibiteur de la production de cytochrome C et d'autres molécules nécessaires à l'apoptose produite par la mitochondrie, les facteurs inducteurs d'apoptose (AIF). À la suite de la production de cytochrome C, il y aura activation du facteur d'activation des peptidases apoptotique-1 (Apaf-1) et ensuite de la pro-caspase 9 qui, avec une molécule d'ATP, entraînera la production d'apoptosome qui est un complexe protéique formé par l'Apaf-1 et deux molécules de la pro-caspase 9 [56]. Les apoptosomes vont activer les caspases initiateuses qui eux activeront les caspases effectrices. Il peut ensuite y avoir deux résultats différents : soit la fragmentation de l'ADN et l'apoptose ou le catabolisme du cytosquelette. Les sources externes visent principalement la réaction de la cellule à la liaison d'un motif moléculaire lié à un pathogène (PAMP) à un récepteur de mort cellulaire. Suite à la liaison du ligand au récepteur de mort cellulaire, les caspases initiateuses sont activées, ce qui va mener à l'activation des

caspases effectrices et aux deux résultats possibles de la voie de signalisation mentionnée précédemment.

4.1.2 VSRRP et apoptose

Des études visant à étudier l'impact du VSRRP sur l'apparition de signes d'apoptose dans les cellules ont été menées dans deux lignées cellulaires distinctes : les MARC-145 et dans les macrophages alvéolaires porcins (PAM). Dans les PAM, le VSRRP empêche initialement la mort de la cellule, mais l'active par la voie de l'apoptose à la fin de l'infection, causant la mort de la cellule [57]. L'apparition de l'apoptose est caractérisée, entre autres, par la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN et l'activation de la caspase 3 dans les PAM. Dans les MARC-145, un phénomène similaire que dans les PAM est observé. La mort cellulaire serait aussi causée par l'entremise des mitochondries. Concrètement, le virus causerait un dérèglement du fonctionnement de celles-ci en augmentant le taux de formes réactives de l'oxygène (ROS) [58]. Il y a aussi des activités anti-apoptotiques avant 48 heures p.i. Par contre, après 48 heures p.i, des signes d'apoptose sont observés. Lorsque l'apoptose est enclenchée, le mécanisme prend 30 à 60 minutes pour tuer la cellule [59]. La caspase 3 ne serait pas surexprimé à 48 heures p.i. dans les MARC-145 comparativement aux PAM. Labarque et al (2003) suggèrent que les virus utiliseraient l'apoptose de la cellule pour échapper à l'immunité humorale [60]. Le VSRRP induit aussi la translocation de NFκB ainsi qu'une augmentation de sa liaison avec l'ADN dans les MARC-145 et dans les PAM. En fait, les virus *artérovirus* en général dégradent le facteur NFκB qui lui a un impact sur l'apoptose [61]. Plusieurs protéines structurales et non-structurales du VSRRP induisent l'activation de l'apoptose. Tout d'abord, la protéine E encodée par le gène ORF2b serait responsable d'une surexpression de la caspase 3 lors de l'infection [62] (Figure 5). La protéine nsp4 causerait quant à elle une inhibition de la protéine Bcl-2 qui est elle-même un inhibiteur de l'apoptose en inhibant le cytochrome C [13] (Figure 5). Finalement, le facteur p53 serait surexprimé lors de l'infection par le VSRRP. Par contre, le mécanisme d'action exact du virus n'est pas connu [63] (Figure 5). Aussi, Wang et al. (2016) ont démontré que la protéine nsp1α du VSRRP est capable d'inhiber l'apoptose au début de l'infection [57]. Le mécanisme d'action serait que la protéine nsp1α entraînerait la surexpression de la protéine murine double

minute 2 (mdm2) qui aurait pour effet de promouvoir la dégradation de p53. Par contre, en fin d'infection, p53 serait lui-même surexprimé. L'effet du VSRRP sur l'activation ou l'inhibition de l'apoptose serait donc dépendant du temps p.i.

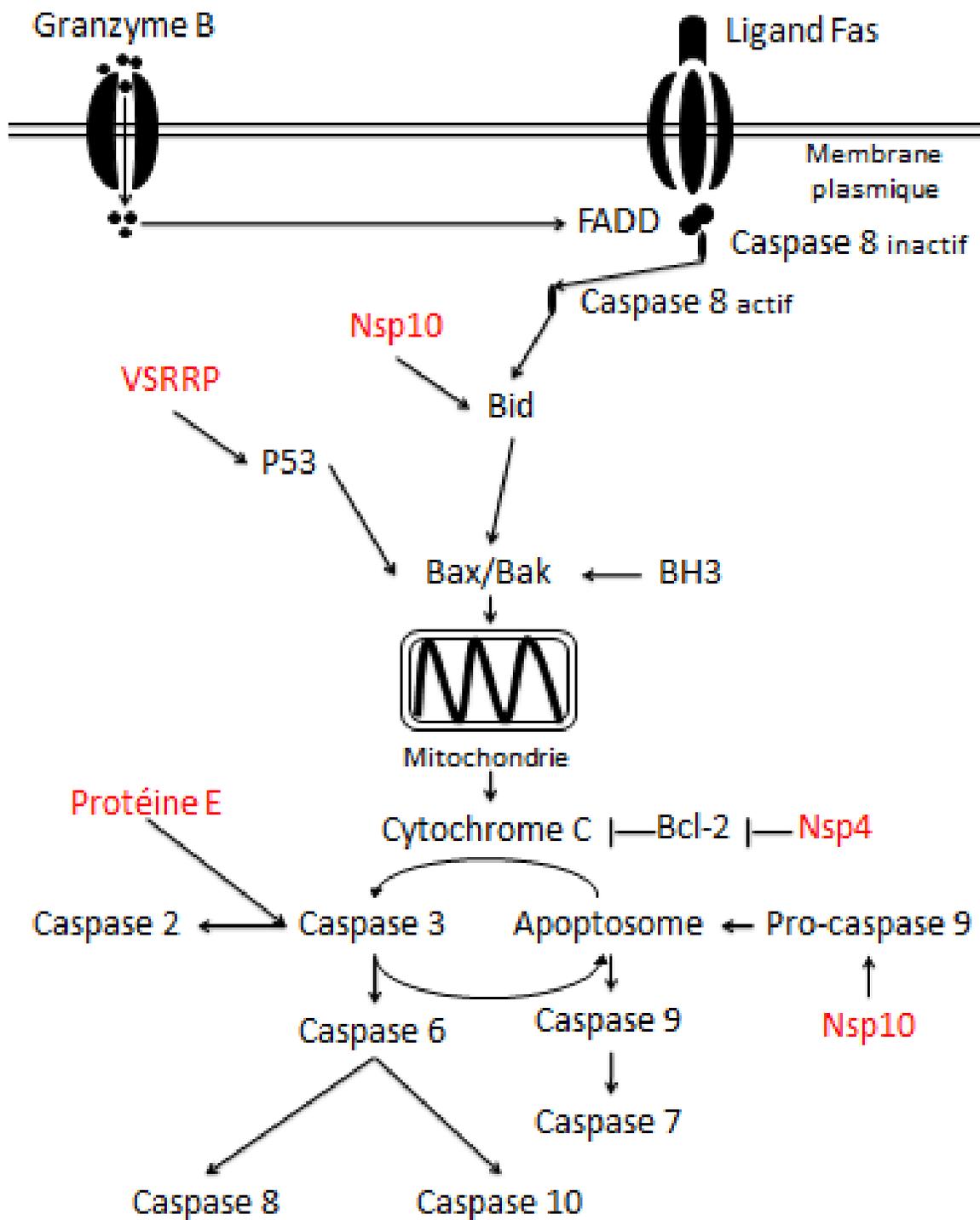


Figure 5. Représentation de la voie de signalisation de l'apoptose par l'activation des caspases et l'impact de certaines protéines du VSRRP sur cette voie. En rouge sont les protéines du VSRRP ayant un impact sur la modulation de la voie. Réalisé à partir de Logue et al., 2008; Yuan et al., 2016; Pujhari et al., 2016; et Huo et al., 2013 [13, 55, 62, 63].

4.2 Nécrose et nécroptose

4.2.1 Mécanismes de la nécrose

La nécrose peut être enclenchée par des dommages à la membrane cellulaire, brisant ainsi l'homéostasie de la cellule. Concrètement, ces dommages vont avoir pour effet de faire entrer des ions de calcium et de l'eau dans la cellule. Le bris de la membrane entraîne aussi la sortie d'une partie du contenu cellulaire qui ira endommager les cellules avoisinantes [64]. Cependant, il n'y a pas de voie de signalisation précise de la nécrose et il est donc difficile d'évaluer son activation ou son inhibition en regardant la surexpression ou la sous-expression de certains ARNm. C'est pour cette raison que c'est la voie de signalisation de la nécroptose qui sera étudiée lors du séquençage des ARNm.

4.2.2 Mécanismes de la nécroptose

La nécroptose, aussi appelée nécrose programmée, est une voie de signalisation cellulaire enclenchant la mort cellulaire qui résulte en un bris de la membrane cellulaire [65]. La différence avec la nécrose est que la nécroptose est régulée avec des voies de signalisations spécifiques. Elle est enclenchée par l'apparition de stimuli pro-nécroptotiques tels que, les facteurs de nécrose tumorales (TNF), de l'ARN double brins, des lipopolysaccharides, des ligands Fas, des récepteurs de type toll (TLR), etc. Un point tournant de cette voie est la formation du complexe RIPK1 et RIPK3 qui sert de marqueur à la voie de la nécroptose. La suite de cette voie est aussi médiée par une autre protéine considérée comme marqueur pour cette voie de signalisation, la protéine MLKL (Mixed lineage kinase domain like pseudokinase). Cette dernière est activée lorsqu'elle est phosphorylée par RIPK3 [66]. Une fois activée, MLKL va migrer à la membrane cellulaire où elle induira la formation de pores dans la membrane qui mèneront éventuellement à la mort cellulaire et, par le fait même, à la libération de motifs associés aux dommages dans la cellule (DAMPs) [65]. La régulation de la nécroptose est liée à celle de l'apoptose par l'activation ou l'inhibition de la caspase 8. En effet, une surexpression de la caspase 8 entraîne une inhibition de la nécroptose et une activation de l'apoptose. Pour ce faire, il doit y avoir la formation d'un complexe FADD-RIPK1-Caspase 8 aussi nommé

ripososome [65]. Il est donc dans l'avantage des pathogènes d'évoluer afin d'inhiber la surexpression de la caspase 8. En effet, plusieurs virus tels que virus de l'herpès simplex 1 (VHS1) et 2 (VHS2) [67] et le cytomégalovirus [68] ont évolué afin d'inhiber la caspase 8 et ainsi augmenter les chances de survie des cellules afin de pouvoir s'y répliquer [66].

4.2.3 VSRRP et nécrose

Très peu d'études ont vérifié l'impact du VSRRP sur l'apparition de nécrose. Miller et al. (2004) affirment que la nécrose aurait lieu de façon plus importante que l'apoptose lors de l'infection de cellules MARC-145 par le VSRRP [54]. Ils ont démontré que la nécrose débute à partir de 24 heures p.i. Par contre, ils ne spécifient pas quels gènes ont permis de déterminer si l'apoptose ou la nécrose était enclenché. De plus, d'autres articles ont démontré que l'apoptose était en fait enclenché à 48 heures p.i. [13, 58, 61, 69]. Li et al. (2016) ont observé des signes d'apoptose plus tôt, soit à 36 heures p.i. [58]. Costers et al. (2008) ont aussi démontré l'apparition de signes de nécrose dans les cellules MARC-145 et PAM infectées par la souche de type 1, Lelystad [69]. Pour ce faire, ils ont vérifié l'apparition de signes de nécrose après le traitement des cellules avec le Z-VAD-DL-Aps-fluoromethylcetone, un inhibiteur de la caspase 3 et de la caspase 1, nécessaire à l'activation de l'apoptose. Ils ont donc pu observer que dans les PAM, l'inhibiteur empêchait l'apparition des signes de nécrose, indiquant que ceux-ci étaient liés à l'apoptose. Par contre, ils ont pu observer quelques signes de nécrose malgré l'inhibition de l'apoptose à 48 heures p.i., indiquant que d'autres voies de signalisation impliquées dans la mort cellulaire étaient activées en parallèle de celles de l'apoptose [69]. Le lien entre l'infection et l'apparition de nécrose était donc fait par l'absence d'apoptose en utilisant des inhibiteurs de cette voie. Par contre, l'apparition de nécrose pourrait être liée à l'activation de certaines voies de signalisation impliqués dans la modulation de la mort cellulaire telle que la nécroptose.

4.2.4 VSRRP et nécroptose

Le VSRRP, contrairement à plusieurs virus, n'a pas évolué afin d'inhiber la caspase 8. Au contraire, il entraînerait même sa surexpression [13]. Ce qui indiquerait que la nécroptose

pourrait être inhibée au profit de l'apoptose lors de l'infection virale. Par contre, aucune autre étude n'a étudié l'effet d'une infection par le VSRRP sur la voie de signalisation de la nécroptose justifiant que d'autres études sont nécessaires dans ce domaine.

4.3 Autophagie

4.3.1 Mécanismes de l'autophagie

L'activation de cette voie de signalisation peut résulter en la destruction d'organelles et de protéines défectueuses. Pour ce faire, les organelles ou protéines sont enveloppées d'une double membrane afin de former un autophagosome qui se fusionnera à des lysosomes qui détruiront son contenu [70]. Bien qu'elle permette d'éliminer des composantes défectueuses de la cellule, cette voie de signalisation est aussi nécessaire à la sénescence, au développement, à la différenciation et à la survie de la cellule [70]. C'est aussi un mécanisme de défense contre les pathogènes [71]. L'autophagie peut être activée par plusieurs types de stimuli, tels qu'un stress du réticulum endoplasmique, de l'ARN double brin, un stress oxydatif, un manque de nutriments ou l'hypoxie de la cellule [71]. Plusieurs voies de signalisations sont impliquées dans la régulation de l'autophagie, telles que la voie PI3K/Akt, AMPk et les MAPK. L'une des protéines pouvant agir comme marqueur de l'autophagie est la protéine mTOR qui, lorsqu'elle est surexprimée, indiquerait une inhibition de l'autophagie de la cellule [71]. D'autres protéines importantes à la formation des autophagosomes sont les protéines reliées à l'autophagie (ATG). En tout, seize protéines ATG ont été identifiées et chacune d'elles possède une fonction à différentes étapes de l'autophagie [72]. Une en particulier, ATG5, est importante dans les premiers stades de cette voie de signalisation [73]. Mizushima et al. (1998) ont aussi démontré qu'ATG5 se liait à ATG12, une autre protéine nécessaire à la régulation de l'autophagie, afin d'activer cette voie de signalisation. Ces deux protéines sont donc souvent utilisées comme marqueur de l'activation ou l'inhibition de l'autophagie [73].

4.3.2 VSRRP et autophagie

Le VSRRP causerait aussi l'autophagie de la cellule [26, 57, 74, 75]. Sun et al. 2012 pensent quant à eux que l'autophagie est un processus clé dans la réplication du VSRRP [76]. Ils ont, entre autres, co-localisé la protéine virale nsp2 avec la protéine LC3 de la voie de l'autophagie. Leurs résultats indiqueraient aussi que l'autophagie serait enclenchée par un stress du réticulum endoplasmique qui lui serait causé par le VSRRP. Le VSRRP augmenterait aussi la surexpression de mTOR entre 0 et 24 heures p.i. En revanche, la surexpression de mTOR diminuerait après 24 heures. Une infection avec du virus inactivé démontre que l'impact de celui-ci sur mTOR serait lors de son entrée. En effet, le virus inactivé ne peut se répliquer dans les cellules, mais peut tout de même y entrer [26]. Wang et al. (2017), suggèrent quant à eux que la protéine Rab11a, responsable du trafic membranaire lors de l'apoptose, serait nécessaire à l'expression de la protéine nsp2 et à la traduction de l'ORF7 [74]. Par contre, le mécanisme exact de rab11a reste inconnu. Très peu de données démontrant l'activation ou l'inhibition de voies de signalisation liées à la mort cellulaire *in vivo* sont disponibles. Finalement, Wang et al. (2015) ont démontré qu'à la fois l'apoptose et l'autophagie étaient activées dans le thymus des porcs infectés par une souche hautement pathogène asiatique du VSRRP [77].

Chapitre II : Hypothèses et objectifs

1. Problématique

La modification génétique de porcs afin qu'ils ne possèdent pas le récepteur CD163 semble fonctionner pour l'instant et donc cette approche est très prometteuse pour rendre ceux-ci résistants contre le VSRRP. Conséquemment, est-ce que le VSRRP peut s'adapter à un hôte qui ne posséderait pas le CD163? Ce phénomène d'adaptation d'un virus lui permettant d'infecter l'hôte en l'absence de son récepteur cellulaire a déjà été observé chez d'autres virus. Par exemple, le rhinovirus humain a été adapté *in vitro* à des cellules ne possédant pas le récepteur cellulaire ICAM-1 qui est habituellement nécessaire à l'entrée du virus [78]. Par ailleurs, le VSRRP est un virus avec un haut taux de mutations [3] suggérant qu'il pourrait éventuellement s'adapter aux cellules sans récepteur CD163. De plus, le VSRRP cause habituellement la mort des cellules qu'il infecte. De manière surprenante, le VSRRP ne cause pas d'effet cytopathique lors de l'infection dans les NPTr génétiquement modifié pour exprimer le CD163 (NPTr-CD163). Fait important, la production virale n'est pas améliorée ou réduite dans ces cellules.

2. Hypothèses

Nos hypothèses sont les suivantes :

- 1) Le VSRRP peut s'adapter à des cellules n'ayant pas de récepteur CD163 pour réaliser un cycle viral complet de réplication allant de l'entrée du virus jusqu'à la production de particules virales infectieuses ;
- 2) Les cellules NPTr-CD163 sont mieux adaptées pour survivre à l'infection virale.

3. Objectifs

Nos objectifs sont donc les suivants :

- 1) Déterminer la capacité d'adaptation du VSRRP à une lignée cellulaire n'ayant pas le récepteur CD163. Pour ce faire, nous allons déterminer la présence du virus par RT-qPCR sur différentes quantités de cellules ayant ou n'ayant pas le récepteur CD163 en co-culture. Il sera aussi nécessaire de déterminer la réplication du virus par titration sur différentes quantités de cellules ayant ou n'ayant pas le récepteur CD163. Finalement, il faudra déterminer la présence de virus dans des cellules n'ayant ou n'ayant pas le récepteur CD163 par immunofluorescence en co-marquage (VSRRP et CD163) ;
- 2) Déterminer les gènes différemment exprimés lors d'une infection par le VSRRP dans les MARC-145 et les NPTr-CD163. Plus précisément, nous allons identifier les gènes surexprimés lors d'une infection par la souche IAF-Klop dans les cellules MARC-145 et NPTr-CD163 par séquençage à haut débit.

Chapitre III : Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1 Cellules

Pour les différents projets effectués, plusieurs lignées cellulaires ont été utilisées. Il y a tout d'abord les NPTr qui sont des cellules épithéliales de trachée de porcelet (*Sus scrofa*) [79]. Deux variantes de ces cellules ont été utilisées : les NPTr-CD163 et les NPTr-N2. Les cellules NPTr n'expriment pas le récepteur CD163 et ne sont donc pas permissives au VSRRP. Ces cellules ont préalablement été modifiées en laboratoire par l'intermédiaire d'un rétrovirus afin qu'elles expriment constitutivement le récepteur CD163 qui est essentiel à l'internalisation du VSRRP [80]. Les NPTr-N2 sont des NPTr ayant aussi été infectées avec un rétrovirus, par contre la séquence incorporée au génome est non-codante. Ces cellules sont un contrôle négatif de l'incorporation du récepteur CD163 aux cellules NPTr par l'entremise du rétrovirus. Les cellules NPTr-N2 et NPTr-CD163 ont été cultivées dans du milieu *Eagle Minimum Essential Medium* (EMEM) (Wisent, QC, Canada) contenant 10% de sérum fœtal de veau (FBS), 10 U/ml de pénicilline, 10 µg/ml de streptomycine, 250 g/L d'amphotéricine B, 1 mM de sodium pyruvate et 2 mM de L-glutamine (Wisent, QC, Canada).

Il y a aussi les cellules MARC-145 qui sont des cellules de reins de singe de l'espèce *Cercopithecus aethiops*. Cette lignée cellulaire est l'une des plus connues et est le modèle le plus utilisé dans l'étude du VSRRP [81]. Ces cellules ont donc été utilisées afin de titrer et produire le VSRRP et elles sont aussi utilisées à titre de contrôles positifs lors d'expériences d'immunofluorescences. Le milieu utilisé pour cette lignée cellulaire est du EMEM contenant 10% de sérum fœtal de veau (FBS), 10 U/ml de pénicilline, 10 µg/ml de streptomycine, 250 g/L d'amphotéricine B, 1 mM d'HEPES et 2 mM de L-glutamine (Wisent, QC, Canada).

1.2 Virus

La souche de référence du VSRRP utilisée dans le cadre de ce projet est la souche IAF-Klop qui provient d'un cas clinique du Québec survenu dans les années 90 et est un don du défunt Dr. Serge Dea [82]. Ce virus est une souche de type 2 (c.-à-d. le génotype nord-américain) [82].

1.3 Anticorps

Les anticorps primaires utilisés pour marquer les antigènes du VSRRP par immunofluorescence proviennent d'antisérum polyclonal récolté de porcs infectés par notre laboratoire. L'antisérum polyclonal utilisé afin de marquer le VSRRP est utilisé 1/200 [82]. Les anticorps secondaires utilisés sont des anticorps anti-porc couplé à la molécule fluorescente isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne) utilisée 1/250 ou à la rhodamine (Cedarlane, Burlington, Canada) utilisé 1/100. Pour marquer le récepteur CD163, un anticorps primaire monoclonal produit dans les souris anti-pCD163 2A10/11 Rad (AbD Serotec, Oxford, UK) a été utilisé. L'anticorps secondaire anti-souris couplée au FITC a été utilisé 1/100 (ICN Immuno Biological, CA, USA).

2. Méthodologie

2.1 Production du VSRRP

Les virus ont été produits dans des cellules MARC-145. Un flacon de culture cellulaire de 175 cm² de surface contenant des cellules MARC-145 de 80 à 100% de confluence ont été infectées avec 150 à 500 µl de virus SRRP de la souche IAF-Klop préalablement purifié par ultracentrifugation sur gradient de sucrose. Les cellules infectées ont été incubées 3 heures dans 12 ml de milieu EMEM sans FBS contenant 10 U/ml de pénicilline, 10 µg/ml de streptomycine, 250 g/L d'amphotéricine B, 1 mM d'HEPES et 2 mM de L-glutamine sur une plaque agitatrice. Après cette incubation, le milieu a été complété à 25 ml et 2% de FBS ont été ajoutés. Les cellules ont été congelées à -80°C lorsque 30 à 50% des cellules démontraient un effet cytopathique

(ECP) provoqué par l'infection virale. Deux ou trois cycles de gels/dégels ont été effectués afin de briser les cellules et libérer les virions. Le milieu a ensuite été centrifugé 30 minutes à 4000 x g dans une centrifugeuse Thermo Fisher Sorvall™ Legend™ afin d'enlever les débris cellulaires. Le titre viral contenu dans ce surnageant a finalement été déterminé sur des cellules MARC-145 avec du milieu contenant 2% de FBS. Le titre viral a été déterminé avec la technique de dilution limite et calculé avec la méthode de calcul de Kärber sur la base de l'apparition de ECP [83].

2.2 Titration du VSRRP

Comme mentionné précédemment la titration des virus est effectuée par la technique de dilution limite et déterminée selon l'apparition d'ECP et par la suite calculée avec la méthode de Kärber. Cette méthode consiste en faire une première dilution du virus de l'ordre de 10^{-1} . Par la suite, des dilutions en série de 1/10 sont effectuées à partir de celle-ci, donnant des dilutions de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} et 10^{-8} . Par la suite, 100 µl de ces dilutions sont appliqués sur des cellules permissives au virus dans une plaque 96 puits qui est ensuite incubées à 37°C de 5 à 7 jours. Finalement, le titre viral a été calculé avec la méthode de calcul de Kärber sur la base de l'apparition d'ECP [83].

2.3 Détection du génome viral par RT-qPCR

L'ARN viral a été préalablement extrait à l'aide du kit « Viral RNA extraction kit » tel que recommandé par le manufacturier (Qiagen, Toronto, Canada). Chaque réaction contenait 5 µl de polymérase Taqman Fast virus 1-step 4x (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) dans un volume final de 25 µl donnant une concentration d'utilisation de 1X. La séquence des amorces utilisées est indiquée au Tableau 1. Finalement, 5 µl d'ARN viral ont été ajoutés à chaque réaction. Le protocole de la réaction de rétro-transcription suivi d'une réaction de polymérase en chaîne quantitative (RT-qPCR) est décrit dans le Tableau 2. Puisqu'il peut y avoir une différence d'une réaction de RT-qPCR à l'autre, les résultats (Cq) obtenus pour chaque échantillon sont normalisés en soustrayant le Cq obtenu à celui du contrôle positif de RT-qPCR

donnant ainsi les ΔCq . Le génome de VSRRP de type 2 de la souche IAF-Klop servant de contrôle positif de RT-qPCR provient d'une production virale purifiée par ultra-centrifugation sur gradient de sucrose et préalablement extrait à l'aide du « Viral RNA extraction kit » tel que recommandé par le manufacturier (Qiagen, Toronto, Canada).

Sens de l'amorce	Séquences nucléotidiques (5' à 3')
Sens	GCTTTCATCCGATTGCGGCAARTGA
Anti-sens	CACCAATGTGCCGTTTRACCGTAGT
Sonde	(6-FAM)TAACCACGCATTTGTCGTCCGGCGT(BHQ1a-Q)

Tableau 1. Séquences des amorces et de la sonde utilisées afin d'amplifier une partie de l'ORF6 du VSRRP par RT-qPCR.

Étapes	Température (°C)	Temps	Répétition
Rétro-transcription	50	5 minutes	1 fois
Première dénaturation	95	20 secondes	
Dénaturation	95	3 secondes	40 fois
Élongation	60	30 secondes	

Tableau 2. Protocole de la RT-qPCR visant à amplifier une partie de l'ORF6 du VSRRP.

2.4 Détection de protéines virales dans les cellules infectées par immunofluorescence indirecte

Les cellules préalablement infectées sont d'abord fixées à l'aide d'une solution 50:50 d'acétone et de méthanol à température pièce pendant 20 minutes. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS sans KCl (137mM de NaCl, 10 mM de phosphate de sodium et 1,8 mM de phosphate de potassium ajusté à un pH de 7,4) Un autre lavage de PBS sans KCL est effectué avant l'ajout de l'anticorps primaire. L'anticorps primaire porc anti-Klop a été dilué 1 :200 dans du PBS sans KCl et est ajouté sur les cellules fixées et préalablement lavées. Les cellules sont ensuite incubées 2 heures à 37 °C. Les cellules sont ensuite lavées trois fois pendant 5 minutes avec du PBS sans KCl afin d'enlever les anticorps primaires ne s'étant pas liés. L'anticorps

secondaire anti-porc couplé au FITC est ensuite ajouté à une dilution de 1 :250 (Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne). Les cellules sont ensuite incubées 1 heure à 37 °C. Encore une fois, les cellules sont lavées à trois reprises avec du PBS sans KCl pendant 5 minutes afin d'enlever les anticorps secondaires ne s'étant pas liés aux anticorps primaires. Finalement, du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI), une molécule fluorescente s'intercalant dans l'ADN db, est ajouté pour permettre de visualiser les acides nucléiques (c.-à.-d. le noyau des cellules). Lors du double marquage, un anticorps monoclonal de souris anti-porc provenant de la compagnie Bio-Rad (AbD Serotec, Oxford, UK) a été utilisé afin de marquer le récepteur CD163. L'anticorps secondaire utilisé afin de visualiser le récepteur CD163 était un anti-souris couplé au FITC dans une dilution de 1/100 (ICN Immuno Biological, CA, USA). Afin de permettre une visualisation pouvant différencier le récepteur et le virus, un anticorps secondaire anti-porc couplé à la rhodamine est utilisé afin de marquer les protéines virales dans une dilution de 1/100 (Cedarlane, Burlington, Canada).

2.5 Adaptation du VSRRP aux cellules sans récepteur CD163 par passages en co-culture

Comme premier passage, 95% de cellules NPTr-CD163 ont été co-cultivés avec 5% de NPTr-N2 (donc n'ayant pas le récepteur CD163). À chaque passage, des pétris de 60 mm sont préparés pour le passage et des plaques 96 puits sont préparées afin de vérifier l'infection par immunofluorescence. En parallèle à ces co-cultures, un contrôle contenant que des cellules NPTr-CD163 sont préparées afin de comparer le niveau d'infection au fil des passages. Les premiers passages, en co-culture et le contrôle contenant 100% de cellules NPTr-CD163, sont infectées avec la souche IAF-Klop du VSRRP à une MOI (multiplicity of infection) de 0,5. Les infections sont faites de la même façon : le virus est ajouté aux cellules dans 2,5 ml de milieu de culture cellulaire pour les cellules NPTr ; EMEM (Wisent, QC, Canada) sans antibiotiques et sans additifs supplémentaires. Les cellules infectées sont ensuite incubées pendant 4 heures à 37°C. Après cette incubation, 2,5 ml de milieu de culture EMEM contenant 20 U/ml de pénicilline, 20 µg/ml de streptomycine, 500 g/L d'amphotéricine B et 2 mM de sodium pyruvate et 4% de FBS est ajouté aux cellules. Les cellules infectées sont ensuite incubées 5 jours à 37°C avec 5% de CO₂. À 5 jours post-infections, les plaques pour l'immunofluorescence sont fixées

avec une solution 50:50 acétone/méthanol et les infections en pétris sont congelés à -80°C. De deux à trois cycles de gels/dégels sont par la suite effectués afin de s'assurer que les cellules sont bien lysées. Le milieu contenant le lysat des cellules, et donc les virions du VSRRP, est ensuite centrifugés à 4000 x g durant 10 minutes à 4 °C afin d'enlever les débris cellulaires. Le lysat cellulaire, contenant le virus, est ensuite utilisé pour le passage subséquent. Les changements de proportion au fil de ces passages sont de 5%. Le deuxième passage contenait donc 90% de cellules NPTr-CD163 et 10% de cellules NPTr-N2, le troisième ; 85% de cellules NPTr-CD163 et 15% de cellules NPTr-N2, ainsi de suite. Le dernier passage effectué était le dix-huitième et comportait 90% de cellules NPTr-N2 et 10% de NPTr-CD163 (Tableau 3). Des passages en co-culture avec des changements de proportions de cellules NPTr-CD163 et N2 de 10% ont aussi été effectués. Le dernier passage effectué dans ces proportions était le huitième et comportait 80% de cellules NPTr-N2 et 20% de cellules NPTr-CD163 (Tableau 4). Au cours de ce mémoire, les expériences effectuées avec des changements de proportions de 5% à chaque passage seront appelées « 5% » et ceux avec des changements de proportions de 10% seront appelés « 10% ».

Numéro du passage	Pourcentage de cellules NPTr-CD163	Pourcentage de cellules NPTr-N2
1	95	5
2	90	10
3	85	15
4	80	20
5	75	25
6	70	30
7	65	35
8	60	40
9	55	45
10	50	50
11	45	55
12	40	60
13	35	65
14	30	70
15	25	75
16	20	80
17	15	85
18	10	90

Tableau 3. Proportions de cellules NPTr-CD163 et N2 lors de passages en co-culture (5% de variation du ratio par passage).

Numéro du passage	Pourcentage de cellules NPTr-CD163	Pourcentage de cellules NPTr-N2
1	90	10
2	80	20
3	70	30
4	60	40
5	50	50
6	40	60
7	30	70
8	20	80

Tableau 4. Proportions de cellules NPTr-CD163 et N2 lors de passages en co-culture (10% de variation du ratio par passages).

Afin de confirmer s'il y avait une adaptation du VSRRP aux cellules NPTr sans récepteur CD163, des passages ont aussi été effectués sur 100% de cellules NPTr-N2. Le lysat cellulaire provenant d'un passage en co-culture, était dilué 1 :10 sur des pétris contenant des cellules NPTr-N2 pendant 4 heures dans du milieu de culture pour les NPTr, EMEM (Wisent, QC, Canada) sans FBS. Par la suite, du milieu deux fois plus concentré était ajouté afin d'avoir une concentration finale de 2% de FBS et de 10 U/ml de pénicilline, 10 µg/ml de streptomycine, 250 g/L d'amphotéricine B et 1 mM de sodium pyruvate pour les autres nutriments du milieu. Un inoculum de départ était conservé afin de pouvoir comparer la réplication virale par RT-qPCR après l'incubation des cellules. Les cellules infectées ont donc été incubées 5 jours à 37°C avec 5% de CO₂. À 5 jours post-infections, les pétris étaient soumis à deux cycles de gels/dégels, afin de lyser les cellules et libérer le virus. Ensuite, une centrifugation à 4000 x g pendant 10 minutes à 4 °C était effectuée enfin d'enlever les débris cellulaires. Le virus était ensuite titré sur des MARC-145 par la méthode de dilution limite et le calcul de Kärber et une RT-qPCR était aussi effectuée avec l'inoculum de départ et après les 5 jours post-infection afin de vérifier s'il y avait une augmentation de la quantité de génomes viraux après cette incubation.

2.6 Séquençage du génome viral entier du VSRRP

L'ARN des virus a été extrait à l'aide du « ZR Viral RNA kit » (Zymo, Irvine, CA, USA) à partir de 200 µl de lysats cellulaires de NPTr-CD163 infectées par le VSRRP qui ont été clarifiés par centrifugation selon la méthode décrite au point 2.5. Les ARNm viraux ont été isolés à l'aide de billes magnétiques liées de façon covalente à des oligos poly-dT (NEB, Ipswich, MA, USA). La seconde étape est la synthèse d'un brin complémentaire d'ADN par rétro-transcription et immédiatement après, la synthèse d'un deuxième brin d'ADN par réaction de polymérase en chaîne (PCR). Le produit de PCR a par la suite été nettoyé afin d'enlever les réactifs résiduels ayant servi à la réaction de PCR à l'aide de billes liant les plus grands amplicons (Corning, NY, USA). Les produits de PCR plus petits, les enzymes et réactifs utilisés sont donc retirés à l'aide de billes de purification provenant de la compagnie Axygen (Corning, NY, USA). Par la suite, l'ADN double brin a été dosé à l'aide du Qubit Fluorometer 3 (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) et l'ADN double brin été diluée afin d'être à une concentration de 0,2ng/µl. La synthèse de la librairie a été effectuée à l'aide de la technologie Nextera XT (Illumina, CA, USA). Cette technologie consiste en l'ajout d'adaptateurs par l'entremise de transposon. Cette étape permet aussi la fragmentation des brins d'ADN doubles brins obtenus. Après l'ajout des index par Nextera XT, une autre étape de purification des fragments d'ADN indexés a été effectuée (Corning, NY, USA). La qualité des librairies a ensuite été analysée avec le Bioanalyzer en utilisant les puces High Sensitivity DNA (Agilent Technologies, CA, USA). Par la suite, les librairies ont été normalisées à l'aide de billes de normalisation tel que recommandé par le fabricant (Illumina, CA, USA). Avant d'être ajoutées dans la cartouche de séquençage, les librairies ont ensuite été mélangées au PhiX qui est le génome d'un phage augmentant la diversité des bases séquencées dans l'échantillon et qui permet d'estimer le taux d'erreur dans la réaction de séquençage. Une cartouche V3 de 600 cycles a été utilisée pour le séquençage qui a été réalisé à l'aide d'un séquenceur de type MiSeq (Illumina, CA, USA).

2.7 Séquençage des ARNm des cellules infectées par le VSRRP

2.7.1 Infection des cellules MARC-145 et NPTr-CD163 par le VSRRP

La veille de l'infection, 1×10^6 cellules par puits ont été cultivées en plaques 6 puits et 3×10^4 cellules par puits ont été cultivé en plaque 96 puits. Le lendemain, les cellules ont été incubées pendant deux heures avec du milieu EMEM (Wisent, QC, Canada) sans FBS, mais contenant tous les autres additifs (10 U/ml de pénicilline, 10 µg/ml de streptomycine, 250 g/L d'amphotéricine B, 1 mM de sodium pyruvate et 2 mM de L-glutamine) afin de les synchroniser. Elles ont ensuite été infectées à une MOI de 0,5 par du VSRRP et du milieu sans FBS a été ajouté aux cellules infectées. Les cellules ont été incubées 4 heures afin de permettre aux virus de se lier au récepteur cellulaire. Par la suite, le milieu a été retiré et les cellules ont été lavées 2 fois avec du PBS 1X afin de retirer les virus ne s'étant pas liés aux cellules. Du milieu EMEM contenant 2% de FBS et 10 U/ml de pénicilline, 10 µg/ml de streptomycine, 250 g/L d'amphotéricine B, 1 mM de sodium pyruvate et 2 mM de L-glutamine a ensuite été ajouté et les cellules ont été incubées pendant 48 heures à 37 °C avec 5% de CO₂. Après cette incubation, les plaques 96 puits ont été fixées avec une solution de 50:50 d'acétone/méthanol pendant 20 minutes et un test d'immunofluorescence a été effectué afin de s'assurer que le niveau d'infection était comparable dans les deux lignées cellulaires infectées. Pour les cellules en plaques 6 puits, l'ARN total des cellules infectées et non-infectées ont été extraites à l'aide du RNeasy mini kit selon les recommandations du fabricant (Qiagen, Toronto, Canada). En résumé, le surnageant des cultures cellulaires a donc été retiré et 400 µl de solution de tampon de lyse (RLT) ont été ajouté directement sur les cellules. Ces dernières ont ensuite été récoltées et lysées en les vortexant 15 secondes en pulsations. La suite de l'extraction a été effectuée selon les recommandations du fabricant.

2.7.2 Préparation des bibliothèques pour le séquençage des ARNm cellulaires

Une fois l'extraction de l'ARN total effectué à l'aide du mini RNeasy kit (Qiagen Toronto, Canada), la méthode de préparation des bibliothèques est la même que pour le séquençage des virus à certaines exceptions près. Des billes magnétiques liées de façon covalente à des

extrémités poly-dT ont aussi été utilisées afin d'isoler les ARNm. Avant d'être ajoutées dans la cartouche de séquençage, les librairies ont été diluées et mélangées avec 1 µl de PhiX. Les librairies mélangées au PhiX ont ensuite été ajoutées sur la cartouche de séquençage. Les librairies ont été séquencées sur un appareil MiSeq d'Illumina avec des cartouches de séquençages V3 de 600 cycles pour la première réaction de séquençage et de 150 cycles pour la deuxième réaction de séquençage (Illumina, CA, USA).

2.8 Analyses

2.8.1 Statistiques

Des analyses statistiques de type « two way ANOVA » ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 5.03c (San Diego, CA, États-Unis) afin de vérifier s'il y avait une différence significative entre les titres viraux infectieux en culture cellulaire et les résultats de RT-qPCR pour les passages en co-cultures et les passages sur 100% de cellules NPTr-CD163. Une différence entre deux résultats était considérée significative lors de l'obtention d'un $p < 0,05$.

2.8.2 Bio-informatiques

Les données brutes en fichier FastQ ont été téléchargées à partir de la plateforme d'Illumina, BaseSpace (Illumina, CA, USA). L'analyse des données brutes a été effectuée avec le logiciel CLC Genomics Workbench (Qiagen, Toronto, Canada). Les extrémités des séquences des données brutes ont partiellement été coupées afin d'enlever les index et les extrémités des séquences qui sont habituellement de moins bonne qualité. Par la suite, les séquences ont été alignées à leur génome de référence respectif. Pour le séquençage du VSRRP des passages 1 et 18, les lectures ont été alignées avec comme génome de référence une séquence de la souche IAF-Klop provenant de notre laboratoire (séquence non-disponible dans GenBank). Par la suite, la séquence consensus de cet alignement a été extraite. Les analyses effectuées dans le cadre de l'expérience de RNA-Seq étaient différentes. Les séquences des données brutes ont aussi été partiellement coupées tel qu'indiqué précédemment. Ensuite, pour les échantillons de NPTr-

CD163, un alignement avec le génome de référence *Sus scrofa* (Genbank : GCA_000003025,6) a été effectué. Afin de reconstituer les ARNm séquencés, les séquences ont aussi été alignées aux gènes et aux transcrits du génome de référence. Par contre, le génome entier de référence des cellules MARC-145, dont l'espèce est *Cercopithecus aethiops*, n'est pas disponible dans les banques de données publiques. Le génome de référence utilisé pour ces échantillons était donc celui de *Chlorocebus sabaeus* (Genbank : GCF_000409795,2) qui est une autre espèce de singe vert africain et qui est donc potentiellement le plus près de *Cercopithecus aethiops*. Ces analyses ont permis le calcul du TPM (transcrits par millions de kilobase) des résultats obtenus pour chaque alignement obtenu. Le TPM permet quant à lui de normaliser la couverture obtenue de façon à ce que le nombre de transcrits ou de gènes comptés soit comparables dans tous les échantillons. Un compte du nombre de transcrits ou de gènes présents dans chaque échantillon a été effectué lors de cette analyse. Afin d'avoir une plus grande profondeur, les séquences obtenues lors du séquençage de l'extrémité 3' à l'extrémité 5' ont aussi été utilisées. Par la suite, une analyse statistique de type « contre le groupe contrôle » (le groupe contrôle étant les cellules non-infectées) a été réalisée afin de comparer les échantillons infectés par la souche IAF-Klop et ceux non-infectés. Ce type d'analyse permet d'analyser la différence dans l'expression des gènes et des transcrits en comparant à ces deux formes respectives d'annotations. Cette analyse a donc permis de déterminer le «Fold Change » (FC), c'est-à-dire, le nombre de gènes ou de transcrits surexprimés ou sous-exprimés dans les échantillons infectés par rapport aux cellules non-infectés. Cette analyse permet aussi d'avoir une valeur de p « False Discovery Rate » (FDR p) pour chaque gène ou transcrit. Les gènes et transcrits ayant un FDR $p < 0,05$ et un FC ≥ 2 pour les gènes surexprimés ou ≤ -2 pour les gènes sous-exprimés ont été sélectionnés. La liste de gènes et de transcrits obtenus après l'application de ces facteurs limitants a ensuite servi aux analyses plus détaillées dans Uniprot KB [84] et KEGG pathway [85]. Tout d'abord, Uniprot KB permet d'avoir une idée des fonctions de chacun de ces gènes ou transcrits à la condition qu'ils aient été préalablement caractérisés. Les identifiants de chaque gènes et transcrits ont donc été utilisés pour identifier les gènes et transcrits et pour ainsi les caractérisés. Pour ce qui est de KEGG pathway, une liste d'identifiant de gènes ou de transcrits étaient aussi nécessaire. Il fallait aussi spécifier l'espèce dans laquelle KEGG pathway devait chercher les voies de signalisation dans lesquelles les identifiants se retrouvaient.

Chapitre IV : Résultats

1. Adaptation du VSRRP pour sa réplication dans les cellules CD163 négatives

1.1 Réplication du VSRRP dans un système de co-culture NPTr-N2/NPTr-CD163

1.1.1 Quantification des particules virales infectieuses du VSRRP

Au niveau des titres viraux, aucune différence significative n'a été observée entre les titres de VSRRP des passages un à dix-sept (5%) en co-culture avec les passages sur 100% de cellules NPTr-CD163. Au dix-huitième passage, les titres viraux pour les passages en co-culture et avec 100% de cellules NPTr-CD163 étaient significativement différents ($p < 0,001$) (Figure 6a). Le titre du dix-huitième passage en co-culture était de $10^{1,44}$ TCID₅₀/ml en moyenne pour les deux réplicats tandis que le titre pour le passage sur 100% de cellules NPTr-CD163 est de $10^{5,75}$ TCID₅₀/ml.

Pour les passages avec 10% de variation entre cellules avec et sans CD163, une diminution plus rapide et plus prononcée du titre viral a pu être observée au fil des passages en co-culture. Tout comme pour les cellules avec 5% de variation de CD163 par passage, une diminution significative du titre viral a été observée seulement pour le dernier passage ($p < 0,05$), c'est-à-dire le huitième (Figure 6b) dont la moyenne des titres des deux réplicats est de 10^2 TCID₅₀/ml tandis que le titre pour le passage sur 100% de cellules NPTr-CD163 est de $10^{3,5}$ TCID₅₀/ml.

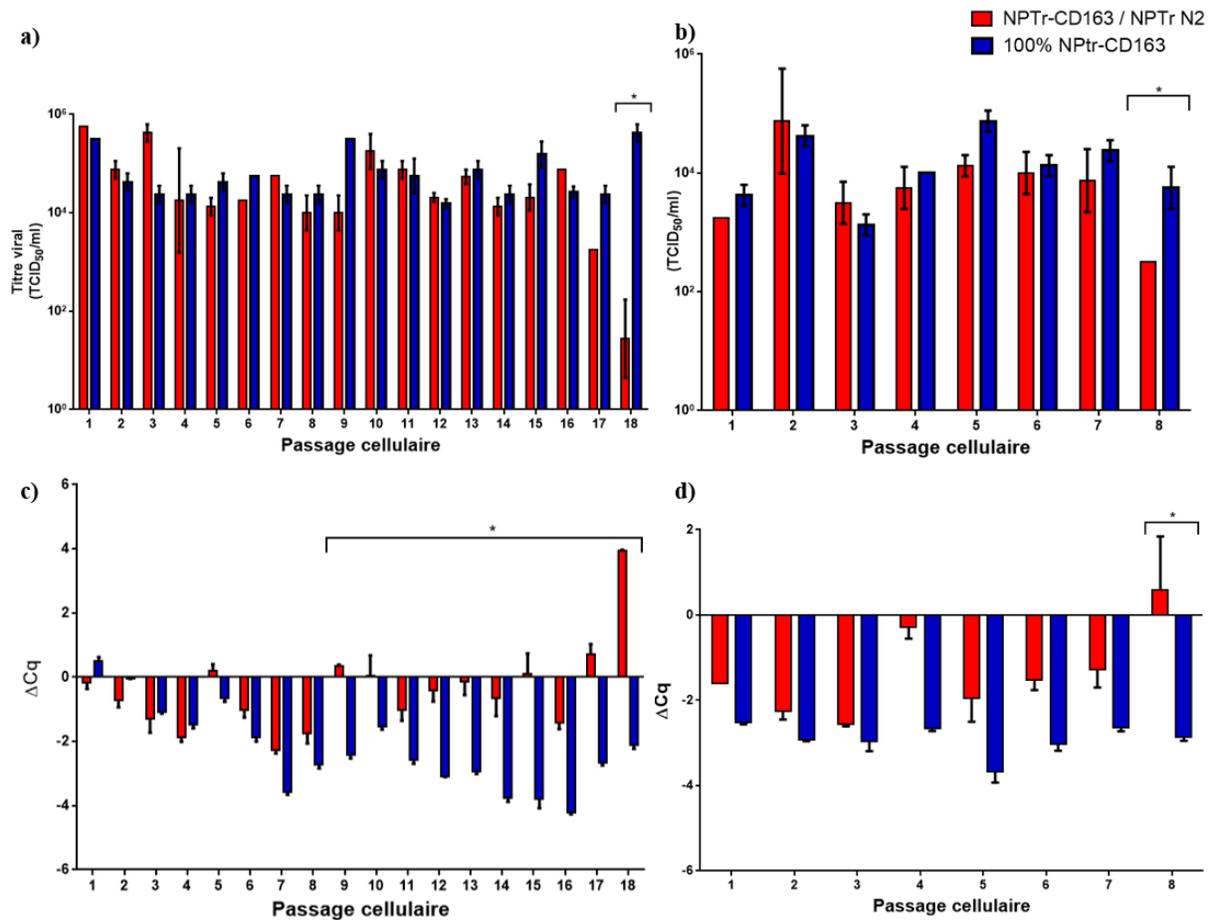


Figure 6. Réplication virale du VSRRP dans les cellules NPTr-CD63 et NPTr-N2 en co-culture. En a) sont les titres viraux obtenus au fil des passages cellulaires contenant toujours 5% moins de cellules NPTr-CD163. En b) sont les titres viraux obtenus au fil des passages cellulaires contenant toujours 10% moins de cellules avec le récepteur CD163. En c) est représentée la différence entre le cycle de quantification (Cq) obtenue en RT-qPCR en ciblant l'ORF6 du VSRRP avec le contrôle positif de la RT-qPCR qui est composé d'ARN viral provenant de virus purifié (ΔCq) au fil de passages cellulaires ayant une différence de 5% de cellules possédant le récepteur. En d) sont les ΔCq lors des passages contenant toujours 10% moins de cellules avec le récepteur CD163. * = $P < 0,05$.

1.1.2 Détection du génome viral par RT-qPCR

Pour les résultats des passages en co-culture ayant un changement de 5% entre les passages, il est donc possible d'observer que du premier au huitième passage, les ΔCq pour les passages en co-culture et sur 100% NPTr-CD163 varient de quelques cycles par passages, mais qu'il n'y a aucune différence significative entre les résultats pour les passages en co-culture et sur 100% de NPTr-CD163 (Figure 6c). À partir du neuvième passage, une différence

significative entre les ΔCq en co-culture et pour 100% de NPTr-CD163 s'est installée jusqu'au dix-huitième passage (Figure 6c). Les Cq obtenus en co-culture restent tout de même élevés, puisque la différence entre les Cq des échantillons et ceux du contrôle positif de RT-qPCR est faible. Par contre, au dix-huitième passage, le ΔCq est devenu très élevé en co-culture (39,33 Cq $p < 0,0001$) comparativement aux autres passages et au contrôle comportant 100% de cellules NPTr-CD163. Ce qui démontre une diminution importante de la charge virale, et donc, de la réplication virale.

Pour ce qui est des passages avec des changements de 10% entre les passages, des résultats similaires ont pu être observés (Figure 6d). Une augmentation du ΔCq et donc une diminution du matériel génétique initial plus drastique a pu être observée au huitième passage en co-culture comparativement aux passages sur cellules 100% permissive. En effet, la différence entre le ΔCq en co-culture et le ΔCq pour le contrôle est devenue significativement différente ($p < 0,01$). Ce qui démontre, ici aussi, une diminution importante de la charge virale, et donc, de la réplication virale.

1.2 Détection de protéines virales par immunofluorescence indirecte dans les cellules infectées

L'IFA a été effectuée à chaque passage autant en co-culture que pour les passages sur 100% de cellules permissives (NPTr-CD163) en double marquage et seulement sur certains passages en triple marquage. L'objectif de l'IFA était de valider la présence de cellules infectées par le marquage des protéines virales et de vérifier la présence de co-marquage entre les protéines virales et le récepteur CD163. Comme il est possible de l'observer à la Figure 7 et à la Figure 8 lors du triple marquage, les cellules infectées par le VSRRP et donc marquées par la rhodamine sont toutes marquées par le FITC (CD163). Il est aussi possible d'observer une diminution progressive du nombre de cellules exprimant le récepteur CD163 à chaque passage du modèle en co-culture et, par le fait même, du nombre de cellules infectées comparativement au contrôle comportant 100% de cellules permissives qui conservent un niveau d'infection stable au VSRRP (Figure 9 et Figure 10).

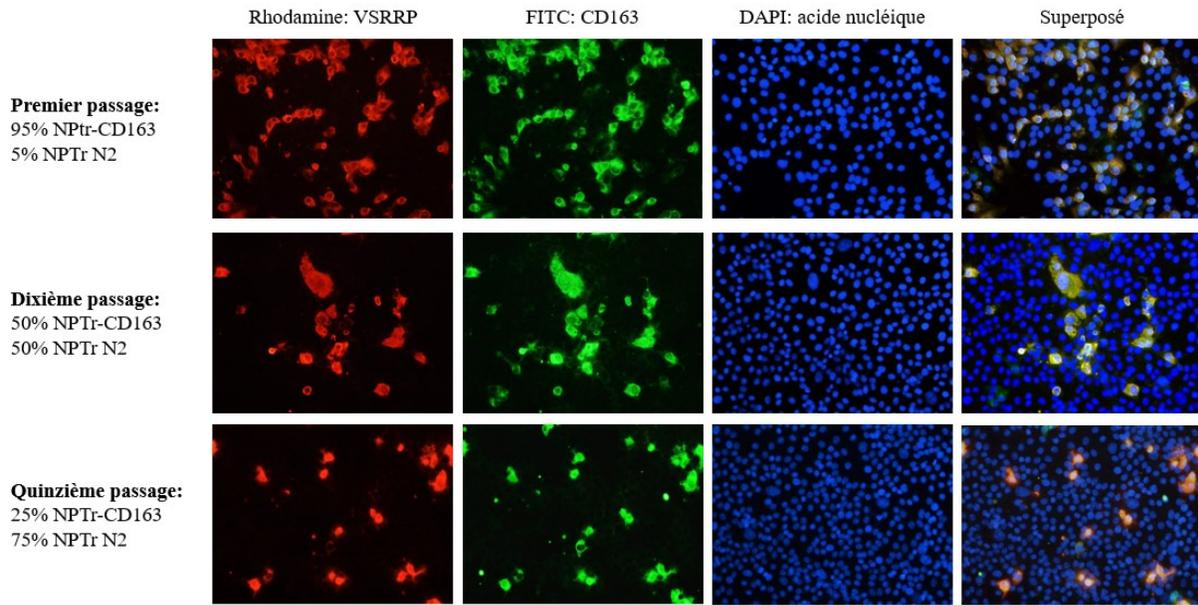


Figure 7. Triple-marquage par IFA des premier, dixième et quinzième passages avec des changements de 5% moins de cellules sans récepteur CD163 entre chaque passage par IFA.

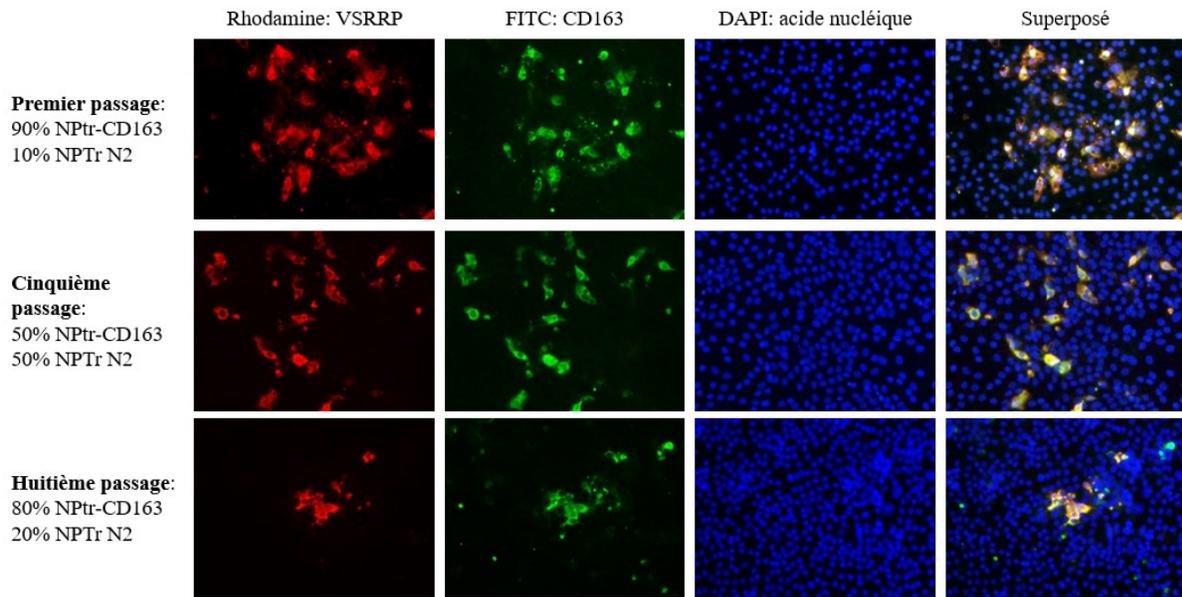


Figure 8. Triple-marquage par IFA des premier, cinquième et huitième passages avec des changements de 10% moins de cellules sans récepteur CD163 entre chaque passage par IFA.

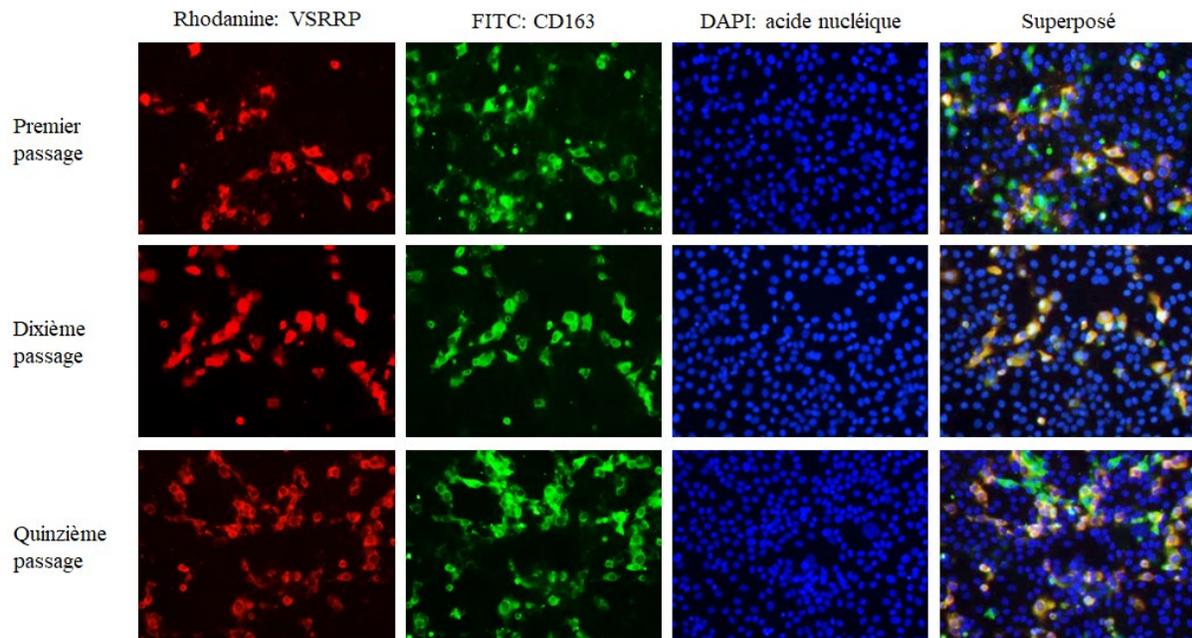


Figure 9. Triple-marquage des premier, dixième et quinzième passages du contrôle positif composé de 100% de cellules NPTr-CD163.

Pour ce qui est des passages avec 10% de différences, tout comme pour les passages avec 5% de différences, le virus ne s'est pas adapté aux cellules non-permissives (NPTr-N2). Il restait, par contre, certaines protéines virales au dernier passage effectué, comme il est possible de l'observer au huitième passage (10%) illustré à la Figure 7. Pour le contrôle composé de 100% de cellules NPTr-CD163, tout comme pour le contrôle positif des passages avec 5% de différences, il y a une augmentation de l'infection lors des passages subséquents (Figure 9). Il en va de même pour le contrôle positif des passages avec 10% de différences (Figure 10).

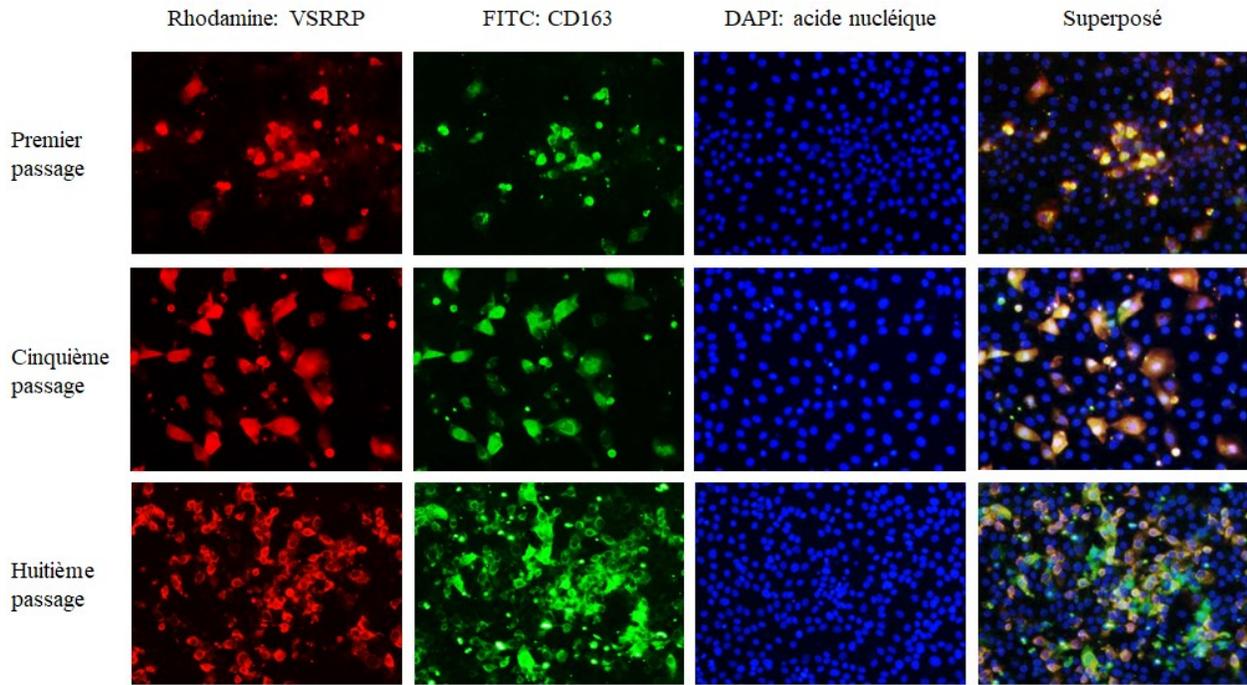


Figure 10. Triple-marquage par IFA des premier, cinquième et huitième passages du contrôle positif composé de 100% de cellules NPTr-CD163.

1.3 Vérification de l'adaptation du VSRRP à des cellules non-permissives à la réplication virale par l'infection de cellules non-permissives, les NPTr-N2

Afin de confirmer que le virus ne s'était pas adapté aux cellules ne possédant pas de récepteur CD163, tous les lysats cellulaires des passages en co-culture ont été utilisés pour infecter les cellules NPTr-N2. Une RT-qPCR a été effectuée après 5 jours post-infection (pi) afin de vérifier l'adaptation et donc la réplication du génome viral dans ce modèle de cellules non-permissive. À 5 jours pi, le Cq obtenu pour le dix-septième passage était de $20,47 \pm 0,2649$, ce qui à première vue pourrait indiquer une présence du virus dans les cellules. Par contre, le Cq de l'inoculum de départ était de $20,69 \pm 0,2008$, ce qui suggère qu'aucune réplication virale n'a eu lieu dans les NPTr-N2 et que la valeur Cq obtenue était celle de l'inoculum. Ce résultat a aussi été confirmé par 1) titration du virus dans les cellules MARC-145 étant donné que le titre viral était sous le seuil limite de détection (c.-à-d. $< 10^{1.5}$ TCID₅₀/ml); et par 2) IFA, car aucune cellule NPTr-N2 n'a exprimé des Ags du VSRRP suite à l'infection (Figure 11). Les résultats illustrés par les images d'IFA de la figure 15 sont ceux obtenus pour le onzième passage en co-culture et sont représentatifs de tous les résultats obtenus avec les passages cellulaires ultérieurs.

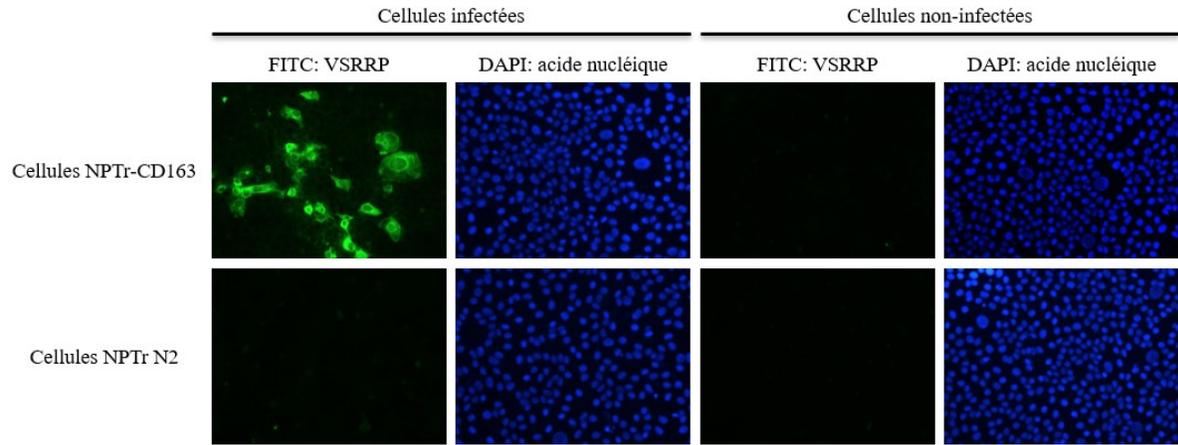


Figure 11. Onzième passage obtenu en co-culture (5% de différence) sur cellules NPTr-CD163 et NPTr-N2. Aucune protéine virale n'a été produite dans les cellules NPTr-N2.

1.4 Séquençage du génome du VSRRP des premiers et dix-huitièmes passages dans les cellules NPTr-CD163

Lors du dix-huitième passage dans 100% de cellules NPTr-CD163, de l'ECP a commencé à apparaître (Figure 12). La présence d'ECP a été par la suite validée plusieurs fois par IFA, donnant des résultats similaires à ceux observés à la figure 10. Le génome des VSRRP du premier et du dix-huitième passage ont donc été séquencés à l'aide du MiSeq d'Illumina afin de vérifier les mutations du génome viral pouvant expliquer l'apparition d'ECP dans les cellules infectées. Le nombre de lectures obtenus pour le premier passage est de 2,907,196 lectures et 3,299,980 lectures pour le dix-huitième passage.

1.4.1 Pourcentage de mutations du VSRRP

En comparant les séquences obtenues pour les deux passages avec différentes séquences provenant de cas cliniques et de souches vaccinales, il est possible d'observer que les séquences génomiques virales sont très près l'un de l'autre (Figure 13). Ils sont aussi près d'une autre souche d'IAF-Klop provenant de notre laboratoire et qui a été séquencée en 2014 (séquences non-soumise dans Genbank). Étonnement, la séquence du virus provenant du premier passage est plus près de la souche d'IAF-Klop que de la séquence du virus provenant du dix-huitième passage. Par contre, ceci pourrait être expliqué par le fait que la production de virus de la souche IAF-Klop ayant servi d'inoculum pour la réalisation des expériences a été effectuée dans les MARC-145 qui sont des cellules de singe. Le virus du premier passage serait ainsi donc plus près de la souche qui a été produite dans les MARC-145 que du virus provenant du dix-huitième passage qui a été passé 18 fois dans les cellules NPTr-CD163, qui sont des cellules de porc.

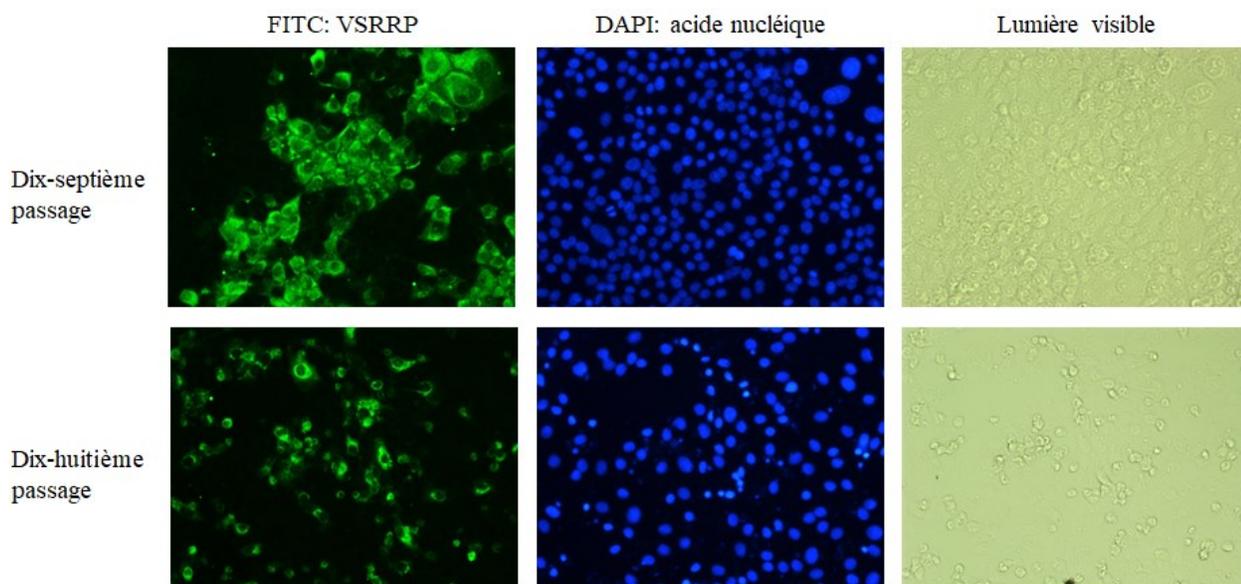


Figure 12. Dix-septième et dix-huitième passages du contrôle d'infection au VSRRP contenant 100% de cellules NPTr-CD163.

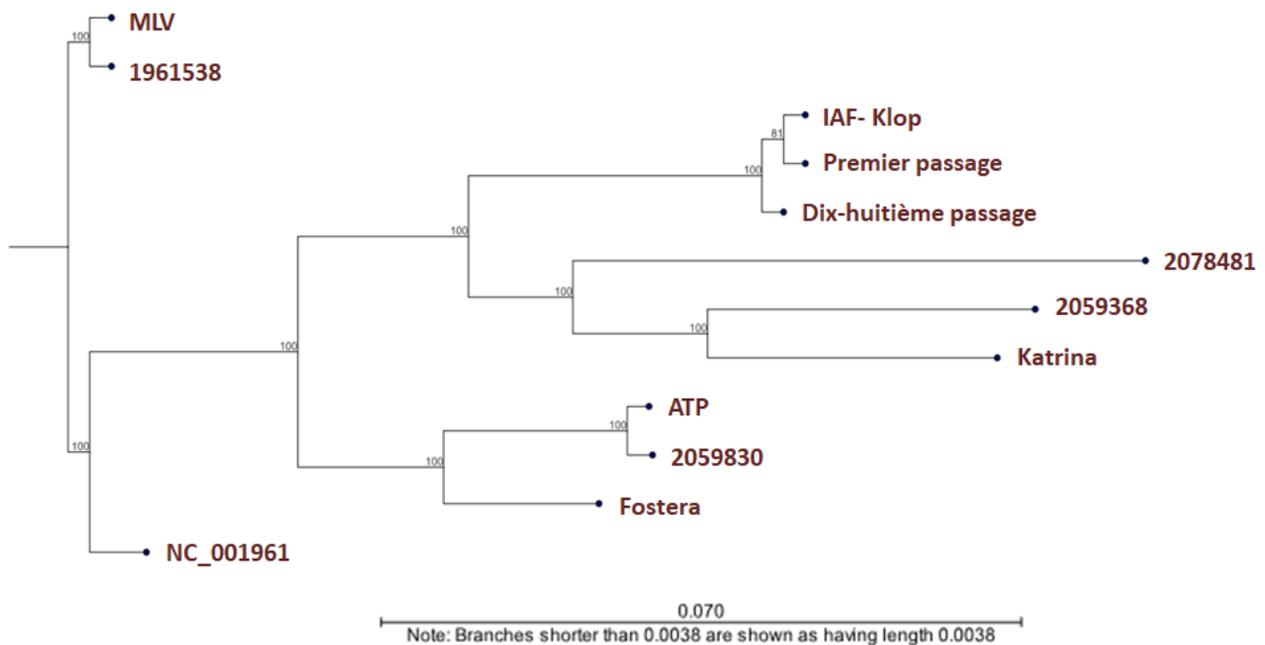


Figure 13. Arbre phylogénique de type « Neighbor joining » du génome entier des premier et dix-huitième passages du VSRRP par rapport à d'autres souches de VSRRP séquencées. Représenté à l'aide du logiciel CLC Genomics Workbench (CLC Genomics Workbench 11,0 <https://www.qiagenbioinformatics.com/>). Séquences utilisées: MLV (Genbank: EF484033.1), Fostera (Genbank: LG013099.1), ATP (Genbank: DQ988080.1) qui sont des souches vaccinales atténuées et NC_001961 (Genbank: NC_001961.1). Les autres séquences utilisées (2059830, IAF-Klop, Katrina, 2059368 et 2078481) sont des séquences québécoises du VSRRP séquencées par notre laboratoire de diagnostic et qui sont non-disponibles dans Genbank. Le « bootstrap » est indiqué à l'intersection de chaque embranchement.

Comme représenté au Tableau 5, un niveau bas de mutations a pu être retrouvé dans la séquence du virus du dix-huitième passage par rapport à celle du premier. En effet, 21 mutations ont été identifiées sur les 14 875 nucléotides séquencés, ce qui donne un pourcentage de mutation d'environ 0,15%. Lorsque l'on compare ce taux à celui de la ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) qui est de 10^{-4} [86], il est possible d'observer que le taux de mutation de 0,15% est comparable à celui de la RdRp. Le taux de mutation est plus bas que celui obtenu lors d'une étude suivant l'évolution du VSRRP dans des passages continus *in vivo* qui est de 0,67% [87]. Par contre, *in vivo* le virus est soumis à une plus grande pression sélective qu'*in vitro*, due à la pression appliquée par le système immunitaire [88].

Taux de mutation retrouvé dans le P18 par rapport au P1	Taux de mutation de la RdRp	Taux de mutation après 7 passages continus in vivo
22 mutations sur 14 875 nucléotides 0,15%	$\sim 10^{-4}$ mutations par Nucléotide [86]	0,67%[87]

Tableau 5. Taux de mutations du VSRRP de la présente étude en comparaison avec une étude in vivo. Séquençage du génome complet des virus du premier et du dix-huitième passage (pour le contrôle 100% NPTr-CD163) : P1 est le premier passage du VSRRP sur 100% de cellules NPTr-CD163 et P18 le dix-huitième passage toujours sur 100% de cellules NPTr-CD163

1.4.2 Types de mutations

Dans les 22 mutations identifiées, il y avait un total de 6 transversions donnant un pourcentage de 28,57% et 14 transitions donnant un pourcentage de 66,67%. Une transversion est le remplacement d'une purine pour une pyrimidine ou l'inverse. Tandis qu'une transition est un remplacement d'une purine pour une autre purine ou d'une pyrimidine pour une autre pyrimidine [89]. Il y a aussi une délétion d'un seul nucléotide qui a pour effet de décaler le cadre de lecture jusqu'au RFS débutant la séquence codant pour la protéine non-structurale nsp9. Cinq transversions sur les 6 et 9 transitions sur les 14 sont non-silencieuses donc vont provoquer un changement en acide aminés (83,3% et 64,29% respectivement) (Tableau 6).

Transversions			Transition			
28,57%			66,67%			
% de transversions ayant donné un changement en acide aminé = 83,3%			% de transition ayant donné un changement en acide aminé = 64,29%			
G → T	C → A	C → G	G → A	A → G	C → T	T → C
19,05%	4,76%	4,76%	23,81%	19,05%	19,05%	4,76%

Tableau 6. Pourcentage de transversions et de transitions dans les 22 mutations retrouvées dans le dix-huitième passage par rapport au premier passage du VSRRP.

1.4.3 Localisation des mutations dans le génome

Les mutations se retrouvent toutes au début du génome viral, qui contient le plus de régions variables [3]. Plus précisément, 12 mutations se retrouvent dans l'ORF1a, 4 mutations se retrouvent dans l'ORF1b, 3 dans l'ORF2a, une dans l'ORF2b et 2 dans l'ORF3 (Tableau 7).

ORF du VSRRP	Protéines encodées par l'ORF	Nombre de mutations	Type de mutations
1a	Nsp (1 α , 1 β , 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)	12	3 transversions
			8 transitions
			1 délétion
1b	Nsp (9, 10, 11, 12)	4	4 transitions
2a	GP2	3	1 transition
			2 transversions
2b	Protéine E	1	1 transition
3	GP3	2	1 transversions
			1 transition

Tableau 7. Position des mutations dans les différents ORFs du dix-huitième passage par rapport au premier du VSRRP.

1.4.4 Analyse de certaines mutations

Comme mentionné précédemment, 15 mutations ont donné un changement en acide aminés (aa) (Tableau 8). La structure secondaire des protéines virales contenant une mutation a été analysée à l'aide du logiciel en ligne gratuit CFSSP [90]. Plusieurs d'entre elles ne donnent pas de changement dans la structure secondaire des protéines, mais quelques-unes d'entre elles sont intéressantes, comme la mutation à la position 2403 dont la délétion entraîne un décalage du cadre de lecture. Il y a aussi la transition à la position 4089 qui se retrouve dans l'ORF2b et qui entraîne un changement dans la structure secondaire. En effet, cette mutation fait en sorte que l'aa se retrouve dans l'hélice en aval au lieu de se retrouver dans le feuillet en amont comme dans le P1. Parmi les autres protéines virales pouvant participer à l'activation de l'apoptose, il y a les protéines nsp4 et nsp10 qui causent respectivement l'inhibition de la protéine Bcl-2 et une

surexpression de la pro-caspase 9 [13]. Par contre, aucune mutation ne causait un changement en aa ou un changement dans la structure secondaire de ces protéines.

Position des acides aminés	P1	P18	Provenance des mutations (type de mutation et position nucléotidique de celle-ci)	ORF
244	Cystéine	Phénylalanine	transversions 731	1a
451	Glycine	Arginine	transition 1351	1a
546	Isoleucine	Thréonine	transition 1637	1a
907	Arginine	Glycine	transition 2719	1a
1304	Asparagine	Sérine	transition 3911	1a
1355	Valine	Isoleucine	transition 4063	1a
2189	Alanine	Sérine	transversions 6565	1a
2241	Alanine	Valine	transition 6722	1a
2403	Thréonine	X	délétion 7208	1a
2458	Acide glutamique	Lysine	transition 7372	1b
3056	Leucine	Phénylalanine	transition 9166	1b
4089	Thréonine	Alanine	transition 12265	2a et 2b
4244	Arginine	Sérine	transversions 12730	2a
4287	Leucine	Valine	transversions 12859	2a
4537	Terminaison	Leucine	transversions 13610	3

Tableau 8. Changements en acides aminés provoqués par les mutations dans le dix-huitième par rapport au premier passage du VSRRP. Les séquences donnant un acide aminé inconnu sont représentées par un X.

2. Modulation de l'expression des ARNm

Dans le cadre d'une autre expérience, les ARNm de cellules NPTr-CD163 et MARC-145 ont été séquencés lors d'une infection par le VSRRP afin de mieux comprendre la résistance des

NPTr-CD163 face à l'infection virale. Afin de déterminer quel temps serait le plus approprié pour effectuer le séquençage des ARNm, une cinétique de réplication du virus a été effectuée dans les cellules MARC-145 et NPTr-CD163 à 4, 16, 28, 52, 76 et 100 heures post-infections. La réplication du virus a été évaluée à partir de lysats cellulaires et surnageant cellulaires. Les titres obtenus démontrent qu'il n'y a aucune différence significative dans la réplication du virus dans les deux lignées cellulaires (Figure 14). Puisque le VSRRP cause de l'ECP dans les MARC-145, une cinétique de la réplication virale a aussi été effectuée dans les deux lignées cellulaires à 24, 48, 72 et 100 heures post-infection. La réplication du virus a été vérifiée par IFA et le développement de l'ECP a été visualisé par un microscope inversé à la lumière visible. Comme il est possible de l'observer à la Figure 15, le niveau de fluorescence est plus bas à 24 heures qu'aux autres temps, ce qui est normal puisque moins de protéines virales ont été produites. Il est aussi possible d'observer qu'à partir de 72 heures, certaines cellules se sont détachées de la surface du pétri. En effet, Yuan et al (2016) ont démontré que l'apoptose était déclenchée dans les MARC-145 à partir de 48 heures post-infection [13]. Puisqu'il est important d'avoir un nombre de cellules MARC-145 équivalent aux cellules NPTr-CD163 infectées afin de les comparer, le temps où le séquençage des ARNm a été effectué à 48 heures post-infection.

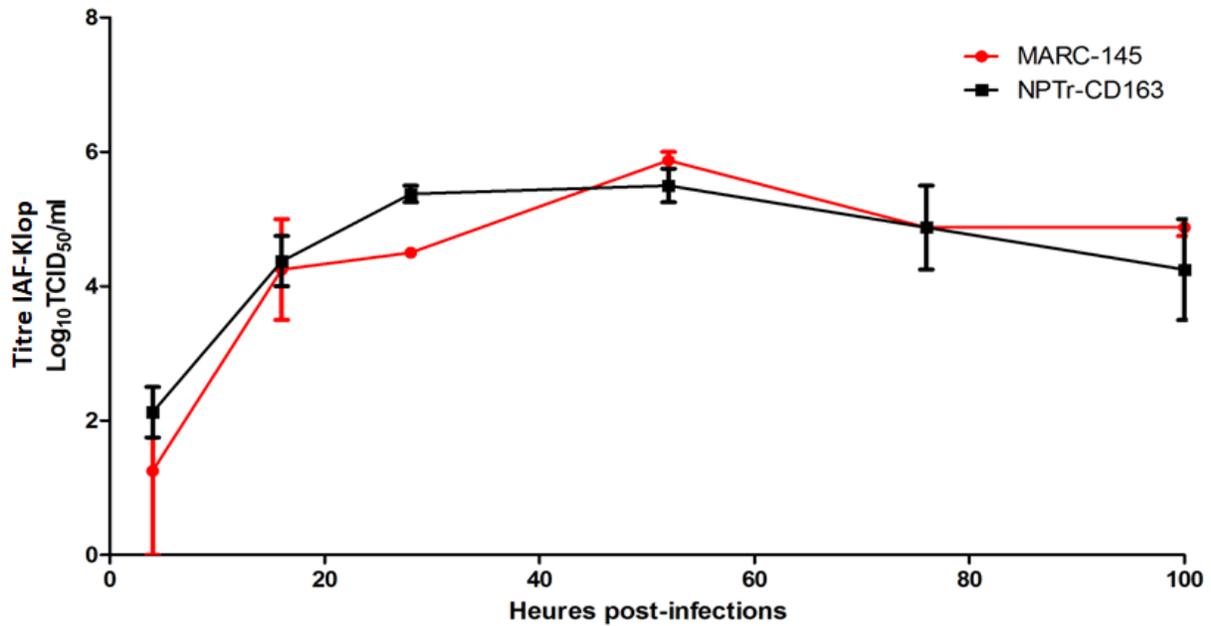


Figure 14. Cinétique de répllication de la souche de VSRRP IAF-Klop dans les cellules MARC-145 et NPTr-CD163 à 4, 16, 28, 52, 76 et 100 heures post-infections. L'expérience a été répétée deux fois. Chaque expérience comptait 3 réplicats techniques. Un test « two-way ANOVA » a été effectué. Aucune différence significative n'est observée entre la répllication virale dans les deux lignées cellulaires.

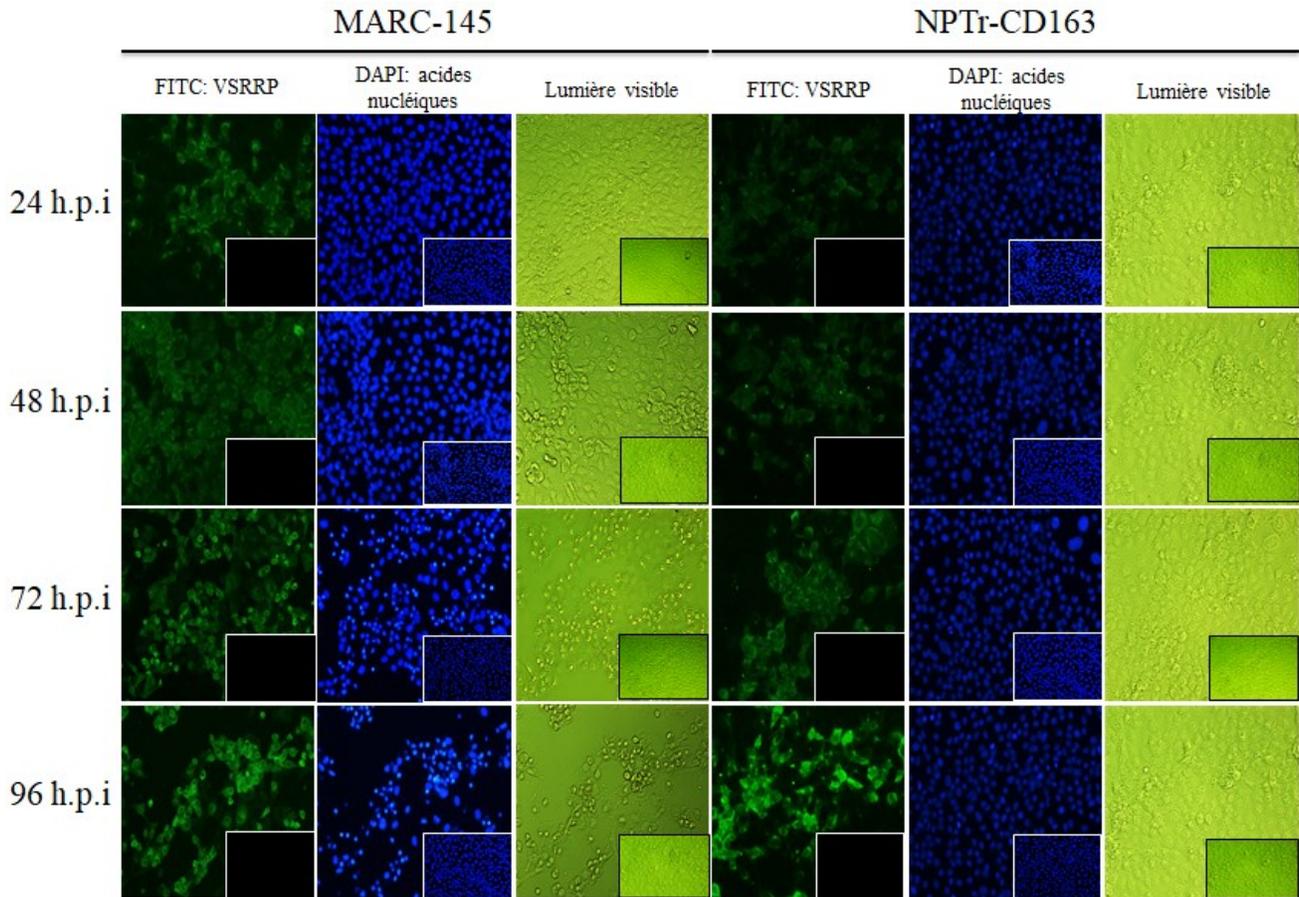


Figure 15. Apparition de l'effet cytopathique dans les MARC-145 et maintien de l'infection dans les NPTr-CD163 à différentes heures post-infection (h.p.i). En encart de chaque image sont les contrôles négatifs respectifs pour chaque lignée cellulaire.

2.1 Contrôles effectués lors de l'infection des cellules par le VSRRP et de la préparation des bibliothèques

Plusieurs étapes visant à vérifier la qualité des échantillons pour le séquençage ont été effectuées avant la préparation des bibliothèques. Tout d'abord, après l'extraction de l'ARN total, cet ARN était dosé au Nanodrop à 260 nm afin de s'assurer que l'extraction avait bien fonctionné. Les résultats pour le dosage de l'ARN total au Nanodrop sont donc de 445,3 ng/ μ l pour le contrôle négatif de MARC-145, 544,7 ng/ μ l pour le contrôle négatif de NPTr-CD163, 430,8 ng/ μ l pour les MARC-145 infectées avec le VSRRP et 351,6 ng/ μ l pour les NPTr-CD163 infectées avec le VSRRP. Par la suite, un test RT-qPCR VSRRP a été effectué afin de s'assurer qu'il n'y avait pas eu de contamination des contrôles négatifs avec du virus et aussi pour estimer la charge virale dans les échantillons positifs. Les Cq pour les contrôles négatifs étaient donc

au-dessus de 40 et de 6,7 pour les MARC-145 infectées et 8,48 pour les NPTr-CD163 infectées. Finalement, une immunofluorescence à 5 jours post-infection a été effectuée en parallèle afin de vérifier le niveau d'infection du virus dans les deux lignées cellulaires. Comme il est possible de l'observer dans la Figure 16, le taux d'infection est légèrement plus bas dans les NPTr-CD163, ce qui est normal puisque ce ne sont pas toutes les cellules qui possèdent le même niveau d'expression du récepteur CD163. Après l'isolement des ARNm et de la synthèse de l'ADN double brins (db) à partir de ceux-ci, l'ADN db a été dosé à l'aide du QuBit (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Les résultats obtenus étaient de 10,9 ng/ μ l pour les cellules MARC-145 non-infectées, 15,7 ng/ μ l pour les cellules NPTr-CD163 non-infectées, 20,1 ng/ μ l pour les cellules MARC-145 infectées par le VSRRP et 9,62 ng/ μ l pour les cellules NPTr-CD163 infectées par le VSRRP. Les bibliothèques ont par la suite été normalisées à 0,2 ng/ μ l pour la préparation des bibliothèques à l'aide du Nextera XT (Illumina, CA, USA).

Après la préparation des bibliothèques, la qualité de ces dernières a été évaluée au Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, USA). Les résultats obtenus pour les bibliothèques de la première réaction de séquençage démontrent une taille de fragments à 600 paires de base en moyenne (Figure 17). Pour les bibliothèques préparées pour la deuxième réaction de séquençage, les résultats étaient similaires à ceux de la première réaction. Le nombre de lectures obtenues pour les réactions de séquençage est de 22, 430,586 lectures pour le contrôle négatif MARC-145, de 18,721,656 lectures pour le contrôle négatif NPTr-CD163, de 24,384,914 lectures pour les MARC-145 infectées avec le VSRRP et de 19,654,514 lectures pour les NPTr-CD163 infectées avec le VSRRP.

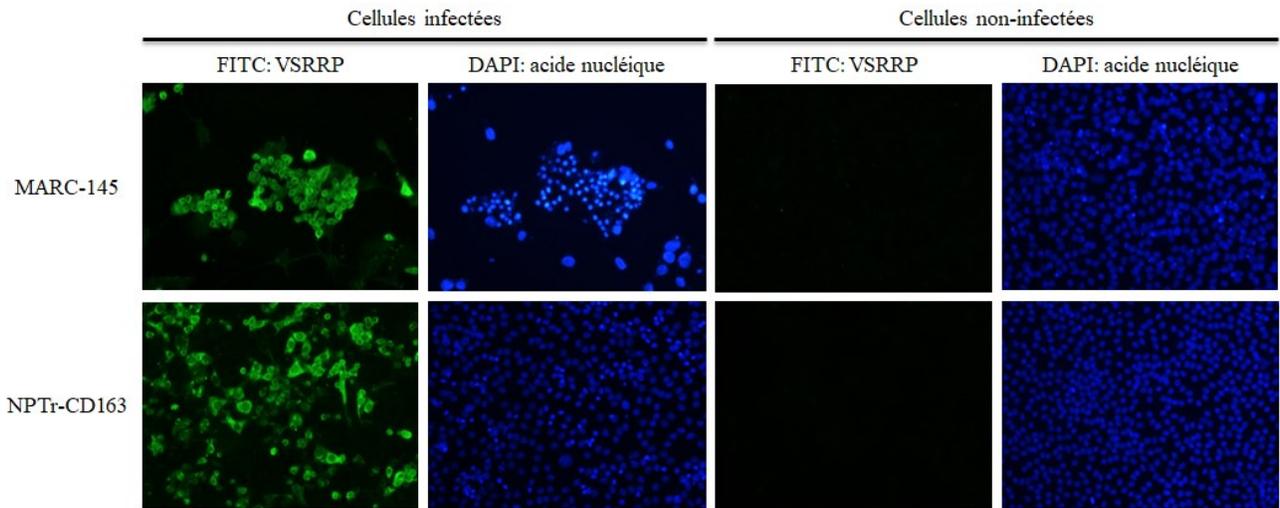


Figure 16. Production de protéines virales dans les MARC-145 vs NPTr-CD163 à 5 jours post-infection. Une MOI de 0,5 virus/cellule a été utilisée pour l'infection et la présence de protéines virales a été vérifié par IFA.

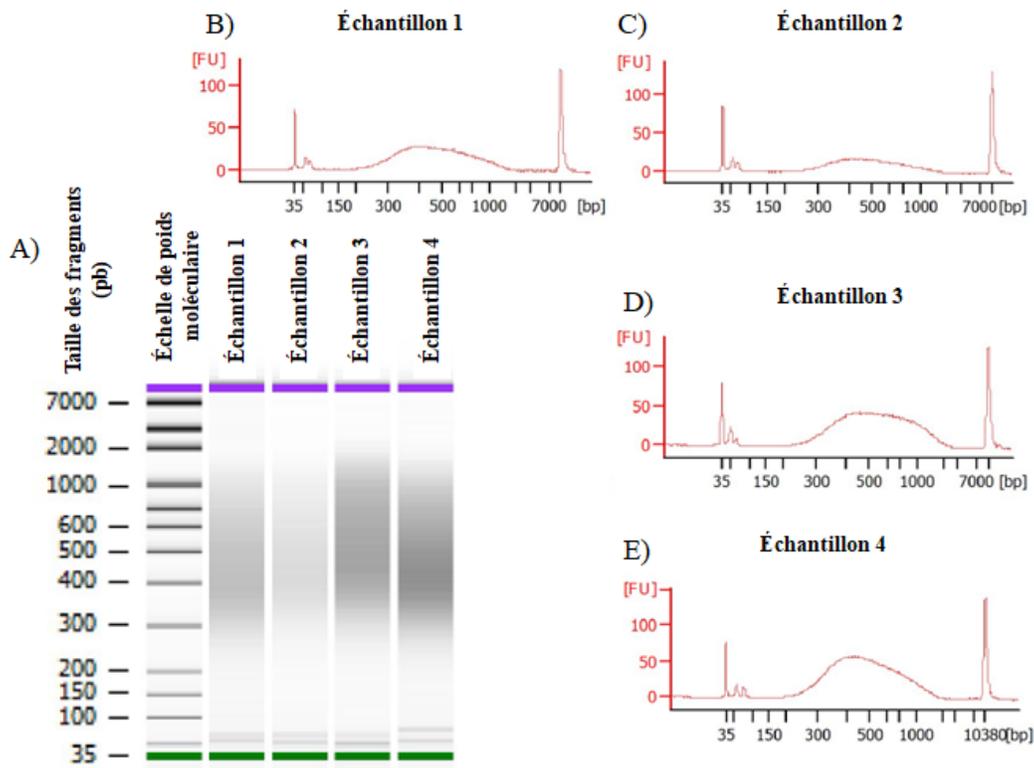


Figure 17. Résultats de la migration dans le Bioanalyser pour la première réaction de séquençage des ARNm. En a) est représentée la taille des bibliothèques en paires de base (pb) sous forme de migration sur gel. En b), c) et d) sont représentés la taille des fragments en pb par rapport à leur fluorescence (FU). Les pics à 35 pb et 7000 pb sont le marqueur (7000 pb) et le front de migration (35 pb). La bibliothèque se retrouve entre 300 et 1000 pb. Le premier échantillon (b) est le contrôle de cellules MARC-145 non-infectées et le deuxième (c) est le contrôle de cellules NPTr-CD163 non-infectées. Le troisième (d) et le quatrième (e) échantillon sont les cellules MARC-145 et NPTr-CD163 infectées par la souche IAF-Klop du VSRRP respectivement.

2.2 Analyses bio-informatiques

Après l'application des analyses statistiques et des facteurs limitants précédemment mentionnés, des listes de gènes (GE) et de transcrits (TE) sur et sous-exprimés ont été utilisées pour réaliser les analyses. Pour les cellules MARC-145 infectées, il y avait 2371 gènes et 4568 transcrits surexprimés et 499 gènes et 3747 transcrits sous-exprimés (Figure 18) tandis que pour les NPTr-CD163 infectées, il y avait 106 gènes et 894 transcrits surexprimés et 20 gènes et 290 transcrits sous-exprimés (Figure 19).

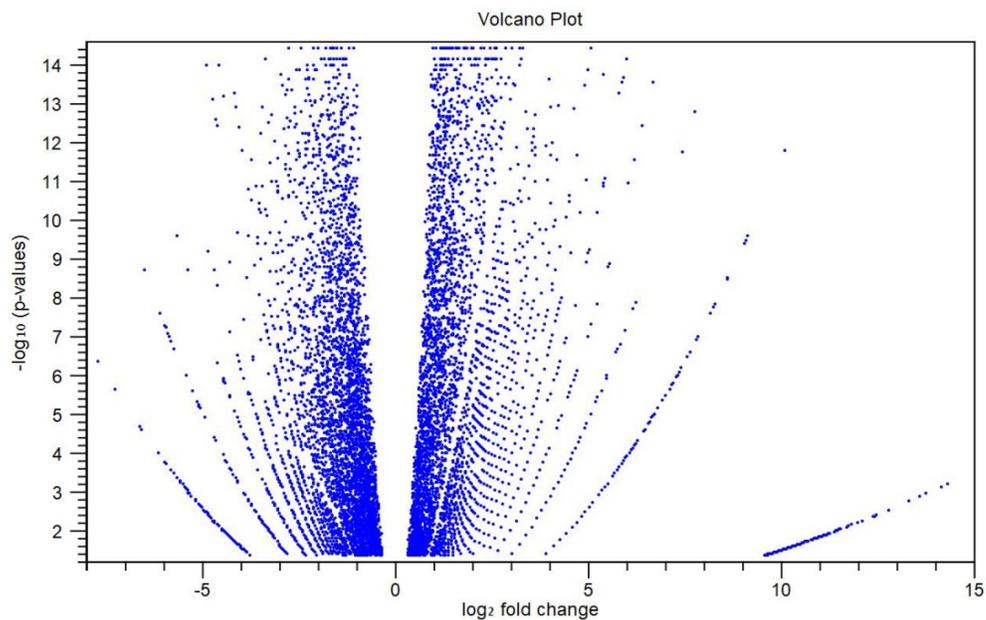


Figure 18. Tracé de Volcan des ARNm modulés dans les cellules MARC-145 infectées comparés aux cellules non-infectées. Représenté à l'aide du CLC Genomics Workbench (CLC Genomics Workbench 11,0 <https://www.qiagenbioinformatics.com/>).

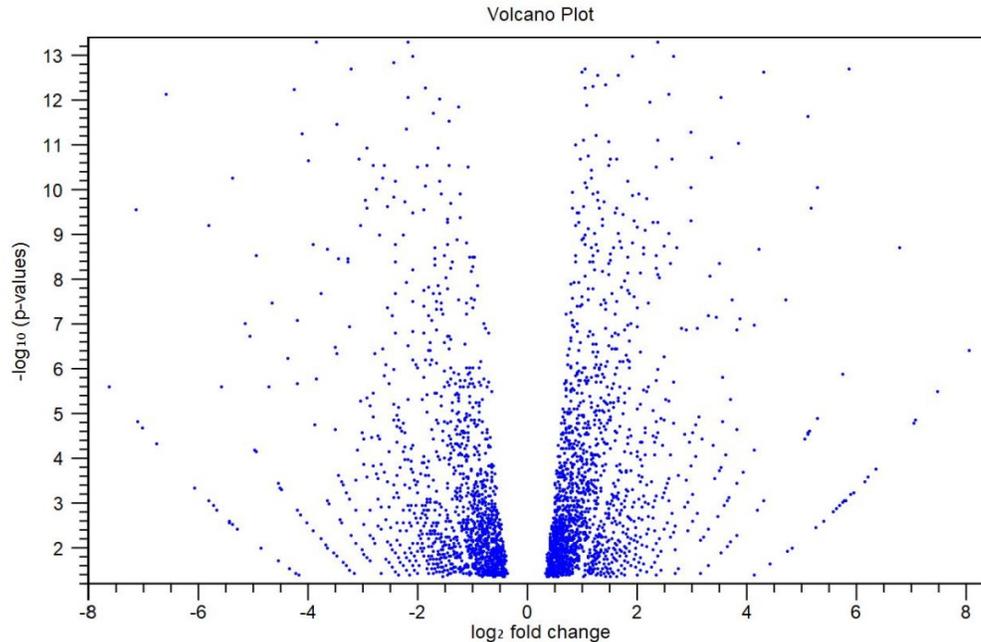


Figure 19. Tracé de volcan des ARNm modulés dans les cellules NPTr-CD163 infectées comparés aux cellules non-infectées. Représenté à l'aide du CLC Genomics Workbench (CLC Genomics Workbench 11,0 <https://www.qiagenbioinformatics.com/>).

2.2.1 Gènes les plus surexprimés et les plus sous-exprimés

2.2.1.1 Gènes et transcrits les plus surexprimés

Il est possible d'observer que certains des 10 gènes les plus surexprimés dans les MARC-145 infectés se retrouvent aussi dans les 10 transcrits les plus surexprimés. Dans ceux-ci il est possible de retrouver FOSB et SOX9 (Tableau 9 et Tableau 10). Certains gènes ne sont pas caractérisés tels que le gène FAM71A ou le transcrit NFKBID_2. En général, les gènes et les transcrits les plus surexprimés sont des gènes pro-apoptotiques ou affectant les fonctions du système immunitaire. Il est aussi possible d'observer que les « Fold Change » (FC) sont beaucoup plus élevés dans les MARC-145 autant pour les gènes (Tableau 9) que pour les transcrits (Tableau 10) comparativement au NPTr-CD163 (Tableau 11 et Tableau 12).

Au niveau des 10 gènes et des transcrits les plus surexprimés dans les NPTr-CD163 infectées comparativement aux NPTr-CD163 non-infectées, contrairement aux MARC-145, il n'y a pas de gènes non caractérisés dans Uniprot KB et dans KEGG pathway (Tableau 11). Cependant, il y a deux transcrits qui ne sont pas caractérisés : CKAP5_4 et C2CD5_1 (Tableau 12). Il est aussi possible d'y retrouver des gènes pro-apoptotiques, tels que le gène FOS. En revanche, la majorité des gènes et des transcrits surexprimés ont un impact négatif sur la régulation de l'apoptose à plusieurs niveaux.

Nom du gène (GE)	Fold change	KEGG pathway (voies de signalisation)	Uniprot KB
SOX9	15 981	-APMc	-Facteur de transcription nucléaire -Réponse cellulaire à l'héparine et à l'IL-1 -Régulation de la prolifération de cellules épithéliales -Régulation négative du système immunitaire
FOS	5994	-Apoptose -TLR -MAPK -TNF -APMc	-Facteur de transcription d'AP-1 -Réponse cellulaire aux ions calcium, a un stimulus extracellulaire -Régulation de la transcription par la polymérase à ARN II
SELE	4995	-TNF	-Réponse à l'IL-1 -Régulation de l'internalisation des récepteurs
CXCL8	4153	-chimiokines -NFkB -IL-17 -TLR -récepteur cytokine-cytokine	-Liaison au récepteur IL-8 -Activation et chimiotaxie des neutrophiles
FOSB	3052	-IL-17	-Facteur de transcription d'AP-1
CCL20	2730	-TNF -récepteur cytokine-cytokine -IL-17 -Chimiokines	-Liaison au récepteur de chimiokine CCR6 -Signalisation intracellulaire médiée par le calcium -Régulation positive de la migration des cellules T et des thymocytes
TRAF1	2694	-NFkB -TNF -Apoptose	-Liaison au récepteur des TNF -Régulation positive de NFkB -Régulation extrinsèque de l'apoptose
FAM71A	2159	-	-
NR4A1	1935	-MAPK -PI3K/Akt	-
EGR1	1743	-	-

Tableau 9. Les 10 gènes les plus surexprimés dans les MARC-145 infectées par le VSRRP. Le rôle de ces gènes est résumé par les voies de signalisation retrouvées dans KEGG pathway [85] et des rôles des protéines codées par ces gènes dans Uniprot KB [84].

Nom du transcrit (TE)	Fold change	KEGG pathway	Uniprot KB
PRDM1_1	20 557	-	-Liaison au promoteur de la polymérase à ARN II spécifique à l'ADN -Régulation négative de la prolifération des cellules B -Régulation positive de l'expression des gènes
SKIL_3	18 191	-	-Liaison au promoteur de la polymérase à ARN II spécifique à l'ADN -Arrêt cycle cellulaire -Régulation négative de la différenciation cellulaire -Régulation positive : des facteurs extrinsèques de l'apoptose et des facteurs intrinsèques de l'apoptose en réponse à un dommage à l'ADN
SOX9_1	14 039	-AMPC	-Facteur de transcription nucléaire -Liaison au promoteur de la polymérase à ARN II spécifique à l'ADN -Réponse cellulaire à l'héparine et à l'IL-1 -Organisation du cytosquelette -Régulation de la prolifération de cellules épithéliales -Régulation négative du système immunitaire
BCAR3_4	12 316	-	-Transduction du signal médié par la GTPase
SETD5_11	10 232	-	-Régulation de l'acétylation des histones
ZBTB10_1	7177	-	-Liaison aux acides nucléiques
FOSB_1	7161	-IL-17	-Facteur de transcription d'AP-1
MAP2K3_1	7098	-TLR -MAPK -TNF	-Régulation positive de la transcription -Régulation du processus de biosynthèse des cytokines
NFKBID_2	5720	-	-
PARD3_22	5469	-Chimiokine -Endocytose	-Jonction serrée

Tableau 10. Les 10 transcrits les plus surexprimés dans les MARC-145 infectées par le VSRRP. Le rôle de ces transcrits est résumé par les voies de signalisation retrouvées dans KEGG pathway [85] et des rôles des protéines codées par ces transcrits dans Uniprot KB [84].

Nom du gène (GE)	Fold change	KEGG pathway	Uniprot KB
NR4A3	61	-	-Activateur de l'activité transcriptionnelle -Régulation négative de l'apoptose dans les neurones -Régulation positive du cycle cellulaire
CXCL8	59	-Récepteurs cytokine-cytokine -NFkB -TLR	-Activité de chimiokine -Liaison au récepteur IL-8 -Activation et chimiotaxie des neutrophiles
CD83	54	-	-Régulation négative de l'IL-4 -Régulation positive de l'IL-10 et l'IL-2 -Régulation de la production de cytokine
NR4A1	52	-	-Liaison d'ion de zinc, liaison à l'ADN
CYR61	26	-	-Liaison à l'héparine, -Régulation négative des processus d'apoptose et de la mort cellulaire
FOSB	26	-	-Activateur de la transcription d'AP-1 -Réponse cellulaire aux ions de calcium
PTGS2	23	-	-Régulation négative des facteurs intrinsèques de l'apoptose en réponse à un stress osmotique -Régulation de la prolifération cellulaire
FOS	16	-Apoptose -TLR -MAPK -TNF -AMPc -IL-17	-Facteur de transcription d'AP-1 -Réponse cellulaire aux ions calcium, a un stimulus extracellulaire -Régulation de la transcription par la polymérase à ARN II
CCL20	14	-	-Liaison au récepteur de chimiokine CCR6
TNFAIP3	13	-	-Régulation négative : des facteurs extrinsèques de l'apoptose, d'IkB/NFkB, de la réponse immunitaire innée, de l'IL-1 β , de l'IL-2, de la voie du TLR3 et du TLR5 et de la production de TNF

Tableau 11. Les 10 gènes les plus surexprimés dans les NPTr-CD163 infectées par le VSRRP. Le rôle de ces gènes est résumé par les voies de signalisation retrouvées dans KEGG pathway [85] et des rôles des protéines codées par ces gènes dans Uniprot KB [84].

Nom du transcrit (TE)	Fold change	KEGG pathway	Uniprot KB
CDK2_3	267	-FoxO -cycle cellulaire -PI3K-Akt -p53	-Liaison de l'ATP -Activité des serine/thréonine kinases
ARID4B_2	181	-	-Triméthylation des histones H3-K9 -Régulation positive de la transcription par la polymérase à ARN II -Régulation de l'expression des gènes
gene:ENSSSCG00000014280_4 (SLC22A5)	136	-	-Activité ATPase -Réparation de l'ADN -Maintenance des télomères -Liaison des ions métal
FAM120A_1	133	-	-Se retrouve dans le cytosol et le noyau
SETD2_2	110	-	-Activité histone-lysine N-méthyltransférase
C2CD5_1	82	-	-
SETX_1	74	-	-Sélection des sites d'épissage d'ARNm -Régulation négative de l'apoptose -Régulation positive : de la transcription de l'ADN et de l'épissage de l'ARNm -Cascade MAPK
gene:ENSSSCG00000009430_2	74	-	-Régulation de la protéine kinase A
CKAP5_4	71	-	-
gene:ENSSSCG00000006510_1 (GON4L)	62	-	-Corépresseur de la transcription -Différentiation cellules B -Régulation négative de la transcription de l'ADN

Tableau 12. Les 10 transcrits les plus surexprimés dans les NPTr-CD163 infectées par le VSRRP. Le rôle de ces gènes est résumé par les voies de signalisation retrouvées dans KEGG pathway [85] et des rôles des protéines codées par ces gènes dans Uniprot KB [84].

2.2.1.2 Gènes et transcrits les plus sous-exprimés

Seulement deux gènes se retrouvent aussi dans les transcrits les plus sous-exprimés dans les MARC-145 infectées : SULT1E1_1 et METTL7A_1, qui ont des activités sulfotransférase et de méthyltransférase, respectivement (Tableau 13 et Tableau 14). Quelques gènes et transcrits ne sont pas caractérisés, autant dans Uniprot KB que KEGG pathway, tels que KIAA0355_1 (TE), EVL_7 (TE), SLC18B1 et CCD42B (GE) (Tableau 13 et Tableau 14). Leurs fonctions sont donc indéterminées. En général, beaucoup de ces transcrits et gènes sous-exprimés sont impliqués dans la gestion de l'intégrité de la membrane cellulaire et dans le transport d'ion d'un bord à l'autre de celle-ci. Le transcrit CDK1_3 est impliqué dans les voies de signalisation des jonctions serrées (Tableau 14).

Comparativement aux MARC-145, aucun des 10 gènes les plus sous-exprimés ne se retrouve dans les 10 transcrits les plus sous-exprimés chez les cellules NPTr-CD163 infectées. Deux des gènes sous-exprimés ne sont pas caractérisés dans Uniprot KB et KEGG pathway donc celui ayant le FC le plus bas gene:ENSSSCG00000037396 et un dont le FC est plus élevé RSPH1 (Tableau 15). Au niveau des transcrits, trois ne sont pas caractérisés dans les deux logiciels: CNOT1_3, gene:ENSSSCG00000009430_4 et gene:ENSSSCG00000039658_3 (Tableau 16). Comme dans les MARC-145, certains gènes/transcrits dans les plus sous-exprimés sont impliqués dans le transport transmembranaire de divers ions, tels que le bicarbonate, l'oxalate et le chlore. Un des transcrits sous-exprimés le transcrit DYRK1B_2, aurait selon Uniprot KB, un rôle à jouer dans l'initiation de la transcription (Tableau 16). Malheureusement, tous les dix transcrits les plus sous-exprimés ne se retrouvent pas dans KEGG pathway, ce qui complique la compréhension de leurs effets potentiels dans les voies de signalisation cellulaire (Tableau 16).

Nom du gène (GE)	Fold change	KEGG pathway (voies de signalisation)	Uniprot KB (fonctions)
KCNJ13	-61	-digestion et absorption des protéines	-Régulation de la transportation transmembranaire d'ion
SULT1E1	-54	-Biosynthèse d'hormones stéroïdes	-Activité sulfotransférase
METTL7A	-54	-	-Composante intégrale de la membrane cellulaire -Activité méthyltransférase
SPTLC3	-28	-métabolisme des sphingolipides -Voies métaboliques	-Complexe serine C-palmitoyltransférase -Processus biosynthétique des sphingoïdes -Liaison phosphate pyridoxal
EPHA4	-27	-guidance des axons	-Liaison de l'ATP -Régulation négative de la protéolyse impliquée dans le processus catabolique des protéines -Régulation positive de l'activité JUN kinase -Régulation de la GTPase
SLC18B1	-26	-	-
SENP8	-25	-	-Activité peptidase de type cystéine
CCD42B	-22	-	-
CLIC5	-21,	-	-Activité des canaux à ions -Localisation des protéines -Régulation du transport transmembranaire des ions
MGST2	-21	-métabolisme glutathione -métabolismes des xénobiotiques par le cytochrome p450	-Processus catabolique des lipides membranaires -Processus biosynthétique du glutathione.

Tableau 13. Les 10 gènes les plus sous-exprimés dans les MARC-145 infectées par le VSRRP. Le rôle de ces gènes est résumé par les voies de signalisation retrouvées dans KEGG pathway [85] et des rôles des protéines codées par ces gènes dans Uniprot KB [84].

Nom du transcrit (TE)	Fold change	KEGG pathway (voies de signalisation)	Uniprot KB (fonction)
ABCC4_3	-206	-AMPc -transporteurs ABC	-Liaison de l'ATP -Activité de l'ATPase couplé au mouvement de substances au travers de la membrane
EVL_7	-150	-	-
POR_1	-98	-	-Liaison du NADP -Régulation positive de l'activité monooxygénase
OBFC1_4	-93	-	-Liaison à l'ADN télomérique simple brin -Régulation négative de la maintenance des télomères par la télomérase -Régulation positive de la réplication de l'ADN -Maintenance des télomères
CDK1_3	-90	-cycle cellulaire -p53 -jonction Gap	-
ING4_6	-70	-	-Liaison des ions métaux -Co-activateur des activités de transcriptions -Régulation positive des processus apoptotiques -Arrêt du cycle cellulaire -Réponse aux dommages d'ADN -régulation négative de la croissance cellulaire et de la transcription
DOK4_2	-70	-	-Cascade des MAPK
KIAA0355_1	-67	-	-
SULT1E1_1	-62	-biosynthèse des hormones stéroïdes	-Activité sulfotransférase
METTL7A_1	-62	-	-Activité méthyltransférase

Tableau 14. Les 10 transcrits les plus sous-exprimés dans les MARC-145 infectées par le VSRRP. Le rôle de ces transcrits est résumé par les voies de signalisation retrouvées dans KEGG pathway [85] et des rôles des protéines codées par ces gènes dans Uniprot KB [84].

Nom du gène (GE)	Fold change	KEGG pathway (voies de signalisation)	Uniprot KB (fonction)
gene:ENSSSCG00000037396	-6	-	-
SDR39U1	-4	-	-Activité catalytique
XRRA1	-3	-	-Réponse aux rayons X
SLC26A4	-3	-synthèse hormones thyroïdiennes	-Transporteur transmembranaire de bicarbonate, d'oxalate, de chlore et de sulfate -Régulation du pH intracellulaire -Régulation du potentiel de la membrane cellulaire
gene:ENSSSCG00000034868	-2	-réabsorption de l'eau régulée par la vasopressine	-Région périmoléculaire du cytoplasme -Transport Golgi-membrane cellulaire -Régulation positive du transport de protéine intracellulaire -Régulation de l'exocytose
RASL11A	-2	-	-Liaison GTP -Régulation positive de la transcription par la polymérase à ARN I
RAB17	-2	-	-Liaison GTP et activité GTPase -Régulation de l'endocytose
RSPH1	-2	-	-
NUDT17	-2	-	-Activité hydrolase
CDHR4	-2	-	-Liaison d'ion calcium -Adhésion cellulaire -Communication cellule-cellule

Tableau 15. Les 10 gènes les plus sous-exprimés dans les NPT_r-CD163 infectées par le VSRRP. Le rôle de ces gènes est résumé par les voies de signalisation retrouvées dans KEGG pathway [85] et des rôles des protéines codées par ces gènes dans Uniprot KB [84].

Nom du transcrit (TE)	Fold change	KEGG pathway (voies de signalisation)	Uniprot KB (fonction)
CNOT1_3	-194	-	-
MYO9A_3	-138	-	-Liaison de l'actine -Activité GTPase -Liaison d'ions métaux -Liaisons des microtubules -Transduction signaux intracellulaires
ARHGEF2_7	-137	-	-Liaison d'ions métaux -Transduction signal intracellulaire
GPD2_5	-127	-	-Liaison d'ion calcium -Processus métabolique du glycérol-3-phosphate
gene:ENSSSCG00000004983_2	-107	-	-Composante intégrale de la membrane
gene:ENSSSCG00000009430_4	-96	-	-
REXO1_2	-66	-	-Liaison d'acide nucléique
PBRM1_4	-56	-	-Liaison de la chromatine
gene:ENSSSCG000000039658_3	-55	-	-
DYRK1B_2	-52	-	-Liaison de l'ATP -Activité serine/thréonine kinase -Activité protéine tyrosine kinase -Régulation positive de la transcription -Co-activateur de l'activité de transcription

Tableau 16. Les 10 transcrits les plus sous-exprimés dans les NPTr-CD163 infectées par le VSRRP. Le rôle de ces gènes est résumé par les voies de signalisation retrouvées dans KEGG pathway [85] et des rôles des protéines codées par ces gènes dans Uniprot KB [84].

2.2.2 Voies de signalisation potentiellement modulées

2.2.2.1 Apoptose

L'une des voies intéressantes induites par le VSRRP dans les MARC-145 infectées est l'apoptose. Le rôle de plusieurs gènes qui se retrouvent dans les voies de signalisation obtenues à l'aide de KEGG pathway a déjà été identifié lors d'infection par le VSRRP dans les cellules MARC-145 ou dans les PAMs (Figure 20). Il y a la caspase 3 qui serait surexprimé dans les PAMs lors de l'infection par le VSRRP. Ce serait la protéine virale E qui causerait cette surexpression [54]. Cette surexpression est présente dans les résultats obtenus, avec un FC de 26,17304 (TE). Ce transcrit ne se retrouve pas dans les gènes les plus surexprimés. Il y a aussi la caspase 8 dont la surexpression aurait déjà été caractérisée dans les PAMs [91]. Ici, son FC est de 2,9633 (TE) et ce transcrit n'est aussi pas dans les gènes les plus surexprimés. Il est aussi possible d'observer que plusieurs gènes pro-apoptotiques sont surexprimés, mais qu'il y a aussi certains gènes pro-survie qui le sont également. Il y a aussi plusieurs gènes sous-exprimés qui ont pour rôle de promouvoir l'apoptose, tel que la caspase 9 (FC : -9,4272 (TE)) ou ENDO-G (FC : -2,7157 (TE)) (Figure 20). Par contre, il a déjà été précédemment démontré que la voie de signalisation de l'apoptose était inhibée avant 48 heures post-infection et que des signes d'apoptose pouvaient être observés à partir de 48 heures et par la suite [54]. C'est donc pour cette raison que l'ARNm des cellules infectées a été récolté à 48 heures post-infection.

Dans les NPTr-CD163, dû au moins grand nombre de gènes et de transcrits différentiellement exprimés, il est plus difficile d'en tirer une conclusion précise (Figure 21). En effet, il est possible d'observer une surexpression de certains gènes pro-apoptotiques tels que la protéine Lamin qui cause une perte de l'intégrité de la membrane nucléaire. Deux transcrits surexprimés codent pour cette protéine et leurs FC est de 4,5997 et de 5,2130. Il y a aussi la surexpression de la protéine AP-1 par la surexpression des gènes FOSB et FOS qui ont des FC de 26,9335 (GE) et de 16,8017 (GE) et des FC pour les transcrits de 26,8348 (TE) et 16,6505 (TE) respectivement. La protéine AP-1 est pro-apoptotique et se retrouve dans les 10 gènes/transcrits les plus surexprimés (Tableau 11 et Tableau 12). Il y a aussi le gène codant pour la protéine IAP/XIAP qui est sous-exprimé et pro-survie. Il y a aussi le transcrit codant pour la cathepsine qui est sous-exprimé avec un FC de -5,3618 (TE) (Figure 21). Cette protéine a pour

effet, entre autres, d'inhiber la protéine Bcl qui est elle-même un inhibiteur de l'apoptose. Les résultats précédemment mentionnés semblent indiqués une certaine surexpression de l'apoptose, à plus petite échelle que dans les MARC-145. En revanche, il y a aussi certains gènes modulés pouvant entraîner la survie de la cellule. Il y a tout d'abord le gène/transcrit Gadd45 qui est pro-survie qui est surexprimée avec un FC de 2,9243 (GE) et 2,9136 (TE).

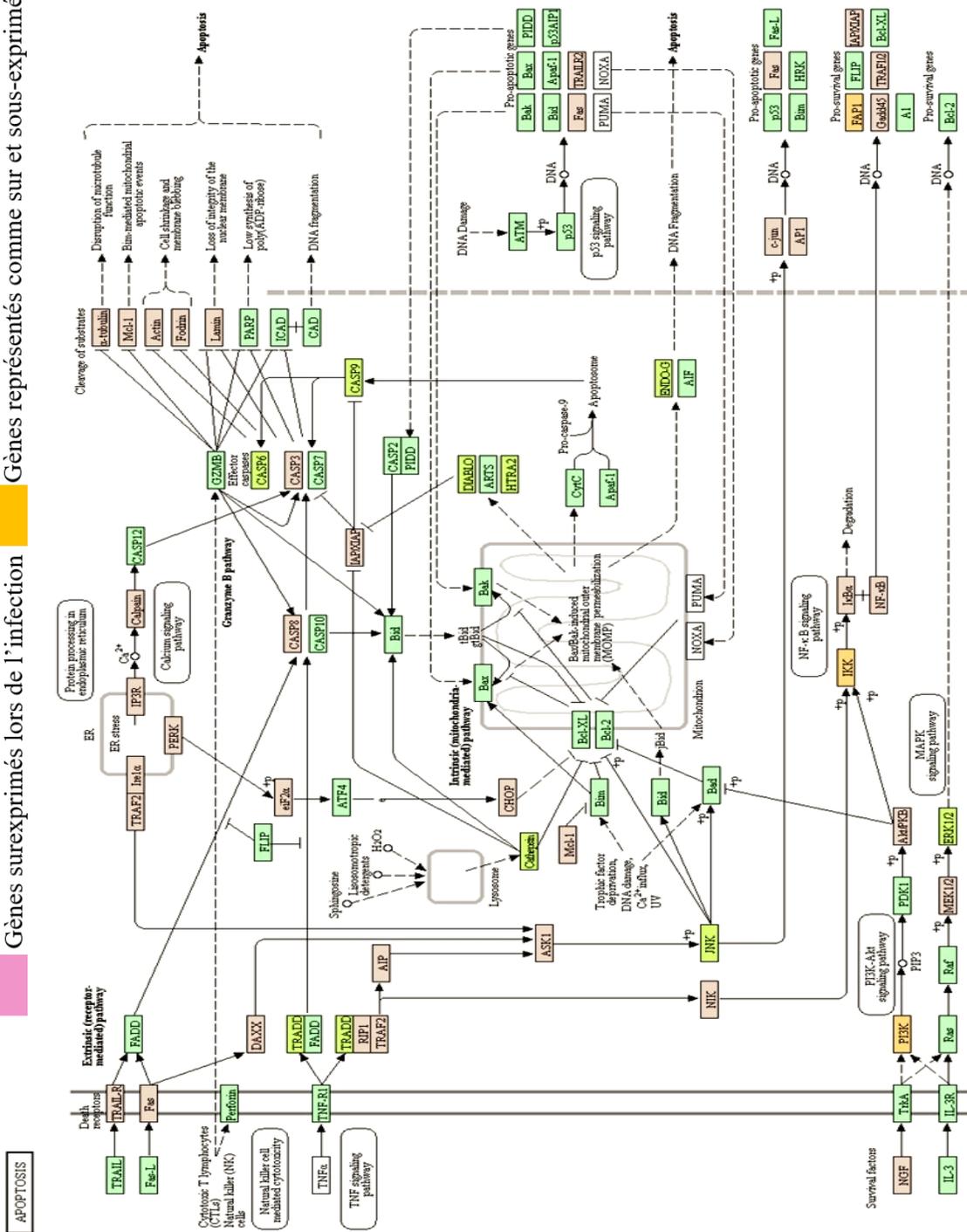
Légende:

Genes non modulés

Genes surexprimés lors de l'infection

Genes sous-exprimés lors de l'infection

Genes représentés comme sur et sous-exprimés



04210.67118
© Kanehisa Laboratories

Figure 20. Voie de signalisation de l'apoptose dans les MARC-145 infectées par le VSRRP. Représentée en utilisant le logiciel gratuit en ligne KEGG pathway [85]. Les gènes et transcrits les plus surexprimés et sous-exprimés ont été déterminés à l'aide d'un FDR $p < 0.05$ et d'un FC $>$ ou $<$ 2.

Légende:

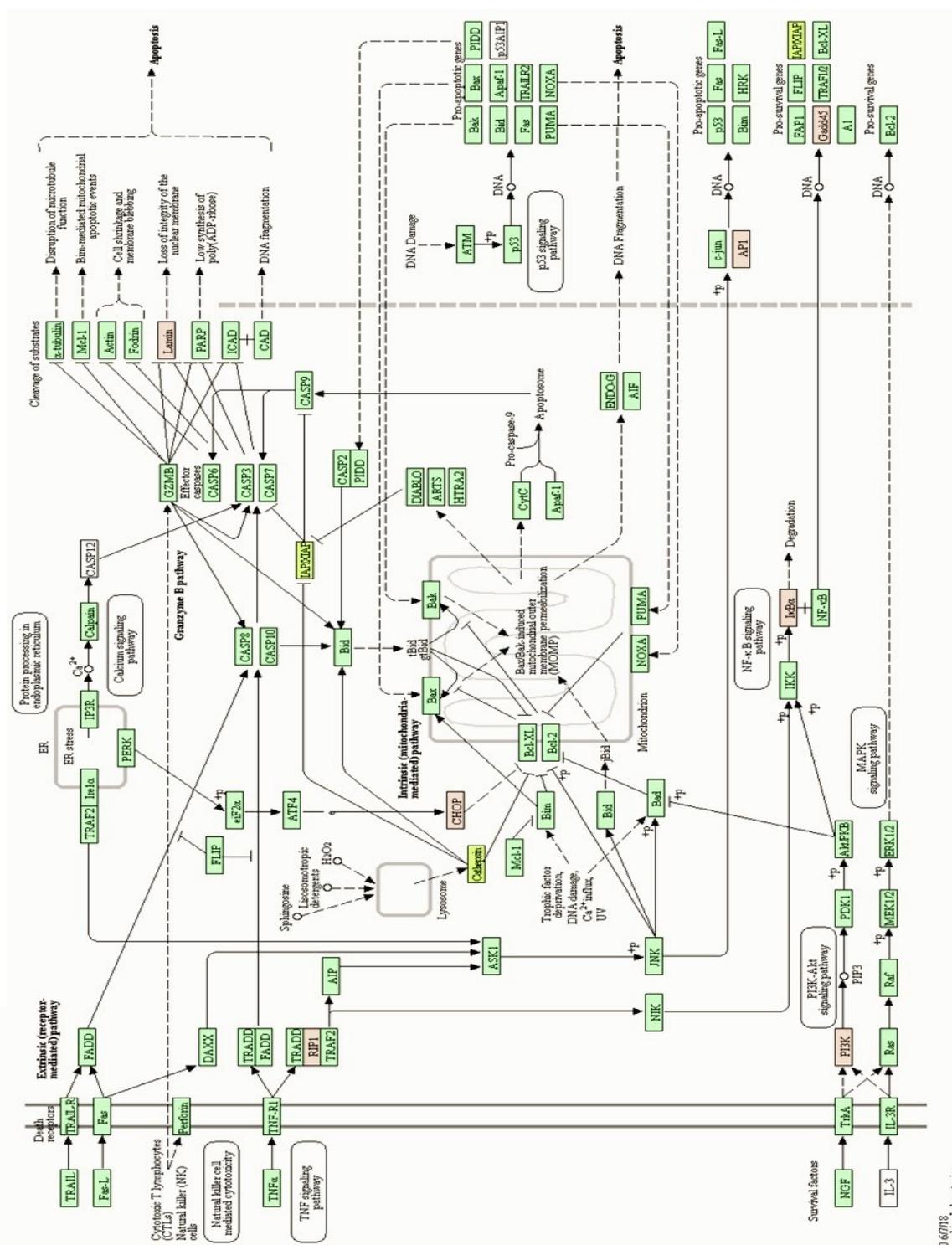
Gènes non modulés

Gènes surexprimés lors de l'infection

Gènes sous-exprimés lors de l'infection

Gènes représentés comme sur et sous-exprimés

APOPTOSIS



04210.6/7113
© Kanehisa Laboratories

Figure 21. Voie de signalisation de l'apoptose dans les NPTr-CD163 infectées par le VSRRP. Représentée en utilisant le logiciel gratuit en ligne KEGG pathway [85]. Les gènes et transcrits les plus surexprimés et sous-exprimés ont été déterminés à l'aide d'un FDR $p < 0.05$ et d'un FC $>$ ou $<$ 2.

2.2.2.2 Nécroptose

Puisque la nécrose n'a pas de voie de signalisation précise et désigne plus un état cellulaire, la voie de la nécroptose sera ainsi analysée. L'un des marqueurs importants est la protéine RIPK1 qui, une fois lié à la protéine RIPK3, va entraîner la nécroptose de la cellule. L'ARNm de cette protéine est surexprimé dans les MARC-145 infectées. Un autre marqueur de cette voie de signalisation est la protéine MLKL dont l'ARNm est aussi surexprimé dans les MARC-145 infectées (Figure 22). La caspase 8, que l'on retrouve aussi dans la voie de l'apoptose, a pour rôle de participer à l'activation des autres caspases déclenchant ainsi l'apoptose [92]. Sa surexpression dans la voie de la nécroptose démontre donc une inhibition de cette voie de signalisation. Un autre groupe de gènes dont la surexpression a été observée dans les MARC-145 sont les inhibiteurs d'apoptose (IAPs). Ils agissent en se liant à la protéine LUBAC afin de former le complexe IAP/LUBAC. À noter que le gène codant pour la protéine LUBAC est inhibé dans les MARC-145 avec un FC de -5,06963 (GE) indiquant probablement un point tournant où la nécroptose est inhibée au lieu d'être favorisée (Figure 22).

Dans les cellules NPTr-CD163 infectées, seulement le gène RIPK1 est surexprimé (Figure 23). Cependant, les IAPs sont inhibés avec un FC de -4,65228 (TE). Cette inhibition est intrigante puisque si l'on prend en compte la surexpression de RIPK1, il est difficile de déduire si la voie de la nécroptose est favorisée ou inhibée dans les NPTr-CD163 lors de l'infection par le VSRRP. Par contre, l'absence d'ECP dans les cellules NPTr-CD163 infectées illustre très bien cet équilibre. Il serait aussi possible qu'à 48 heures post-infection il y ait un changement dans les voies de signalisation surexprimées, comme c'est le cas dans les MARC-145.

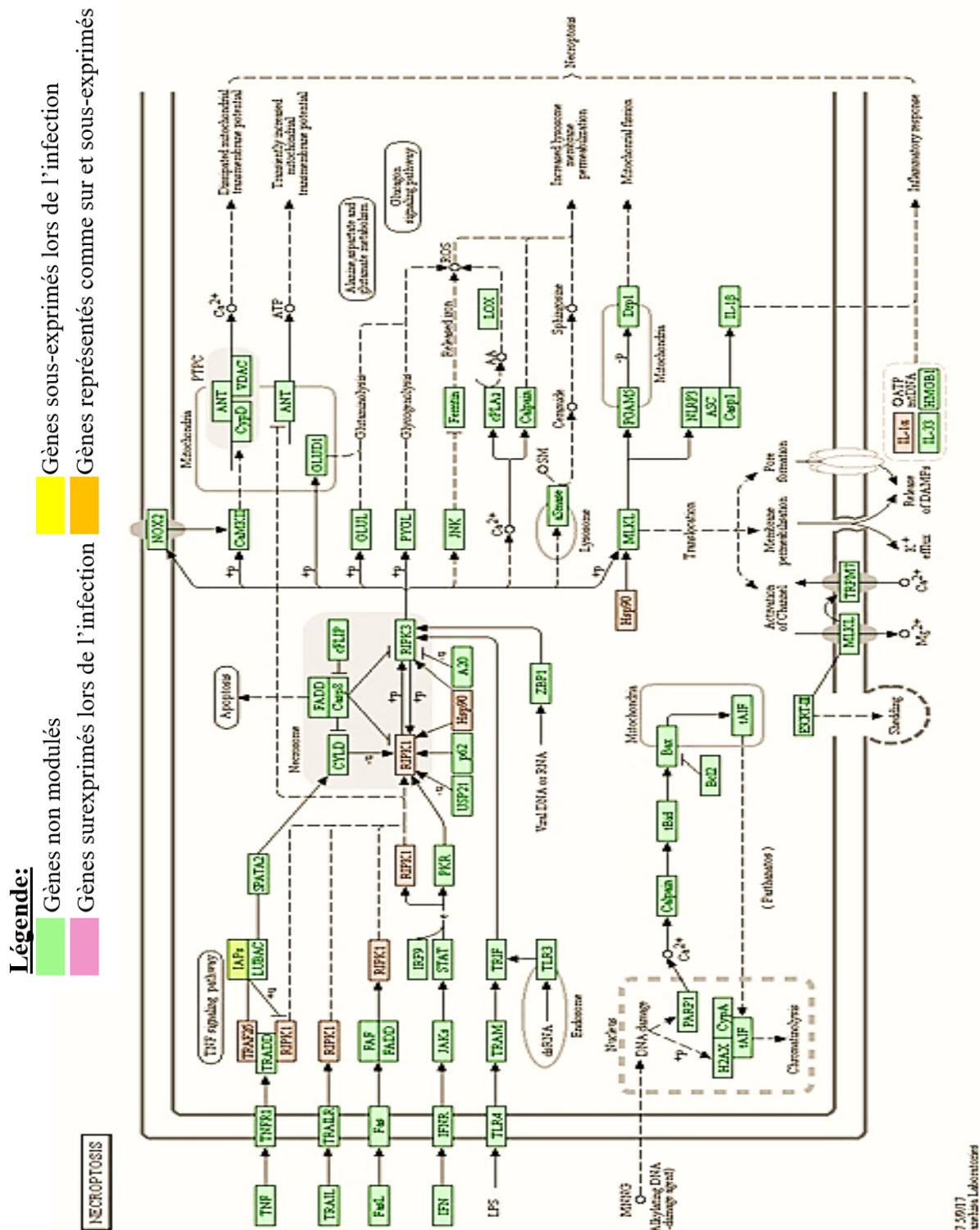


Figure 23. Voie de signalisation de la nécroptose dans les NPTr-CD163 infectées par le VSRRP. Représentée en utilisant le logiciel gratuit en ligne KEGG pathway [85]. Les gènes et transcrits les plus surexprimés et sous-exprimés ont été déterminés à l'aide d'un FDR $p < 0.05$ et d'un FC $>$ ou $<$ 2.

2.2.2.3 Autophagie

Il a été déjà précédemment démontré que l'autophagie était activée dans les MARC-145 entre 24 et 48 heures p.i. par l'augmentation de la protéine LC3 [76]. Par contre, dans les résultats obtenus lors de nos expériences de RNA-Seq, le transcrite codant pour la protéine LC3 est sous exprimée (Figure 24). Plus précisément, son FC est de -2,42401 (TE). Toutefois, il y a tout de même une régulation à la hausse de l'autophagie à certains égards puisque plusieurs transcrits sont surexprimés, tels que celui de la protéine ATG5 qui sert aussi de marqueur dans la régulation de l'autophagie. Son FC étant de 2,3333 (GE) et de 3,5423 (TE). La protéine ATG12 qui participe aussi à l'activation de l'autophagie en formant un complexe avec la protéine ATG5 [93] n'a cependant pas été modulée (Figure 24).

Dans les cellules NPTr-CD163, très peu de gènes ou de transcrits de l'autophagie ont été modulés lors de l'infection. Le seul transcrite surexprimé dans cette voie est celui codant pour la protéine PI3K (FC=2,553981 (TE)). Cette protéine est impliquée dans plusieurs voies de signalisation déterminant la mort cellulaire (Figure 25). Le seul gène ou transcrite sous-exprimé de l'autophagie est le transcrite codant pour la cathepsine B (CTSB) avec un FC de -5,38164 (TE) (Figure 25). Cette protéine a pour effet d'activer la dégradation des vésicules grâce à son activité enzymatique lysosomale [94]. Dû au manque de profondeur et/ou aux moins grandes variations, il est donc difficile de sortir de claires conclusions. Par contre, il est possible de déterminer que l'autophagie n'est probablement pas une voie de signalisation grandement activée dans les NPTr-C163 lors de l'infection par le VSRRP et ceci est probablement normal étant donné l'absence d'ECP lors de l'infection.

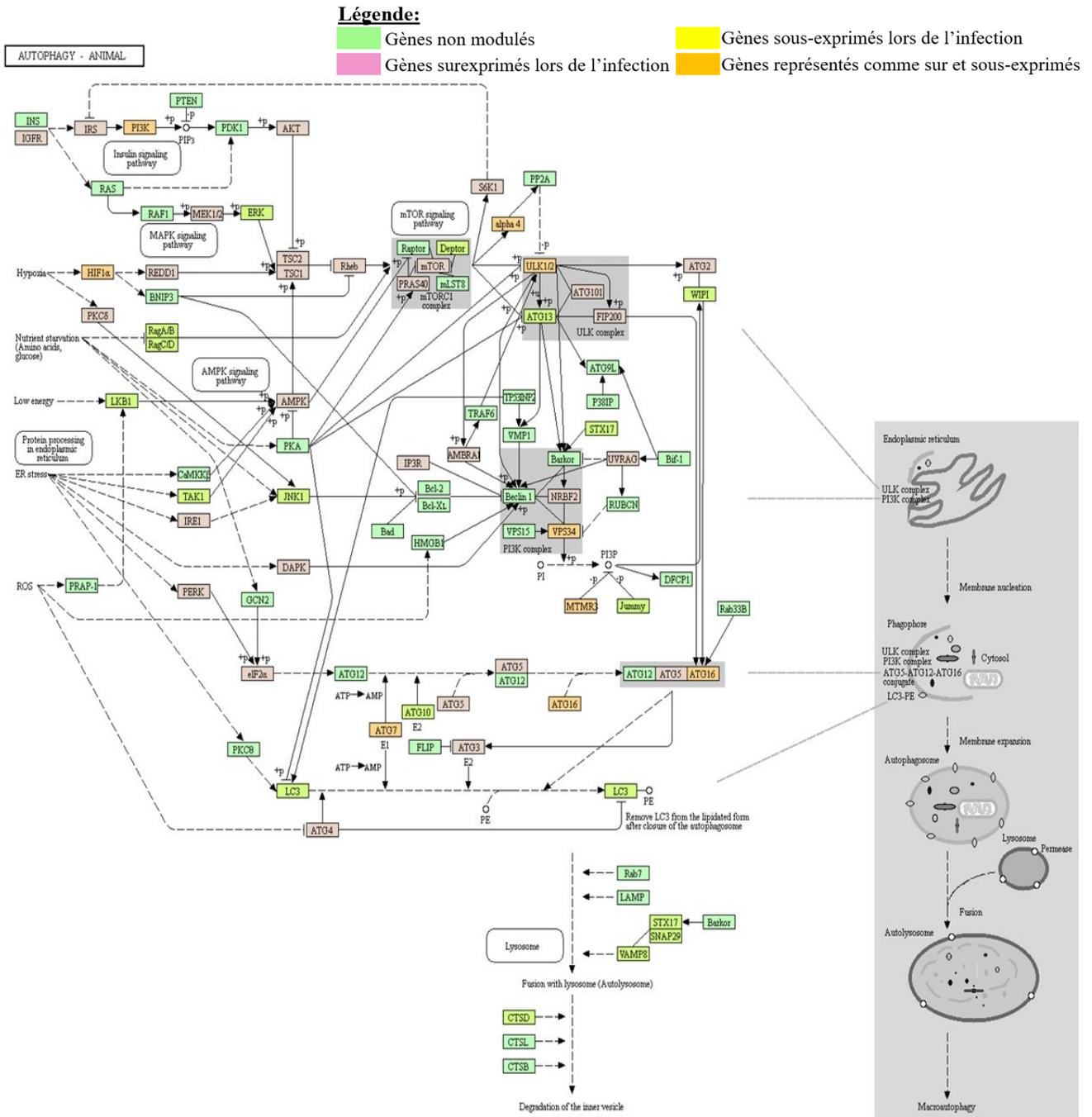


Figure 24. Voie de signalisation de l'autophagie dans les MARC-145 infectées par le VSRRP. Représentée en utilisant le logiciel gratuit en ligne KEGG pathway [85]. Les gènes et transcrits les plus surexprimés et sous-exprimés ont été déterminés à l'aide d'un FDR $p < 0.05$ et d'un FC $>$ ou < 2 .

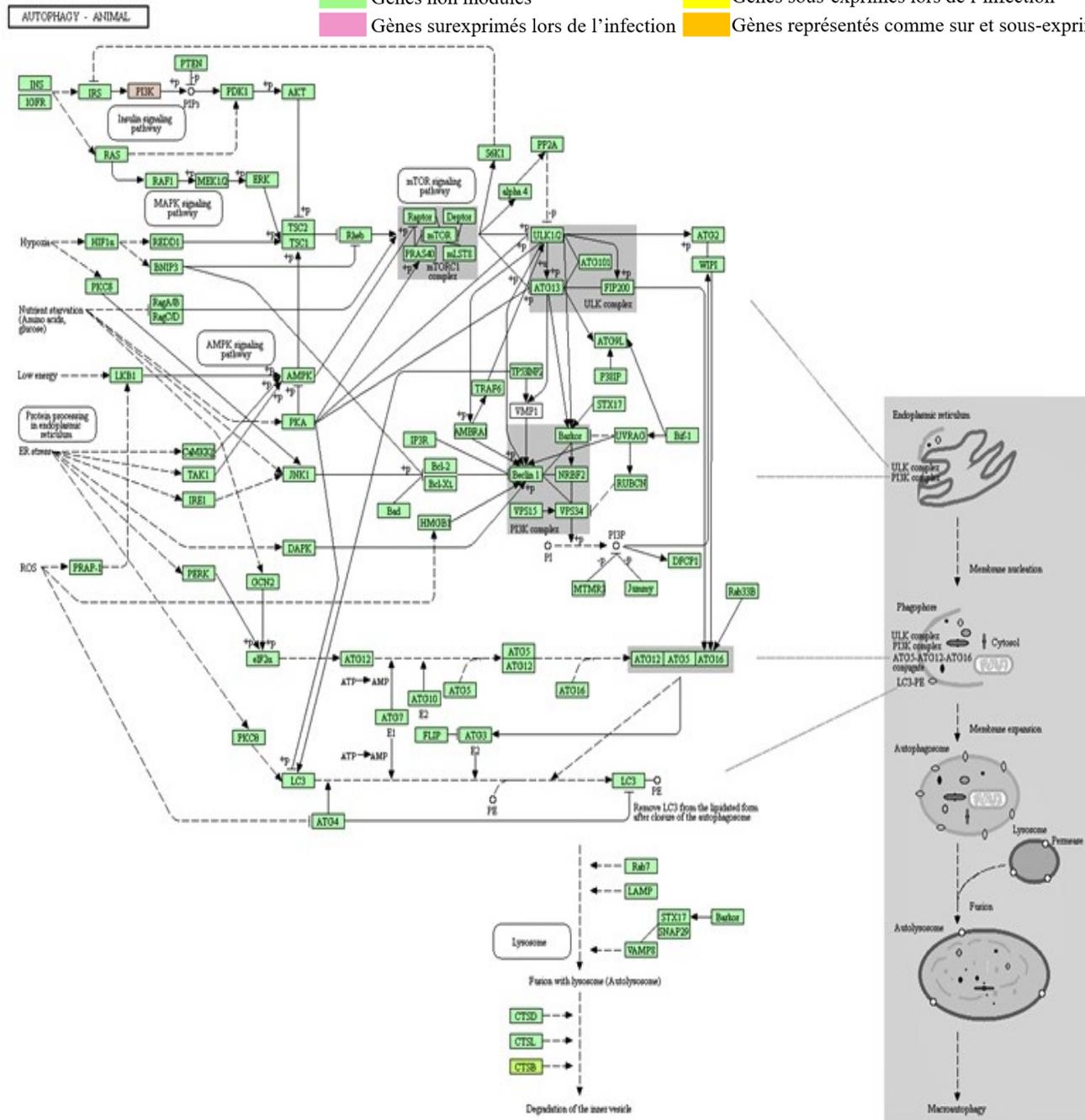
Légende:

■ Gènes non modulés

■ Gènes surexprimés lors de l'infection

■ Gènes sous-exprimés lors de l'infection

■ Gènes représentés comme sur et sous-exprimés



140 20117
Kusuhara Laboratories

Figure 25. Voie de signalisation de l'autophagie dans les cellules NPTr-CD163 infectées. Représentée en utilisant le logiciel gratuit en ligne KEGG pathway [85]. Les gènes et transcrits les plus surexprimés et sous-exprimés ont été déterminés à l'aide d'un FDR $p < 0.05$ et d'un FC $>$ ou $<$ 2.

3. Comparaison des gènes orthologues surexprimés dans les cellules MARC-145 et NPTr-CD163 infectées par le VSRRP

Afin de pouvoir comparer les deux espèces dans un seul et même diagramme de Venn, il faut utiliser les gènes orthologues des deux espèces. Le logiciel OrthoVenn m'a permis de comparer les gènes orthologues de porc (*Sus scrofa*) et de singe (*Chlorocebus sabaues*) à l'aide des fichiers Fasta des séquences protéiques. Au total, il y a 14,166 gènes qui sont partagés entre ces deux espèces (Figure 26). Cependant, puisque ce ne sont pas toutes les mêmes protéines qui sont caractérisées chez les deux espèces, il est difficile de les comparer (Figure 27). Dans ce diagramme de Venn, seulement les transcrits surexprimés ont été utilisés. Dans ceux-ci, 479 transcrits orthologues entre les deux espèces ont été identifiés, alors que 1221 transcrits sont spécifiques à l'espèce *Chlorocebus sabaues*. Ce résultat est particulier, puisque lorsque l'on compare les gènes des deux espèces, seulement 219 sont propres à ce dernier (Figure 26). Cependant, cela suggère que plusieurs gènes expriment chacun, plusieurs transcrits.

Chlorocebus sabaesus

Sus scrofa



Figure 26. Diagramme de Venn des gènes orthologues chez *Chlorocebus sabaesus* et *Sus scrofa*. Représenté en utilisant le logiciel gratuit en ligne OrthoVenn [95]. En vert sont le nombre de gènes retrouvés seulement chez *Chlorocebus sabaesus* et en bleu ceux retrouvés seulement chez *Sus scrofa*. Au centre sont les gènes retrouvés chez les deux espèces.

Chlorocebus sabaesus

Sus scrofa

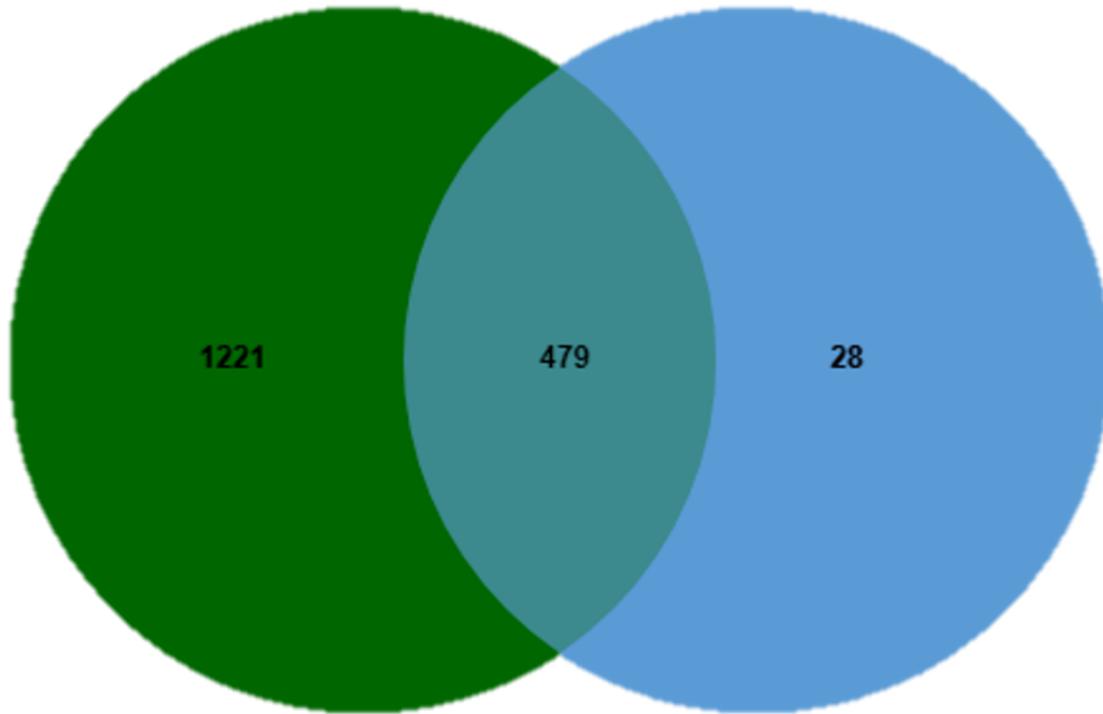


Figure 27. Diagramme de Venn des transcrits surexprimés dans les MARC-145 (*Chlorocebus sabaesus*) et les NPTr-CD163 (*Sus scrofa*) infectées par le VSRRP. Représenté en utilisant le logiciel gratuit en ligne OrthoVenn [95]. En vert sont le nombre de transcrits surexprimés retrouvés seulement chez *Chlorocebus sabaesus* et en bleu ceux retrouvés seulement chez *Sus scrofa*. Au centre sont les transcrits surexprimés retrouvés chez les deux espèces.

Chapitre V : Discussion

1. Adaptation du virus aux cellules sans CD163, les NPTr-N2

Le virus ne s'est pas adapté aux cellules sans récepteur CD163, c.-à-d. les NPTrN2. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les cellules MARC-145 sont utilisées pour la production de lots de virus. Ce modèle expérimental était basé sur les probabilités qu'une mutation ait lieu dans une région importante pour l'entrée du virus dans la cellule qui nécessite l'utilisation du récepteur CD163, par exemple GP2, GP3 ou GP4. Puisque la tentative d'adapter le virus toujours avec 5% plus de cellules NPTr-N2 entre chaque passage n'a pas fonctionné, des passages avec des changements de 10% ont été effectués. En exposant le virus à 10% plus de cellules sans récepteur entre chaque passage, l'idée était d'augmenter la pression sur le virus en l'exposant plus rapidement à des cellules sans récepteur. Cependant, dans les deux cas, le virus a tout simplement continué à se répliquer seulement dans les cellules NPTr-CD163. Aux derniers passages, la charge virale produite par les cellules était plus petite, car la quantité de cellules permissives au virus diminuait à chaque passage subséquent. Il est connu que dans les MARC-145, le virus peut infecter les cellules adjacentes [11]. L'un des mécanismes proposés est que le virus induirait la production de nanotubes intracellulaires et passerait d'une cellule infectée à une cellule non-infectées par ces tubes. Le VSRRP induirait aussi le transfert de mitochondries par ces tubes [96]. Par contre, seules les cellules possédant le récepteur CD163 étaient infectées lors de nos expériences, les cellules adjacentes n'ayant pas de récepteur, elles restaient non-infectées. Cependant, la présence d'un mécanisme d'infection des cellules adjacentes n'a pas été démontrée dans la nouvelle lignée cellulaire génétiquement modifiée, c.-à-d. NPTr-CD163.

Afin d'appliquer une plus grande pression sélective, les virus devraient être passés en alternance avec une autre lignée cellulaire afin de limiter la suradaptation aux cellules possédant le récepteur CD163. Selon Reischl et al (2001), une souche de rhinovirus humain a été adaptée à des cellules ne possédant pas le récepteur ICAM-1 qui est habituellement nécessaire à l'entrée du virus [78]. Pour ce faire, le virus a été utilisé pour infecter alternativement des cellules possédant le récepteur et sur des cellules ne le possédant pas. Après 32 passages, une souche

pouvant se répliquer dans les cellules Hep-2 qui ne possèdent pas de récepteur ICAM-1 a été obtenue. Il serait donc intéressant d'infecter de manière alternative les cellules NPTr-N2 ou iPAM 3D4/21, ne possédant pas le récepteur CD163, et par la suite le possédant (NPTr-CD163 et iPAM-CD163). Une autre façon de vérifier si le virus pourrait s'adapter aux cellules sans CD163, serait de vérifier la capacité de différentes souches virales (c.-à-d. dont le génome viral est différent, et qui proviendraient de différents cas cliniques) à infecter des cellules NPTr-N2. Il serait possible que l'adaptabilité de certaines souches virales soit plus facile dû aux caractéristiques génomiques de celles-ci [97]. Il se pourrait donc que la mutation permettant la répllication du virus dans les cellules sans récepteur CD163 ait déjà eu lieu, le taux de mutation *in vivo* étant plus grand qu'*in vitro* dû à la pression sélective du système immunitaire.

2. Séquençage du génome entier du VSRRP du premier et du dix-huitième passages

Les séquences du VSRRP qui ont été obtenues possèdent un taux de mutation de l'ordre d'environ 0,15% après 18 passages. Ce qui est du même ordre que le taux de mutation que l'ARN polymérase ARN dépendante qui est d'environ 10^{-4} mutations par nucléotide [86]. Puisque le virus a été répliqué en continu dans la même lignée cellulaire, la pression sélective est moindre qu'*in vivo*. Il est possible d'observer que les mutations se retrouvent majoritairement dans la région de l'extrémité 5' du génome, c'est-à-dire de l'ORF1a à 3, et qu'en s'approchant de l'extrémité 3', le taux de mutation diminue graduellement. Il a déjà été démontré que l'extrémité 5' du génome viral était plus variable que celle de l'extrémité 3' [3]. Par contre, chaque gène du VSRRP au 1^{er} passage versus 18 passages possède tout de même un taux de mutation pouvant varier. La mutation retrouvée à la position 12 265 dans l'ORF2b est la seule à causer un changement de conformation dans la protéine encodée. Par contre, l'impact de la structure secondaire de la protéine sur l'action de cette protéine n'a pas été étudié et n'est donc pas connu. Afin de réellement lier l'apparition d'un effet cytopathique causé par le virus avec cette mutation, il faudrait génétiquement modifier le virus afin qu'il possède le nucléotide du premier passage et comparer la pathogenèse du virus avec le nucléotide contenu dans le virus obtenu au dix-huitième passage. En comparant l'impact des virus génétiquement modifiés sur

les cellules, entre autres, s'il y a apparition d'effet cytopathique, il serait possible de confirmer que la mutation joue un rôle dans l'efficacité du virus à causer une mort cellulaire. Pour ce qui est des autres mutations, le fait qu'il n'y a pas de changements de confirmation dans les protéines nsp4 et nsp10 réduit les chances que ces mutations aient eu un impact sur la pathogénicité du virus. La délétion à la position 7208 est en revanche intéressante puisqu'elle se situerait dans la protéine nsp7. Elle devrait donc théoriquement entraîner un décalage du cadre de lecture pour les codons et les gènes suivants. Par contre, un RFS rétablit le cadre de lecture avant la partie codant pour la protéine nsp9, ce qui fait en sorte que cette dernière est fonctionnelle. Le rôle des protéines nsp7 et nsp8 ne sont pas très bien connus. Il est donc difficile d'évaluer l'impact d'une délétion dans cette région. De plus, en regardant plus précisément les données brutes de séquençage à haut débit obtenues pour cette délétion, il est possible d'observer qu'elle était présente dans environ 60% des lectures. Il y a environ 40% de lectures avec un « C » comme dans la séquence du premier passage. Il y a donc deux possibilités à propos de la répartition de cette délétion. Il est possible qu'elle soit arrivée dans les premiers passages, mais n'apportait aucun avantage sélectif et n'a donc pas été particulièrement sélectionné comparativement aux virus n'ayant pas la délétion. Il est aussi possible que la délétion ait eu lieu vers la fin des passages, mais qu'elle se soit répandue puisqu'elle donnait un avantage sélectif. Afin d'avoir une meilleure idée du rôle que cette délétion a pu jouer dans l'application de pression sélective additionnelle, il serait intéressant de séquencer les virus des passages entre le premier et le dix-huitième afin de voir à quel passage la délétion, et chaque mutation sont devenues plus répandues.

3. Modulation des voies de signalisation impliquées dans la mort cellulaire

Les résultats de séquençage des ARNm ont été analysés à l'aide du niveau de l'expression des transcrits (TE) et de l'expression des gènes (GE). Les deux types de résultats ont été utilisés puisqu'ils donnent chacun une information différente pouvant se compléter. Par contre, parfois les résultats obtenus avec le logiciel en ligne KEGG pathway démontraient qu'un gène ou un transcrit était à la fois surexprimé et sous-exprimé. L'une des hypothèses pouvant expliquer ce phénomène est qu'il existe plusieurs transcrits possibles pour un gène. Il se pourrait qu'un des transcrits soit surexprimé tandis que les autres sont sous-exprimés. Le logiciel KEGG pathway prend seulement les identifiants des gènes. En effet, plusieurs transcrits peuvent découler d'un même gène suite à l'épissage alternatif de l'ARNm. Donc, si plusieurs transcrits qui sont surexprimés et sous-exprimés, se retrouvent dans le même gène et donc ont le même identifiant, ils vont pouvoir se retrouver à la fois dans les gènes surexprimés et sous-exprimés.

Au niveau des NPTr-CD163, plusieurs gènes et transcrits ont comme impact d'inhiber l'apoptose, ce qui pourrait expliquer en partie pourquoi il n'y a pas de mort cellulaire dans ces cellules. Il y a tout de même certains gènes pro-apoptotiques surexprimés. Par exemple, le gène FOSB qui se retrouve aussi dans les gènes et les transcrits les plus surexprimés dans les MARC-145 infectées. Le gène FOSB code pour un facteur de transcription de la protéine AP-1 jouant un rôle dans l'activation de l'apoptose [98]. Or, il a été démontré par Pujhari et al. (2014) que la protéine N du VSRRP pouvait activer la protéine AP-1 [26]. Le gène FOSB est aussi présent dans les NPTr-CD163, ce qui pourrait laisser croire que la protéine N serait aussi capable d'activer AP-1 dans cette lignée cellulaire. Il faudrait toutefois plus de validation afin de confirmer que la protéine AP-1 est réellement activée par la protéine N dans les NPTr-CD163. Certains gènes et transcrits pro-apoptotiques sont surexprimés dans les NPTr-CD163, par contre, moins de gènes et transcrits pro-apoptotiques sont exprimés que de gènes pro-survie. Ce qui pourrait influencer l'aboutissement de l'infection et donc l'inhibition de mort cellulaire. À cette étape du projet, il est difficile de déterminer si la surexpression de ces gènes est directement

causée par une (ou plusieurs) protéine virale ou si ce n'est que la réponse cellulaire contre l'infection virale. Plus particulièrement pour les NPTr-CD163, il est difficile de déterminer si la pathogénicité du virus a moins d'impact dans cette lignée cellulaire, ce qui entraîne leur survie, ou si les cellules sont réellement mieux adaptées pour survivre à l'infection.

Dans les 10 gènes les plus sous-exprimés dans les MARC-145 et dans les NPTr-CD163 infectées par le VSRRP, aucun gène n'a déjà aussi été identifié dans la littérature dans les MARC-145 ou les PAM infectées par le VSRRP. Par contre, il est possible d'observer que la majorité des gènes et transcrits sous-exprimés sont impliqués dans le fonctionnement normal de la cellule, par exemple, le transport d'ions (Tableau 13 et Tableau 14). Dans les NPTr-CD16, tout comme dans les MARC-145 infectées, plusieurs gènes et transcrits liés au fonctionnement normal de la cellule sont inhibés.

3.1 Modulation de l'apoptose

L'induction de l'apoptose dans les MARC-145 à 48 heures post-infection n'est qu'à son commencement [99] [69] [13]. C'est pourquoi il est possible d'observer que quelques signes comme la surexpression des ARNm des caspases 3 et 8. Il est aussi possible d'observer que des gènes pro-survie, tels que les IAP/XIAP, sont surexprimés (Figure 20). Aussi, selon Kim et al. (2002), l'apoptose aurait lieu dans les cellules MARC-145 ayant décollées de la matrice de plastique [100]. Les cellules utilisées pour le séquençage des ARNm étaient toujours fixées à la matrice de plastique lors du début de l'extraction. Ce qui pourrait expliquer pourquoi des gènes de survie sont surexprimés. Selon Lee et al. (2007), le niveau d'expression de la caspase 8 augmenterait à 48 heures p.i. ce qui concorde avec les résultats obtenus durant mes travaux de maîtrise [99]. Par contre, nous n'avons pas fait les expériences qui nous permettraient de déterminer si cette surexpression était présente avant 48 heures p.i. De plus, afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats, il serait nécessaire de les valider à l'aide d'un duplicata ou d'un triplicata biologique et d'une confirmation de la modulation de l'expression de la forme active de la protéine par immunobuvardage de type Western.

Selon Costers et al. 2008, le blocage de l'apoptose ne réduit pas le titre viral, ce qui pourrait expliquer qu'il y ait tout de même une production de virions malgré le manque d'ECP dans les NPTr-CD163 [69]. Certains gènes pro-apoptotiques sont aussi surexprimés dans les NPTr-CD163 tels que la protéine AP-1 par la surexpression du gène FOSB. Il y a aussi l'inhibition des IAP/XIAP qui possèdent un rôle dans la survie de la cellule. Par contre, comme démontré dans cette lignée cellulaire avec les gènes les plus surexprimés et les plus sous-exprimés, beaucoup de gènes pro-survie et anti-apoptotiques sont aussi présent et ont probablement un impact sur le résultat de l'infection.

3.2 Modulation de la nécroptose

Plusieurs gènes servant à la régulation de cette voie de signalisation ont été modulés lors de l'infection par le VSRRP des cellules MARC-145. Les protéines RIPK1 et RIPK3 ont un rôle dans l'activation ou l'inhibition de la nécroptose. Ainsi, aucune modulation n'a été observée pour le gène ou transcrite codant pour la protéine RIPK3. Dans les MARC-145, l'ARNm codant pour la protéine RIPK1 est surexprimé, ce qui pourrait indiquer une activation de la nécroptose. De plus, l'ARNm codant pour la protéine MLKL, servant aussi d'indicateur de l'activation de la nécroptose, est aussi surexprimé. Par contre, une autre molécule importante dans la régulation de la nécroptose et de l'apoptose est la caspase 8 dont l'ARNm est surexprimé. Sa surexpression est un signe de l'activation de l'apoptose. Plus précisément, le mécanisme est que la dé-ubiquitination de RIPK1 jumelée à l'inhibition des cIAPs résulte en la formation du complexe ripoptosome FADD-RIPK1-Caspase 8 [101]. Or, dans les MARC-145, les IAPs sont surexprimés. Par contre, la protéine LUBAC, qui a pour rôle d'ubiquitiner les lysines 63 et 11 de RIPK1 et ainsi d'activer la nécroptose [102], est inhibée ce qui démontrerait une activation de l'apoptose. De plus, l'ARNm codant pour la protéine CYLD ayant pour rôle de dé-ubiquitiner RIPK1 et ainsi de promouvoir l'apoptose est aussi surexprimé [103]. Habituellement, puisque la caspase 8 active l'apoptose, plusieurs virus vont tenter de l'inhiber, et par ce fait même, activer la nécroptose [66]. Par contre, à 48 heures post-infection du moins, il n'est pas possible de déterminer si le VSRRP utilise cette stratégie puisque l'ARNm de la caspase 8 est surexprimée. Cette surexpression de la caspase 8 par le VSRRP avait déjà été démontré par

Yuan et al. (2016) [13]. Par contre, d'autres réplicats et une validation de la surexpression de la protéine caspase 8 serait nécessaire afin de confirmer ces résultats. Ces validations seraient aussi nécessaires afin de confirmer si la nécroptose est augmentée ou diminuée dans les MARC-145 infectées par le VSRRP puisque certains marqueurs démontrent une activation de la nécroptose tandis que d'autres démontrent une inhibition de celle-ci au profit de l'apoptose. Il y a fort à parier qu'il existe une modulation de l'expression de ces gènes dans le temps. Tout comme l'apoptose, il serait possible qu'à 48 heures p.i. il y ait un changement entre l'activation et l'inhibition de la nécroptose. Il serait donc aussi intéressant de séquencer les ARNm des MARC-145 à différents temps post-infection afin de vérifier si cette voie de signalisation est modulée par le virus dans le temps.

Pour les NPTr-CD163, il est, encore une fois, difficile de déterminer si cette voie de signalisation est surexprimée ou sous-exprimée et si elle a un réel impact sur le résultat de l'infection par le VSRRP puisque très peu de gènes et transcrits semblent affectés par l'infection du virus. Par contre, l'inhibition des IAPs jumelée à la surexpression de RIPK1 pourrait démontrer une activation de l'apoptose. Pour qu'il y ait une activation de l'apoptose, il devrait toutefois y avoir aussi la surexpression de la caspase 8 afin de permettre la formation de complexe FADD-RIPK1-Caspase 8. Afin de s'assurer qu'une infection par le VSRRP n'entraîne pas une surexpression de la caspase 8 dans les NPTr-CD163, il faudrait d'autres réplicats biologiques avec une plus grande profondeur de lectures. De plus, la présence d'ARNm codant pour la caspase 8 ne donne aucune information quant à l'activation de la protéine. Pour ces raisons, il faudrait aussi s'assurer de la présence de la protéine active dans les cellules infectées par immunobuvardage de type western.

3.3 Modulation de l'autophagie

Quelques molécules clés impliquées dans la régulation de l'autophagie ont été modulées lors de l'infection par le VSRRP des cellules MARC-145. C'est le cas pour le gène LC3 qui a été sous-exprimé dans les MARC-145. Ces résultats sont contradictoires à une autre étude qui aurait démontré que la protéine LC3-II serait surexprimée dans les MARC-145 à 48 heures p.i.

[58]. Par contre, nos résultats de séquençage des ARNm n'ont pas été confirmés par une autre technique. Un autre gène ayant un rôle dans l'activation de l'autophagie et ayant été surexprimé dans les MARC-145 est le gène ATG5. Une autre protéine considérée comme étant un bon marqueur de l'activation ou de l'inhibition de la voie de signalisation de l'autophagie est la protéine mTOR [71]. Or, à 48 heures p.i. dans les MARC-145 infectées, il y a une augmentation de l'expression du gène codant pour la protéine mTOR. Ce qui indiquerait aussi une inhibition de la voie de l'autophagie. L'inhibition de cette protéine avait déjà été démontrée par Pujhari et al. (2014) à 24 heures p.i. dans les MARC-145 avec la souche de type 2 ATCCVR-2385 du VSRRP [26]. Par contre, ils observèrent une diminution de la surexpression de mTOR après 24 heures p.i. ce qui n'est pas le cas de nos résultats obtenus dans les MARC-145 à 48 heures p.i.

Dans les NPTr-C163 par contre, très peu de gènes ont été modulés. Seulement un seul gène a été surexprimé (PI3K) et un seul a été sous-exprimé (CTSB). Dans le cas de PI3K, cette molécule agit dans la régulation de plusieurs voies de signalisation impliquées dans la mort cellulaire, telle que l'apoptose [104]. La protéine de la cathepsine B (CTSB) quant à elle a pour effet de participer à la dégradation des vésicules formées contenant les organelles ou les molécules à détruire [94]. La sous-expression du gène codant pour cette protéine et la surexpression de PI3K suggèrent une inhibition de la voie de signalisation de l'autophagie dans les NPTr-CD163 infectée par la souche IAF-Klop du VSRRP. Par contre, il faudrait une validation par d'autres méthodes afin de confirmer l'inhibition ou l'activation de l'autophagie.

3.4 Utilisation du logiciel en ligne OrthoVenn afin de comparer les gènes et transcrits différentiellement exprimés dans les MARC-145 et les NPTr-CD163 infectées par le VSRRP

Ce type d'analyse n'a pas permis de déterminer les homologues et différences entre les deux lignées cellulaires. Une des raisons est que la quantité de gènes et de transcrits différentiellement exprimés dans les NPTr-CD163 est plus petite que dans les MARC-145, rendant ainsi la comparaison non équivalente. De plus, plusieurs conversions sont nécessaires afin de pouvoir utiliser le logiciel OrthoVenn. Le type de fichier accepté dans le logiciel est de

type Fasta contenant les séquences des protéines à comparer. Or, les résultats de séquençage sont sous forme de liste d'identifiant de gènes ou de transcrits. Il est donc nécessaire de convertir les identifiants des gènes et des transcrits afin d'avoir les identifiants de protéines qui seront à leur tour convertis en fichier de type Fasta contenant les séquences protéiques. Par contre, les gènes et transcrits identifiés n'ont pas tous été caractérisés au niveau protéique. Donc, le fichier de type Fasta obtenu au final pour l'analyse avec le logiciel OrthoVenn ne représente que partiellement les résultats de séquençage des ARNm. La quantité de gènes orthologues entre les deux groupes de gènes différentiellement exprimés est donc aussi altérée par les différentes conversions nécessaires à l'utilisation du logiciel OrthoVenn.

Conclusion

Le VSRRP est un virus d'une grande importance dans l'industrie porcine par son impact sur l'économie de cette industrie. Afin d'entrer dans les cellules, ce virus a besoin du récepteur cellulaire CD163. Dans le but de limiter la propagation du virus chez son hôte, des porcs modifiés afin de ne plus exprimer le récepteur CD163 ont été développés. Ces porcs sont complètement résistants à l'infection par le VSRRP de type 1 et de type 2 et ne comporte aucune différence phénotypique avec les porcs non-modifiés. Par contre, le VSRRP est un virus à ARN. Son génome est donc très enclin à l'accumulation de mutation permettant au virus d'échapper au système immunitaire de l'hôte. Afin de vérifier si le VSRRP pouvait s'adapter à des cellules NPTr-N2, donc ne possédant pas le récepteur CD163, le virus a été exposé à des quantités grandissantes de NPTr-N2. Malheureusement, toutes les tentatives d'adaptation du virus ont échoué, le virus ne s'étant pas adapté. Afin d'appliquer une plus grande pression sélective, il aurait été possible de faire des passages alternatifs sur NPTr-CD163 et PAM 3D4/21, une lignée de macrophages alvéolaires porcins immortalisés ne possédant pas, ou possédant en très faible quantité, le récepteur CD163. Une autre méthodologie aurait été d'incuber des souches virales provenant de plusieurs cas cliniques de VSRRP directement sur NPTr-N2. La variation génétique du virus provenant des cas *in vivo* étant plus grande, il serait donc possible que la mutation permettant la réplication du virus dans des cellules sans récepteur CD163 soit déjà partiellement répandue. Lors des passages sur 100% de cellules NPTr-CD163, qui servait à titre de contrôle positif, un changement de morphologie des cellules pouvant s'apparenter à de l'ECP a été observé lors du dix-huitième passage. Le génome viral des virus contenus dans le premier et le dix-huitième passage des contrôles 100% NPTR-CD163 ont donc été séquencés par SHD. Les résultats obtenus ont permis d'identifier les mutations ayant eu lieu. Par contre, aucune ne permet d'expliquer clairement le changement morphologique des cellules du 18^e passage lors de leur infection.

Le VSRRP est un virus causant habituellement de l'ECP dans les cellules qu'il infecte. Par contre, ce n'est pas le cas dans les NPTr-CD163. Afin de déterminer si les NPTr-CD163 étaient mieux adaptées pour survivre à l'infection que les MARC-145, les ARNm des deux lignées cellulaires infectées et non-infectées ont été séquencés par SHD. Les résultats obtenus

ont permis d'observer que dans les MARC-145 infectées avec la souche IAF-Klop à 48 heures p.i. des gènes et de transcrits pro-apoptotiques ont majoritairement été surexprimés. Malgré tout, il y a tout de même la présence de gènes et de transcrits anti-apoptotiques, indiquant qu'il y a probablement une inhibition de l'apoptose avant 48 heures p.i. Par contre, il est plus difficile de tirer une conclusion avec les NPTr-CD163. Il y a surexpression de gènes et de transcrits pro-apoptotiques, par contre beaucoup de gènes et de transcrits codant pour des protéines ayant un rôle dans la survie de la cellule sont aussi surexprimés. Il serait donc possible que le virus induise la surexpression de certains gènes ou transcrits liés à la mort cellulaire, mais que la cellule étant mieux adaptée survive à l'infection. Il faudrait par contre d'autres réplicats biologiques afin de s'assurer de la validité des résultats obtenus statistiquement. Afin de s'assurer que les protéines codées par ces gènes et transcrits sont réellement modulées lors de l'infection, il serait aussi nécessaire de valider la présence de celles-ci par immunobuvardage de type Western. Afin d'avoir une meilleure idée de l'impact réelle du VSRRP dans les NPTr-CD163, il serait intéressant de vérifier la modulation des ARNm à différents temps post-infection. Puisqu'il a été démontré qu'il y avait une modulation dans le temps dans les MARC-145, c'est probablement aussi le cas dans les NPTr-CD163. De plus, la compagnie Qiagen (Qiagen, Toronto, Canada) offre maintenant une nouvelle approche de préparation des bibliothèques pour le séquençage d'ARNm, le « QIAseq UPX 3' transcriptome kit ». Cette approche consiste à séquencer seulement la partie 3' de l'ARNm. Un seul ARNm serait donc représenté par une seule lecture à l'instar de plusieurs, permettant ainsi d'avoir une meilleure profondeur avec le même nombre de lectures. Cette méthode permettrait de mieux rentabiliser les réactions de séquençage pour le même nombre d'échantillons.

Bibliographie

1. Keffaber, K.K., *Reproductive failure of unknown etiology*. American Association of Swine Practitioners Newsletter, 1989. **1**: p. 1-9.
2. Lefkowitz E.J., D.D.M., Hendrickson R.,C., Orton R.J., Siddell S.G. et Smith D.B., *Virus Taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*. Nucleic Acids Research, 2018. **46**: p. D708-D717.
3. A. Kappes M., e.S.F.K., *PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity*. Virology, 2015. **479-480**: p. 475-486.
4. Tian K., Y.X., Zhao T., Feng Y., Cao Z., Wang C., *Emergence of Fatal PRRSV Variants: Unparalleled Outbreaks of Atypical PRRS in China and Molecular Dissection of the Unique Hallmark*. PLoSOne 2007(6).
5. Mang S., L.P., Singh Brar M., A. Suchard M., P. Murtaugh P., Carman S., et al. , *The Spread of Type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) in North America: A Phylogeographic approach*. Virology, 2013. **447**(1-2): p. 146-154.
6. Van Breedam W., L.D.P., Van Gorp H., Misinzo G., Vanderheijden N., Duan X. et J. Nauwynck H., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage*. Journal of General Virology, 2010. **91**: p. 1659-1667.
7. Jay G. Calvert, D.E.S., Shelly L. Shields, Rika Jolie, Ramasamy M. Mannan, and R.G.A.e.S.-K.W. Welch, *CD163 Expression Confers Susceptibility to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses*. Journal of Virology, 2007. **81**(18): p. 7371-7379.
8. Siao-Kun W. Welch, J.G.C., *A brief review of CD163 and its role in PRRSV infection*. Virus Research, 2010. **154**: p. 98-103.
9. Huaqiang Yang, J.Z., Xianwei Zhang, Junsong Shi, Yongfei Pan, Rong Zhou, Guoling Li, Zicong Li, Gengyuan Cai and Zhenfang Wu, *CD163 knockout pigs are fully resistant to highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. Antiviral Research, 2017.
10. Burkard C., L.S.G., Reid E., Jackson B., Mileham A.J., Ait-Ali T., Whitelaw C.B.A et Archibald A.L., *Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: macrophages from genome edited pigs lacking CD163 SRCR5 domain are fully resistant to both PRRSV genotypes while maintaining biological function*. PLOS Pathogens, 2017: p. 1-28.
11. Cafruny W.A., D.R.G., Wong G.H.W., Said S., Ward-Demo P., Rowland R.R.R. et Nelson E.A, *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection spreads by cell-to-cell transfer in cultured MARC-145 cells, is dependent on an intact cytoskeleton, and is suppressed by drug-targeting of cell permissiveness to virus infection*. Virology Journal, 2006. **3**(90): p. 1-17.
12. H. J. Nauwynck, X.D., H. W. Favoreel, P. Van Oostveldt et M. B. Pensaert, *Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis*. Journal of General Virology, 1999. **80**: p. 297-305.
13. Yuan S., Z.N., Xu L., Zhou L., Ge X., Guo X., et Yang H., *Induction of apoptosis by the Nonstructural Protein 4 and 10 of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. PLoSOne, 2016: p. 1-21.

14. Albina., E., *Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): An overview*. Veterinary Microbiology, 1997. **55**(1-4): p. 306-316.
15. Benfield D.A., N.E., E. Collins J.E., Harris L., M.Goyal S., Robinson D., Christianson W.T., Morrison R.B., Gorcyca D. et Chladek D., *Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332)*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 1992. **4**: p. 127-133.
16. Goyal, M., *Review article: porcine and reproductive syndrome*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 1993. **5**: p. 656-664.
17. J. Holtkamp D., B.K.J., J.Neumann E., Zimmerman J.J., Rotto H.F., Yoder T.K., et al, *Assessnebt if tge economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers*. Journal of Swine and Health Production, 2012. **21**(2): p. 72-84.
18. Morin M., C.J., Poljack Z., Rivest J., Urizar L. et Klopfenstein C. *PRRS economic impact simulation tool for regional control and eradication projects in Canada*. in *IPVS Congress*. 2014. Cancun, Mexique.
19. Wensvoort G., P.d.K.E., M.A. Pol J., Wagenaar F., J.M. Moormann R., H.Hulst M., et al, *Lelystad virus, the cause of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome: a review of mystery swine disease research at Lelystad*. Veterinary Microbiology, 1992. **33**: p. 185-193.
20. E. Collins J., A.B.D., T. Christianson W., Harris L., C. Hennings J., P. Shaw D., et al, *Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs*. Journal of Veterinary Investigation, 1992. **4**: p. 117-126.
21. Zimmerman J.J., Y.K.-J., Pirtle E.C., Wills R.W., Sanderson T.J. et McGinley M.J., *Studies of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection in avian species*. Veterinary Microbiology, 1997. **55**: p. 329-336.
22. Dea S., G., C.A., Mardassi H, Pirzadeh B. et Rogan D., *Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates*. Archives of virology, 2000. **145**(4): p. 659-688.
23. Doan D.N., D., T., *Structure of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. Structure, 2003. **11**: p. 1445-1451.
24. Spilman M.S., W.C., Nelson E. et Dokland T., *Cryo-electron tomography of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: organization of the nucleocapsid*. Journal of General Virology, 2009. **90**: p. 527-535.
25. Music N., e.G.C.A., *The role of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus structural and non-structural proteins in virus pathogenesis*. Animal Health and Research Reviews, 2010. **11**(2): p. 135-163.
26. Pujhari S., K.M., et Zakhartchouk A.N., *role of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) and the mammalian target of rapamycin (mTOR) sgnalling pathways in porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) replication*. Virus Research, 2014. **194**: p. 138-144.
27. Fang Y., T.E.E., Li Y., Tas A., Sun Z., Van der Meer Y., et al., *Efficient -2 frameshifting by mammalian ribosomes to synthesize an additional arterivirus protein*. PNAS, 2012. **109**(43): p. 2920-2928.

28. Li Y., S.P., Shyu D., Carrillo C., Naraghi-Arani P., Jaing C.J., et al., *Nonstructural proteins nsp2TF and nsp2N of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) play important roles in suppressing host innate immune responses*. *Virology*, 2017.
29. Van den Born E., P.C.C., Gulyaev A.P. et Snijder E.J., *Discontinuous subgenomic RNA synthesis in Arteriviruses is guided by an RNA hairpin structure located in the genomic leader region*. *Journal of Virology*, 2005. **79**(10): p. 6312-6324.
30. Dokland, T., *The structural biology of PRRSV*. *Virus Research*, 2010. **154**: p. 86-97.
31. Brown E., L.S., Welbon C., Gnanandarajah J., Li J., Murtaugh P.M., et al., *Antibody Response to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Nonstructural Proteins and Implications for Diagnostic Detection and Differentiation of PRRSV Types I and II*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2009. **16**(5): p. 628-635.
32. Gao J., J.P., Zhang M., Wang X., Li., Wang C., et al., *GP5 expression in Marc-145 cells inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection by inducing beta interferon activity*. *Veterinary Microbiology*, 2014. **174**: p. 409-418.
33. Chen Z., L.S., Sun Z., Zhou X., Guan X., Christopher-Hennings J. et al., *Identification of two auto-cleavage products of nonstructural protein 1 (nsp1) in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected cells: nsp1 function as interferon antagonist*. *Virology*, 2010. **398**: p. 87-97.
34. Bordon, Y., *Hushing mTOR boosts immunity to pathogens*. *Nature Reviews Immunology*, 2013. **13**.
35. Drigo M., G.E., Lazzaro M., Pasotto D., Bilato D., Ruggeri J., et al., *Comparative evaluation of immune responses of swine in PRRS-stable and unstable herds*. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2018. **200**: p. 32-39.
36. Zhang H., G.X., Nelson E., Christopher-Hennings J., et Wang X., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus activates the transcription of interferon alpha/beta in monocyte-derived dendritic cells (Mo-DC)*. *Ετησίαια Μικροβιολογία*, 2012. **159**: p. 494-498.
37. Loving C.L., B.S.L., et Sacco R.E., *Differential type I interferon activation and susceptibility of dendritic cell populations to porcine arterivirus*. *Immunology*, 2006. **120**: p. 217-229.
38. Calzada-Nova G., S.W.M., Husmann R.J., et Zuckermann F.A., *North American porcine reproductive and respiratory syndrome viruses inhibit type I interferon production by plasmacytoid dendritic cells*. *Journal of Virology*, 2011. **85**(6): p. 2703-2713.
39. Chareerntantakul W., e.F.J.D., *Saponin Quil A up-regulates type I interferon-regulated gene and type I and type II interferon expressions which are suppressed by porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2018. **195**: p. 76-83.
40. Dalsgaard, K., *Adjuvants*. *Veterinary immunology and immunopathology*, 1987. **17**(1-4): p. 145-152.
41. Song C., K.P., et Yoo D., *Nonstructural protein 1α subunit-based inhibition of NF-κB activation and suppression of interferon-β production by porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. *Virology*, 2010. **407**(2): p. 268-280.
42. Chen X., B.J., Liu X., Song Z., Zhang Q., Wang X., et Jiang P., *Nsp1α of PRRSV strain BB0907 impairs the function of monocyte-derived dendritic cells via the release of soluble CD83*. *Journal of Virology*, 2018. **92**(15): p. 20.

43. Fu Y., Q.R., Zhang H., Hou J., Tang J., et Wen-hai F., *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Induces Interleukin-15 through the NF- κ B Signaling Pathway*. journal of Virology, 2012. **86**(14): p. 7625-7636.
44. Waldmann, T.A., *The biology of interleukin-2 and interleukine-15: implications for cancer therapy and vaccine design*. Nature Reviews Immunology, 2006. **6**: p. 595-602.
45. Chen W.-Y., S.W.M., Calzada-Nova G., et Zuckermann F.A., *Genotype 2 strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus dysregulate alveolar macrophages cytokine production via the unfolded protein response*. journal of Virology, 2018. **92**(2): p. 1-24.
46. Nishitoh, H., *CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response*. Journal of Biochemistry, 2011. **151**(3): p. 217-219.
47. Xie J., C.I., Yang B., Van Breedam W., Cui T., et Nauwynck H.J., *Molecular cloning of porcine Siglec-3, Siglec-5 and Siglec-10, and identification of Siglec-10 as an alternative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)*. Journal of General Virology, 2017: p. 1-13.
48. Gao J., X.Y., Wang X. Zhang C., Zhao Q., Nan Y., et al., *MYH9 is and essential factor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection*. Nature Scientific Reports, 2016. **6**(25120): p. 1-13.
49. Graversen J.H., e.M.S.K., *Drug trafficking into macrophages via the endocytic receptor CD163*. Membranes, 2015. **5**: p. 228-252.
50. Hanne Van Gorp, P.L.D., Wander Van Breedam et Hans J. Nauwynck, *The porcine reproductive and respiratory syndrome virus requires trafficking through CD163-positive early endosomes, but not late endosomes, for productive infection*. Archives of virology, 2009. **154**: p. 1939-1943.
51. Wang T-Y., L.-G., Li L., Wang G., Wang H-M., Zhang H-L., et al., *Porcine alveolar macrophages CD163 abundance is a pivotal switch for porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection*. Oncotarget, 2018. **9**(15): p. 12174-121185.
52. Randall S. Prather, K.M.W., Susan K. Schommer, Kevin D. Wells, *Genetic engineering alveolar macrophages for host resistance to PRRSV*. Veterinary Microbiology, 2016: p. 6.
53. J. F. R. Kerr, A.H.W.e.A.R.C., *Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissues kinetics*. Br. J. Cancer, 1972. **26**: p. 239-257.
54. Miller L.C., e.F.J.M., *Apoptosis and porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. veterinary immunology and immunopathology, 2004. **102**(131-142).
55. Logue S.E., e.M.S.J., *caspase activation in apoptosis*. Biochemical Society Transactions, 2008. **36**(1): p. 1-9.
56. Bao Q., e.S.Y., *Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases*. Cell death and differentiation, 2007. **14**: p. 56-65.
57. Wang X., S.C., Wang L., Li Q., Song H., et Fang W., *The viral non-structural protein 1 alpha (Nsp1 α) inhibits p53 apoptosis activity by increasing murine double minute 2 (mdm2) expression in porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) early-infected cells*. Veterinary Microbiology, 2016. **184**: p. 73-79.
58. Li S., W.J., Zhou A., Khan F.A., Hu L., et Zhang S., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus triggers mitochondrial fission and mitophagy to attenuate apoptosis*. Oncotarget, 2016. **7**(35): p. 56002-56013.

59. Majno G., e.J.I., *Apoptosis, Oncosis and Necrosis*. American Journal of Pathology, 1995. **146**(1): p. 3-16.
60. Labarque G., V.G.S., Nauwynck H., Van Reeth K., et Pensaert M., *Apoptosis in the lungs of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and associations with the production of apoptogenic cytokines*. veterinary research, 2003. **34**: p. 249-260.
61. Lee S-M., e.K.S.B., *porcine arterivirus activates the NF-kB pathway through Ikb degradation*. Virology, 2005. **342**: p. 47-59.
62. Zakhartchouk, S.P.e.A.N., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus envelope (E) protein interacts with mitochondrial proteins and induces apoptosis*. Archives of virology, 2016: p. 1821-1830.
63. Huo Y., F.L., Yin S., Dong Y., Guo X., Yang H., et Hu H., *involvement of unfolded protein response, p53 and Akt in modulation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-mediated JNK activation*. Virology, 2013. **444**: p. 233-240.
64. Schwartz L.M., S.S.W., Jones M.E.E., et Osborne B.A., *Do all programmed cell death occur via apoptosis?* Proc. Natl.Acad.Sci, 1993. **90**: p. 980-984.
65. Kaczmarek A., V.P., et Krysko D.V., *Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance*. Cell Press, 2013.
66. Feltham R., V.J.E., et Lawlor K.E., *Caspase-8: not so silently deadly*. Clin. Transl. immunology, 2017. **6**(6).
67. Mocarski E.S., G.H., et Kaise W.J., *Necroptosis: the trojan horse in cell autonomous antiviral host defense*. Virology, 2015: p. 479-480.
68. Omoto S., G.H., Talekar G.R., Roback L., Kaiser W.J., et Mocarski E.S., *Suppression of RIP3-dependent Necroptosis by human cytomegalovirus*. The Journal of Biological Chemistry, 2015. **290**(18): p. 11635-11648.
69. Sarah Costers, D.J.L., Peter L. Delputte et Hans J. Nauwynck, *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus modulates apoptosis during replication in alveolar macrophages*. Archives of virology, 2008. **153**: p. 1453-1465.
70. Glick D., B., et Macleod K.F., *Autophagy: cellular and molecular mechanisms*. Journal of Pathology, 2010. **221**(1): p. 3-12.
71. Levine B., e.K.G., *autophagy in the pathogenesis of disease*. Cell, 2008. **132**(1): p. 27-42.
72. Codogno P., e.M.A.J., *Atg5: more than an autophagy factor*. nature, 2006. **8**(10): p. 1045-1047.
73. Mizushima N., N.T., Yoshimori T., Tannaka Y., Ishii T., George M.D. et al, *A protein conjugation system essential for autophagy*. Nature, 1998. **395**: p. 395-398.
74. Wang K., L.S., Worku T., Hao X., Yang L., et Zhang S., *Rab11a is required for porcine reproductive and respiratory syndrome virus induced autophagy to promote viral replication*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017. **492**: p. 236-242.
75. Zhou A., I.S., Khan F.A., et Zhang S., *autophagy postpones apoptotic cell death in PRRSV infection through Bad-Beclin1 interaction*. Virulence, 2016. **7**(2): p. 98-109.
76. Sun M-X., H.L., Wang R., Yu Y-L., Li C., Li P-P., et al. , *porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces autophagy to promote virus replication*. Autophagy, 2012. **8**(10): p. 1434-1447.

77. Wang G., Y.Y., Tong J., Liu Y., Zhang C., Chang Y., et al., *Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection induced apoptosis and autophagy in thymi of infected piglets*. PLoSOne, 2015. **10**(6).
78. Reischl A., R.M., Winsauer G., Moser R., Gösler I. et Blaas D., *Viral evolution toward change in receptor usage: adaptation of a major group human rhinovirus to grow in ICAM-1-negative cells*. Journal of Virology, 2001. **75**(19): p. 9312-9319.
79. Ferrari M., S.A., Losio M.N., Corradi A., Soncini M., Bignotti E., et al., *Establishment and characterization of two new pigs cell lines for use in virological diagnostic laboratories*. Journal of Virological Methods, 2003. **107**: p. 205-212.
80. Provost C., H.G., Gagnon C.A. et Meurens F., *Dual infections of CD163 expressing NPTr epithelial cells with influenza A virus and PRRSV*. Veterinary Microbiology, 2017. **207**: p. 143-148.
81. Kim H.S., K.J., Yoon I.J., Joo H.S. et Frey M.L., *Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line*. Archives of virology, 1993. **133**(3-4): p. 477-83.
82. Gonin P., M.H., Gagnon C.A., Massie B. et Dea S., *A nonstructural and antigenic glycoprotein is encoded by ORF3 of the IAF-Klop strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. Archives of virology, 1998. **143**: p. 1927-1940.
83. Payment P., T.M., *Manuel de techniques virologiques*. 1989, Laval, Québec: Presse de l'Université du Québec. 355.
84. Consortium, T.U., *UniProt: the universal protein knowledgebase*. Nucleic Acids Research, 2017. **45**: p. 158-169.
85. Kanehisa M., F.M., Tanabe M., Saton Y. et Morishima K., *KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs*. Nucleic Acids Research, 2017. **45**: p. 353-361.
86. Lauring S.A., A.R., *Quasispecies Theory and the Behavior of RNA Viruses*. PLOS Pathogens, 2010. **6**(7): p. 1-8.
87. Chang C.-C., Y.K.-J., Zimmerman J.J., Harmon K.M., Dixon P.M., Dvorak C.M.T et Murtaugh M.P., *Evolution of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus during Sequential Passages in Pigs*. Journal of Virology, 2002. **76**(10): p. 4750-4763.
88. Duggal N.K., E.M., *Evolutionary conflicts between viruses and restriction factors shape immunity*. Nature Reviews Immunology, 2012. **12**(10): p. 687-695.
89. Sankoff D., C.R.J.e.L.G., *Frequency of Insertion-Deletion, Transversion, and Transition in the evolution of 5S Ribosomal RNA*. Journal of Molecular Evolution, 1976. **7**: p. 133-149.
90. Ashok Kumar, T., *CFSSP: Chou and Fasman Secondary Structure Prediction Server*. Wide Spectrum: Research Journal, 2013. **1**(9): p. 15-19.
91. Badaoui B., R.T., Anselmo A., Vanhee M., Hauwynck H., Giuffra E. et Botti S., *RNA-Sequence analysis of Primary Alveolar Macrophages after In Vitro infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of differing virulence*. Plos One, 2014. **9**(3): p. 13.
92. Amin P., F.M., Najafov A., Pan H., Geng J., Ofengeim D. et al, *Regulation of a distinct activated RIPK1 intermediate bridging complex I and complex II in TNFa-mediated apoptosis*. PNAS, 2018. **115**(26): p. 10.
93. Chen Z.-H., C.J.-F., Zhou J.-S., Liu H., Che L.-Q., Mizumura K. et al., *Interaction of calveolin-1 with ATG12-ATG5 system suppresses autophagy in lung epithelial cells*.

- American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology, 2014. **306**(11): p. 1016-1025.
94. Piippo N., K.E., Hytti M., Kinnunen K., Kaarniranta K. et Kauppinen A., *Oxidative stress is the principal contributor to inflammasome activation in retinal pigment epithelium cells with defunct proteasomes and autophagy*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2018. **49**: p. 359-367.
 95. Wang Y., C.-D.D., Chen G. et Gu Y.Q., *OrthoVenn: a web server for genome wide comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species*. Nucleic Acids Research, 2015. **43**: p. 78-84.
 96. Guo R., D.D.e.F.Y., *Intercellular transfer of mitochondria rescues virus-induced cell death but facilitates cell-to-cell spreading of porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. Virology, 2018. **517**: p. 122-134.
 97. Brockmeier S.L., L.C.L., Vorwald A.C., Kehrl J. M.E., Baker R.B., Nicholson T.L., et al *Genomic sequence and virulence comparison of four Type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains*. Virus Research, 2012. **169**(1): p. 212-221.
 98. Karin M., L.Z.e.Z.E., *AP-1 function and regulation*. Current opinion in cell biology, 1997. **9**(2): p. 240-246.
 99. Lee S-M., e.K.S.B., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis through a mitochondria-mediated pathway*. Virology, 2007. **365**: p. 419-434.
 100. Kim T.S., B.D.A.e.R.R.R.R., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced cell death exhibits features consistet with a nontypical form of apoptosis*. Virus Research, 2002. **85**: p. 133-140.
 101. Silke J., R.J.A.e.G.M., *The diverse role of RIP kinase in necroptosis and inflammation*. Nature immunology, 2015. **16**(7): p. 689-697.
 102. Moriwaki K., B.J., Gough P.J., Orłowski G.M. et Chan F.K.M., *Differential roles of RIPK1 and RIPK3 in TNF-induced necroptosis and chemotherapeutic agent-induced cell death*. Cell Death and Disease, 2015. **6**: p. 11.
 103. Moquin D.M., M.T.e.C.F.K.-M., *CYLD deubiquitinates RIP1 in the TNF α -induced necrosome to facilitate kinase activation and programmed necrosis*. Plos One, 2013. **8**(10): p. 15.
 104. Jellusova J., R.R.C., *The PI3K pathway in B cell metabolism*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2016. **51**(5): p. 359-378.

Annexes

I. Liste des bourses obtenues

Bourse de dépannage, Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole (CRIPA), 2018.

II. Liste des publications révisées par les pairs

Burgher Y, Köszegi M, Grenier St-Sauveur V, Fournier D, Lafond-Lambert C, Provost C et Gagnon C.A, First report of *Ureaplasma diversum*, a bovine pathogen, in the respiratory tract of swine in Canada. Canadian Veterinary Journal. 2018. 59(12). p.1333-1337.

III. Participation à des congrès

Köszegi M, Provost C et Gagnon C.A. Gene expression modulation within NPTr-CD163 infected cells which are resistant to cell death induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Congrès de l'association canadienne de virologie (CSV), Université Dalhousie, Halifax, Nouvelle-Écosse, Canada, juin 2018. Présentation d'affiche.

Köszegi M, Provost C et Gagnon C.A. Gene expression modulation within NPTr-CD163 infected cells which are resistant to cell death induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Symposium annuel du CRIPA, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, mai 2018. Présentation d'affiche.

IV. Participation à l'enseignement

1. Aide à la correction des examens de premier cycle. D'octobre 2016 à mai 2018.
2. Surveillance d'examens de premier cycle. De septembre 2017 à mai 2018
3. Participation à une activité de supervision de 2 stagiaires d'un jour du Cégep de Saint-Hyacinthe. Le 7 mars 2018.