

Université du Québec  
Institut National de la Recherche Scientifique  
Institut Armand-Frappier

**IMPACT DE LA PROTEINE V DES MORBILLIVIRUS SUR LES VOIES  
DE SIGNALISATION DE L'IMMUNITE**

Par  
Christophe Goncalves

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en virologie et immunologie

**Jury d'évaluation**

Président du jury et examineur interne	Mathieu Cellier INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Nathalie Grandvaux Université de Montréal
Directeur de recherche	Veronika von Messling INRS-Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	Pascale Duplay INRS-Institut Armand-Frappier

*En Sciences, il faut savoir être une  
coccinelle, cannibale et prédateur.*

**Daniel Coderre  
(16 Février 2011)**

*Big things have small beginnings.*

**David  
(Juin 2012)**

## RÉSUMÉ

Le genre *Morbillivirus* comprend entre autre le virus de rougeole (MeV) et le virus de la maladie de Carré (CDV), des agents pathogènes majeurs chez leurs hôtes respectifs. L'un des signes caractéristiques de cette infection est l'apparition d'une immunosuppression chez l'hôte empêchant l'établissement d'une réponse immunitaire nécessaire pour neutraliser l'infection. Cette immunosuppression est principalement induite par la synthèse de la protéine V, responsable de la virulence. En effet, elle est capable de bloquer les voies de signalisation des interférons de type I en interagissant avec l'ARN hélicase MDA5 ou bien les facteurs de transcription STAT1 et STAT2.

Au cours de précédant travaux, nous avons observé une induction différentielle des gènes stimulés par les interférons (ISG) en présence de protéines V mutées sur le résidu Y110 incapable d'interagir avec STAT1 ou sur la cystéine C255 empêchant l'interaction avec STAT2 et MDA5. Afin d'identifier des ISG et des voies de signalisations responsables d'une réponse antivirale contre le CDV, nous avons effectué une étude transcriptomique avec les différentes protéines V. Nous observons la présence de deux profils transcriptionnels distincts. Le premier correspond à une forte induction des ISG en absence ou en présence de la protéine V mutée sur le résidu C255 (VC255S) tandis qu'un second profil montre une réduction importante de l'induction des ISGs en présence de la protéine VWT et de la protéine V mutée sur le résidu Y110 (VY110H). Parmi cette diminution, on observe l'absence de protéines majeures de l'immunité innée comme la voie d'induction des IFN ou de la voie des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH). Pour mieux caractériser le rôle de la protéine V sur le CMH, nous avons confirmé par PCR en temps réel l'expression des gènes de la voie du CMH et nous observons une diminution en présence de la protéine V des gènes de la voie classique tels que HLA et TAP. Nous avons de plus montré par cytométrie en flux que l'induction de l'expression à la surface de CMH de classe I était diminuée en présence de V.

En conclusion, cette étude a contribué à la caractérisation du rôle de la protéine V sur l'immunosuppression. En bloquant les voies des interférons, elle inhibe la

synthèse de gènes de la réponse antivirale et de l'immunité innée et en interférant avec la voie de CMH, elle empêcherait la présentation à la surface de la cellule d'antigènes viraux diminuant l'établissement et l'efficacité d'une réponse immunitaire adaptative.

---

Christophe Goncalves

---

Veronika von Messling,  
directrice de recherche

---

Pascale Duplay,  
co-directrice de recherche

## **REMERCIEMENTS**

Je tiens tout d'abord à remercier le Dre Veronika von Messling, ma directrice de recherche, et le Dre Pascale Duplay, ma co-directrice de recherche, de m'avoir permis d'entreprendre ces recherches dans leur laboratoire et de m'avoir permis de l'achever. Je tiens à leur exprimer toute ma gratitude.

Je tiens également à remercier mes nombreux collègues de travail avec qui nous avons pu partager les bons moments propres et rendre ces années plus faciles. Je remercie tout particulièrement Ronan pour son aide, Danielle pour ses conseils, Sébastien pour son humour, et Xiao être restée elle-même. Je remercie également Nick, Penny, Louis, Alexandre, Éveline, Bevan et Stéphane, Isabelle, Chantal et Karola pour leur aide.

Je remercie également les professeurs de l'institut, les membres de l'administration ainsi qu'Anne Phillipon pour leur aide ainsi que le soutien de tous les étudiants de l'Institut.

J'aimerais finalement remercier tous les membres de ma famille qui m'ont encouragé et soutenu durant mes études universitaires.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>III</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>V</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>VI</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>X</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>XI</b>
<b>CHAPITRE 1 - REVUE DE LITTÉRATURE</b> .....	<b>1</b>
1.1 <b>LES MORBILLIVIRUS</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Taxonomie.....	<b>1</b>
1.1.2 Morphologie, organisation génomique et réplication .....	<b>1</b>
1.1.3 La protéine V.....	<b>6</b>
1.2 <b>LA PATHOGENESE MORBILLIVIRALE</b> .....	<b>9</b>
1.2.1 Les cellules immunitaires, cibles principales du virus.....	<b>10</b>
1.2.2 Les effets de l'infection sur la réponse immunitaire .....	<b>10</b>
1.2.3 Les protéines virales dans l'immunosuppression .....	<b>11</b>
1.3 <b>INTERFERENCE AVEC L'IMMUNITE INNEE</b> .....	<b>12</b>
1.3.1 Récepteurs TLR.....	<b>13</b>
1.3.2 Récepteurs cytosoliques de MAMP viraux : RLH .....	<b>14</b>
1.3.3 Blocage des voies d'induction des IFN .....	<b>17</b>
1.3.4 La réponse à l'IFN.....	<b>20</b>
1.3.5 Contrôle de la synthèse virale par les ISG.....	<b>21</b>
1.4 <b>PROBLEMATIQUE, HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL</b> .....	<b>25</b>
<b>CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES</b> .....	<b>27</b>
2.1 <b>LIGNEES CELLULAIRES ET ENTRETIEN</b> .....	<b>27</b>
2.2 <b>GENERATION DES LIGNEES CELLULAIRES STABLES</b> .....	<b>27</b>
2.2.1 Transfection .....	<b>27</b>
2.2.2 Sélection des cellules.....	<b>27</b>
2.2.3 Isolement de clones par la méthode de dilution en série.....	<b>28</b>
2.2.4 Vérification de l'expression de la protéine V .....	<b>30</b>
2.3 <b>PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR L'ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE</b> .....	<b>31</b>
2.3.1 Stimulation des HeLa .....	<b>31</b>

2.3.2	Extraction d'ARN.....	31
2.4	ANALYSE DES PUCES A ADN.....	33
2.4.1	La technologie Illumina.....	33
2.4.2	Évaluation de l'expression des gènes.....	36
2.4.3	Clusterisation et analyse fonctionnelle.....	36
2.4.4	Validation des données de la puce à ADN.....	37
2.5	ÉVALUATION DU NIVEAU D'EXPRESSION DES CMH DE CLASSE I.....	37
2.5.1	Préparation des échantillons.....	37
2.5.2	Cytométrie en flux.....	37
<b>CHAPITRE 3 : RÉSULTATS.....</b>		<b>39</b>
3.1	LA FONCTIONNALITE DES PROTEINES V EST CONSERVEE DANS LES LIGNEES CELLULAIRES STABLES HELAVWT, HELAVY110H ET HELAVC255S.....	39
3.1.1	Les lignées stables sont issues de populations monoclonales et expriment les protéines VWT, VY110H et VC255S à niveau équivalent.....	39
3.1.2	L'expression des protéines VWT et VY110H bloque la réponse à l'IFN.....	41
3.2	LES PROTEINES VWT ET VY110H REDUISENT LA TRANSCRIPTION DES ISG.....	42
3.3	LA PROTEINE V CIBLE MAJORITAIREMENT LES GENES IMPLIQUES DANS LA REPOSE IMMUNITAIRE ANTIVIRALE.....	45
3.4	LA PROTEINE V BLOQUE L'EXPRESSION DES ISG IDENTIFIES PAR BIOPUCE.....	48
3.5	LES GENES DES VOIES DES RLR ET DES CMH DE CLASSE I SONT PARTICULIEREMENT VISES PAR LA PROTEINE V.....	50
3.6	LA PROTEINE V BLOQUE LA VOIE DES CMH DE CLASSE I.....	53
3.6.1	La transcription des gènes de l'immunoprotéasome et du CMH de classe I est bloquée par V .....	53
3.6.2	La protéine V bloque l'expression du CMH de classe I à la surface des cellules.....	56
<b>CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....</b>		<b>59</b>
3.7	LA PROTEINE V REGULE L'EXPRESSION DES ISG.....	59
3.8	LA PROTEINE V RETARDE L'APPARITION DE LA REPOSE IMMUNITAIRE ADAPTATIVE.....	60
3.9	CONCLUSION.....	64
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>		<b>65</b>
<b>ANNEXE I : VOIES DE SIGNALISATION COMPLEMENTAIRES.....</b>		<b>75</b>
<b>ANNEXE II : TABLEAU D'EXPRESSION DES GENES.....</b>		<b>77</b>
<b>ANNEXE III : TABLEAU DE REGROUPEMENT DES ANNOTATIONS GO.....</b>		<b>87</b>

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

## **CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE**

FIGURE 1. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MORBILLIVIRUS .....	3
FIGURE 2. ORGANISATION GENOMIQUE ET GRADIENT DE TRANSCRIPTION CHEZ LES MORBILLIVIRUS .....	5
FIGURE 3. SYNTHÈSE ET CONSERVATION DE LA PROTEINE V .....	8
FIGURE 4. VOIE DE SIGNALISATION DES TLR ET INTERFÉRENCE VIRALE .....	15
FIGURE 5. VOIES D'INDUCTION DES IFN ET INTERFÉRENCE VIRALE .....	19
FIGURE 6. VOIES DE RÉPONSE AUX IFN ET INTERFÉRENCE VIRALE .....	22

## **CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES**

FIGURE 7. SÉLECTION CLONALE PAR DILUTION EN SÉRIE .....	29
FIGURE 8. PROCESSUS EXPERIMENTAL DE DÉTERMINATION DES GÈNES INDUITS PAR LES IFN DANS LES LIGNÉES EXPRIMANT LA PROTEINE V .....	32
FIGURE 9. FONCTIONNEMENT LA PUCE ILLUMINA HUMANHT-12 .....	35

## **CHAPITRE 3 : RESULTATS**

FIGURE 10. ÉVALUATION DES NIVEAUX D'EXPRESSION DE LA PROTEINE V DES CLONES CELLULAIRES STABLES APRÈS SÉLECTION .....	40
FIGURE 11. EXPRESSION DES PROTEINES Mx1 ET V DANS LES LIGNÉES APRÈS STIMULATION PAR L'IFN .....	41
FIGURE 12. PROFILS TRANSCRIPTIONNELS DES DIFFÉRENTES LIGNÉES HELA TRANSGÉNIQUES EN ABSENCE ET PRÉSENCE D'IFN .....	43
FIGURE 13. ANALYSE COMPARATIVE DES PROFILS TRANSCRIPTIONNELS DES GÈNES ACTIVES PAR L'IFN .....	44
FIGURE 14. CLASSIFICATION FONCTIONNELLE DES GÈNES RÉGULÉS PAR LA PROTEINE V .....	46
FIGURE 15. PROFILS TRANSCRIPTIONNELS DES GÈNES ACTIVES PAR LES IFN APRÈS CLUSTERISATION .....	47
FIGURE 16. VALIDATION DES DONNÉES DE BIOPUCES. ....	49
FIGURE 17. VOIE DE SIGNALISATION DES CMH DE CLASSE I ET II .....	52
FIGURE 18. NIVEAU D'INDUCTION DES GÈNES DU PROTEASOME PAR QPCR TEMPS REEL .....	54
FIGURE 19. NIVEAU D'INDUCTION DES GÈNES DU CMH DE CLASSE I .....	55
FIGURE 20. EXPRESSION À LA SURFACE DES CELLULES DU CMH DE CLASSE I .....	56
FIGURE 21. QUANTIFICATION DE L'INDUCTION DU CMH DE CLASSE I PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX .....	58



## **ANNEXE I : VOIES DE SIGNALISATION COMPLÉMENTAIRES**

FIGURE 22. VOIE DE SIGNALISATION DE MEV .....	75
FIGURE 23. VOIE DE SIGNALISATION DES RLR .....	76

## **LISTE DES TABLEAUX**

TABLEAU 1. VOIES DE SIGNALISATION AFFECTEES PAR LA PROTEINE V IDENTIFIEES DES PROFILS TRANSCRIPTIONNELS .....	50
TABLEAU 2. TABLEAU D'EXPRESSION DES GENES .....	77
TABLEAU 3. TABLEAU DE REGROUPEMENT DES ANNOTATIONS GO. ....	87

## **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

$\mu\text{g}$  : microgramme

$\mu\text{L}$  : microlitre

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ARN : acide ribonucléique

ARNc : acide ribonucléique complémentaire

ARNdb : acide ribonucléique double brin

ARNm : acide ribonucléique messenger

ARNsb : acide ribonucléique simple brin

ATCC : American Type Culture Collection

ATPase : adenosine triphosphate hydrolase

$^{\circ}\text{C}$  : Celsius

C255 : Cystéine 255

C272 : Cystéine 272

CARD : caspase-activated recrutement domain

CD : cluster de differenciation

CDV : canine distemper virus

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CpG : dinucléotides cytosine polyguanine

C-terminal : carboxy-terminal

D : acide aspartique

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DTT : Dithiothreitol

EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique

F : protéine de fusion

FACS : Fluorescence-activated cell sorter

FBS : fetal bovine serum

GAS : interferon gamma activated sequence

GTPase : guanosine triphosphate hydrolase

H : hémagglutinine  
h : heure  
HPIV2 : virus parainfluenza human de type 3  
HRSV : virus respiratoire syncitial humain  
IFN : interféron  
IFNAR : interferon alpha receptor  
IFNGR : interferon gamma receptor  
IL : interleukine  
IRF : interferon regulatory factor  
ISG : interferon stimulated gene  
ISGF3: interferon-stimulated gene factor 3  
ISRE : interferon stimulated response elements  
JAK1 : Janus activated kinase 1  
kb : kilobase  
kDa : kilodalton  
L : protéine large  
M : protéine de la matrice  
MALT : mucosa-associated lymphoid tissue  
MAPK : Mitogen-activated protein (MAP) kinases  
MDA-5 : melanoma differentiation-associated gene 5  
mg : milligramme  
mL : millilitre  
mM : millimolaire  
MAMP : microbe-associated molecular pattern  
MeV : measles virus  
Mx1: Orthomyxovirus resistance gene 1  
MuV : Mumps virus  
Nt : nucléotides  
N : nucléocapside  
NDV : New Castle disease virus  
NF $\kappa$ B : nuclear factor-kappa-B

NK : cellule Natural-Killer  
N-terminal : amino-terminal  
NP : nucléoprotéine  
OAS : 2'-5'-oligoadenylate synthetase  
P : phosphoprotéine  
PBMC : peripheral blood mononuclear cells  
PBS : phosphate buffered saline  
PE : R-Phycoerythrine  
PFA : paraformaldéhyde  
pH: potential hydrogène  
PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase  
PKR : protéine kinase R  
PRR : pathogen recognition receptor  
PVDF : Polyvinylidene fluoride  
R : arginine  
RD : recruitment domain  
RdRp : ARN polymérase ARN dépendante  
RIG-I : retinoic acid inducible gene I  
RLR : RIG-I-like receptor  
RNase L : Ribonuclease L  
RNP : complexe ribonucléoprotéique  
RPV : rinderpest virus  
qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction  
SDS : Sodium monododecyl sulfate  
SeV : Sendai virus  
SLAM : signaling lymphocytic activation molecule  
STAT : signal transducer and activator of transcription  
SV5 : simian virus 5  
TBS : Tris Buffered Saline  
TIR : Toll/Interleukin-1 receptor domain  
TLR : Toll-like receptor

TNF : tumour necrosis factor

Tyk2 : tyrosine kinase 2

U : unité internationale

VHC : virus de l'hépatite C

VHB : virus de l'hépatite B

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

W : tryptophane

WT : wild type

Y110 : tyrosine 110

# CHAPITRE 1 - REVUE DE LITTÉRATURE

## 1.1 Les morbillivirus

### 1.1.1 Taxonomie

Les virus à ARN simple brin (ARNsb) de polarité négative forment l'ordre des *Mononegavirales*. Cet ordre inclut les familles *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Rhabdoviridae* et *Paramyxoviridae*. Au sein de cette dernière, nous retrouvons deux sous-familles de virus : la sous-famille *Pneumovirinae* qui comprend les genres *Metapneumovirus* et *Pneumovirus*, et la sous-famille *Paramyxovirinae* formée des genres *Respirovirus*, *Rubulavirus*, *Henipavirus*, *Avulavirus* et *Morbillivirus* (King 2012). Le genre *Morbillivirus* se compose de plusieurs agents pathogènes qui infectent de nombreux mammifères. Parmi ceux-ci, le virus de la rougeole (MeV) est le seul à infecter les humains et reste encore aujourd'hui un agent pathogène responsable de la mortalité infantile dans les pays en voie de développement (Moss and Griffin 2006). Le virus de la maladie de Carré (CDV) est un virus proche de MeV et infecte plusieurs espèces de carnivores appartenant notamment à la famille des canidés ou à la famille des mustélidés tels que le chien et le furet respectivement (Summers and Appel 1994; Barrett 1999). Le phocine distemper virus et le dolphin morbillivirus infectent respectivement les phoques et les dauphins tandis que le virus de la peste bovine est un morbillivirus ayant causé de nombreux dégâts économiques dans le domaine agricole (Normile 2008).

### 1.1.2 Morphologie, organisation génomique et réplication

#### 1.1.2.1 Morphologie

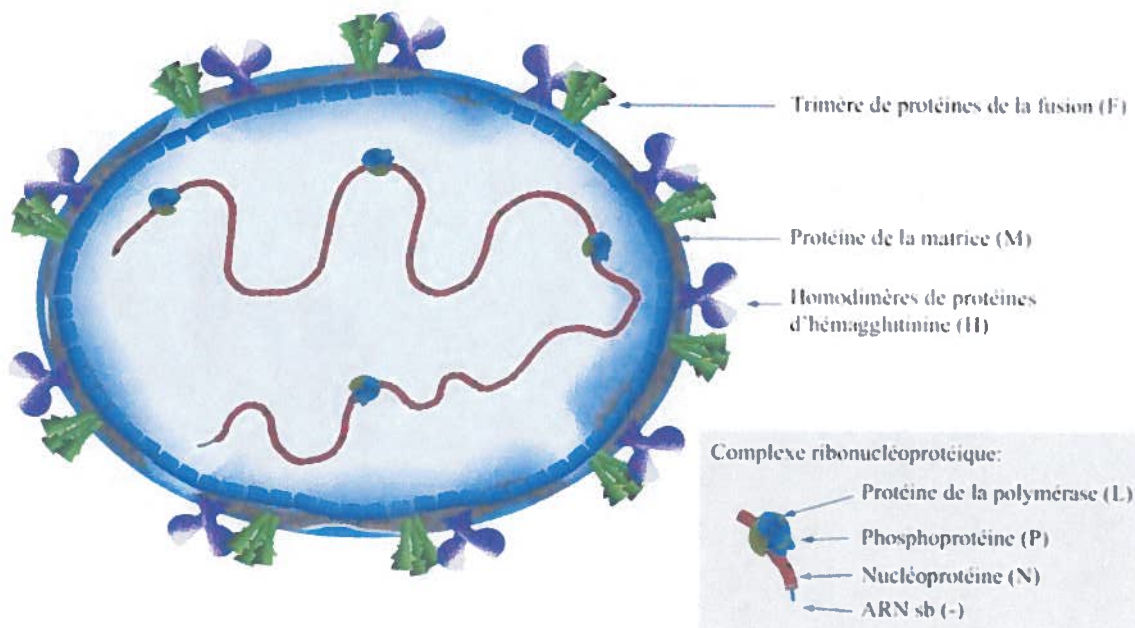
Les morbillivirus sont des virus de formes sphériques ou pléomorphes dont le diamètre varie de 100 à 300 nm. La nucléocapside virale est composée de l'ARN viral, encapsidé par la nucléoprotéine (N) virale, de la polymérase virale constituée de la phosphoprotéine (P) et de la protéine polymérase (L). L'ensemble forme le complexe ribonucléoprotéique (RNP) et sert de base à la réplication du virus (Rima and Duprex 2009). L'enveloppe virale est composée d'une part par une couche lipidique issue de la

membrane cellulaire de la cellule infectée, et d'autre part des protéines de la matrice (M) du côté interne qui interagissent avec la RNP et des glycoprotéines virales, la protéine d'attachement (H) et de fusion (F) (Figure 1) (Lamb 2007).

#### **1.1.2.2 Le génome morbilliviral**

Les morbillivirus sont des virus à ARN simple brin de polarité négative à structure hélicoïdale et d'une longueur d'environ 16 kilobases. Leur génome est non segmenté et est composé de six gènes codant pour huit protéines (Fig.2) (Griffin 2007). Le premier gène transcrit code pour la protéine N qui va servir à encapsider l'ARN viral grâce à sa propriété de liaison à l'ARN (Liston et al. 1997). Le gène codant pour P permet la synthèse d'une protéine qui servira entre autres de cofacteurs pour l'ARN polymérase virale (Hamaguchi et al. 1983; Horikami et al. 1992). Ce gène va aussi coder pour deux autres protéines dites accessoires parce qu'elles ne sont pas nécessaires à la réplication du virus : les protéines V et C. La protéine V est synthétisée à partir du cadre de lecture du gène P et une guanosine non appariée va être rajoutée lors de la transcription de l'ARNm (Thomas et al. 1988; Cattaneo et al. 1989) tandis que la protéine C va être codée à partir d'un autre cadre de lecture ouvert présent dans le gène P (Haas et al. 1995). Ensuite, le gène codant pour la protéine de matrice (M) sera transcrit. Cette protéine va servir de support pour l'assemblage du virus en s'associant avec les membranes lipidiques de la cellule hôte d'une part (Riedl et al. 2002) et en permettant l'ancrage des glycoprotéines virales dans celle-ci (Cathomen et al. 1998; Tahara et al. 2007). Ces dernières serviront à l'attachement du virus à son récepteur à la fusion des membranes virales et cellulaires. Le dernier gène transcrit sera celui de la polymérase L.





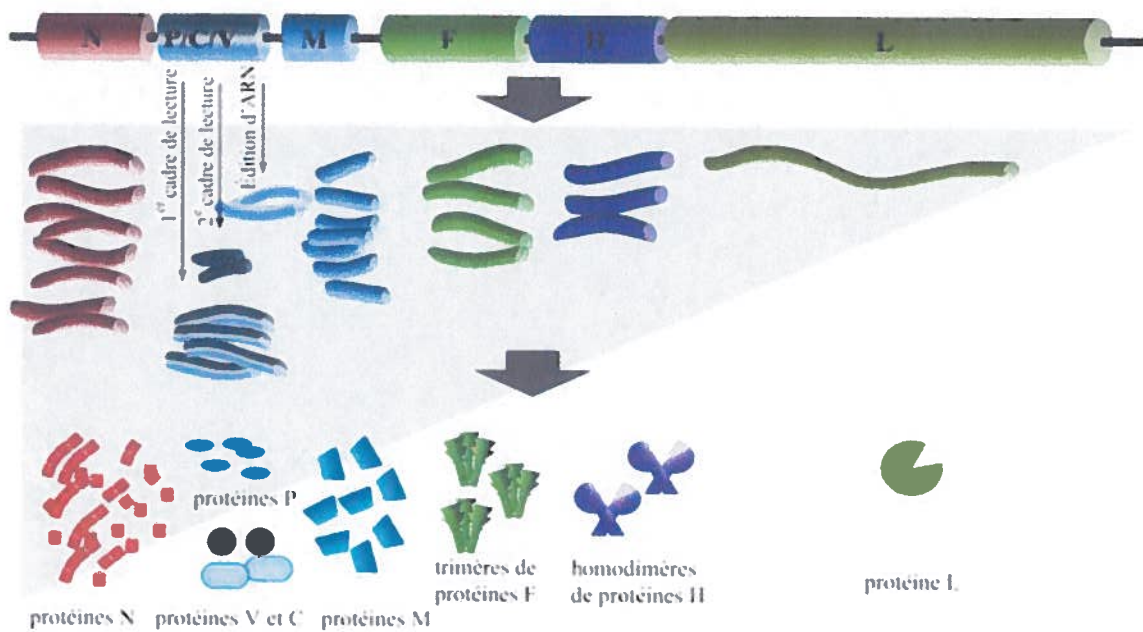
**Figure 1. Représentation schématique des morbillivirus (Delpeut et al. 2012).** Les morbillivirus sont pléomorphes exprimant à leur surface les deux glycoprotéines virales H et F. L'ARN viral encapsidé par la nucléoprotéine (N) et associé à la polymérase L et la phosphoprotéine P forme le complexe ribonucléoprotéique (RNP). La protéine de matrice M sert à fixer le RNP et organiser l'enveloppe virale.

### **1.1.2.3 La réplication morbillivirale**

Dans le contexte d'une infection virale, le virus va s'associer à son récepteur à la surface de la cellule par l'intermédiaire de la protéine H. Cette association va activer la protéine F qui entraîne la fusion de la membrane cellulaire avec la membrane virale (Navaratnarajah et al. 2009). Ceci mène au relargage du RNP dans le cytoplasme de la cellule, lieu de réplication virale (Lamb 2007).

Une fois relâché, le RNP va servir de matrice à la production des différents ARN viraux grâce à la présence de plusieurs copies de la polymérase virale déjà présente. À la fin de la transcription d'un gène, la polymérase virale reste attachée à l'ARN génomique viral jusqu'au prochain gène où elle réinitiera sa transcription. Cependant, il arrive que la polymérase se détache du génome viral entre la transcription de deux gènes viraux entraînant une diminution de la fréquence de réinitiation. Cela a pour conséquence la formation d'un gradient de transcription des ARNm viraux, avec le gène N comme étant le plus transcrit et le gène L comme le moins transcrit (Figure 2) (Cattaneo et al. 1987; Homann et al. 1990).

Puis, lorsque le niveau de protéines N non assemblées est suffisant, l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) arrête de transcrire les ARNm viraux et produit un intermédiaire de réplication, l'antigénome de polarité positive (Blumberg et al. 1981; Vidal and Kolakofsky 1989). Ce dernier va servir à son tour de matrice pour la synthèse de génome de polarité négative. Pendant leur transcription, les ARN génomiques viraux nouvellement formés sont immédiatement encapsidés par les protéines N (Gubbay et al. 2001). La polymérase virale s'associe au complexe ARN-protéines N par l'intermédiaire d'interactions avec les protéines N et P formant ainsi de nouveaux RNPs fonctionnels pour la création de nouveaux virions (Kingston et al. 2004).



**Figure 2. Organisation génomique et gradient de transcription chez les morbillivirus (Delpout et al. 2012).** Le génome morbilliviral se compose de six gènes codant pour huit protéines suivant un gradient de transcription. La protéine C va être produite grâce à un deuxième cadre de lecture dans le gène P tandis que la protéine V sera synthétisée par un mécanisme d'édition de l'ARN.

### **1.1.3 La protéine V**

#### **1.1.3.1 Synthèse**

La protéine V est retrouvée chez tous les paramyxovirus. C'est une protéine très conservée qui est synthétisée à partir du cadre de lecture du gène P. Le gène P possède une région riche en guanosine et adénosine appelée domaine d'édition de l'ARN. Lors de la transcription du gène P, il arrive que la polymérase virale « bégaye » et ajoute une guanosine non appariée dans ce domaine d'édition par un mécanisme nommé « RNA editing ». Cet ajout aura pour conséquence de décaler le cadre de lecture du gène et l'apparition prématurée d'un codon STOP. Il en résulte une protéine tronquée de 299 acides aminés et d'un poids moléculaire d'environ 40kDa (Figure 3A) (Cattaneo et al. 1989).

#### **1.1.3.2 Structure et domaines fonctionnels**

L'ajout de ce nucléotide non apparié va avoir pour conséquence la production d'une protéine virale possédant un domaine N-terminal commun avec la protéine P mais un domaine C-terminal unique. Cette dernière est une région riche en cystéines qui va être capable de se lier à deux atomes de zinc (Liston and Briedis 1994; Paterson et al. 1995). Cette structure en doigt de zinc est unique du fait qu'elle ne partage aucune similarité avec les autres domaines en doigt de zinc connus mais reste très conservée parmi les protéines V des autres paramyxovirus (Horvath 2004; Lamb 2007). Malgré ce niveau de conservation les rôles et les mécanismes d'action de la protéine peuvent varier d'un paramyxovirus à un autre (Horvath 2004; Fontana et al. 2008).

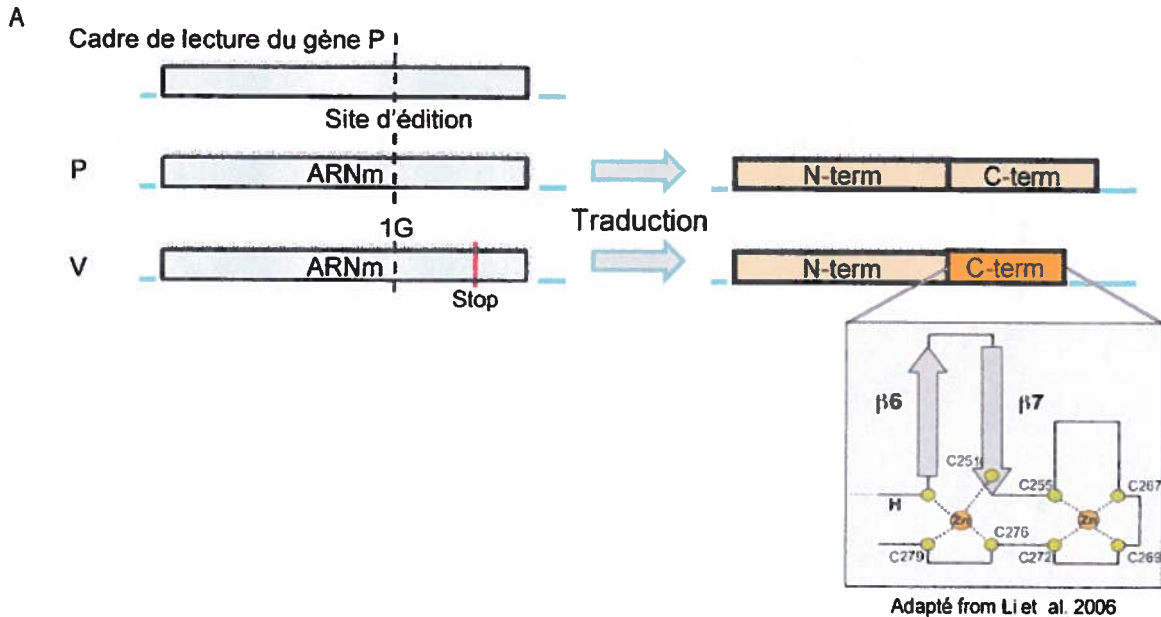
C'est en comparant des souches sauvages et vaccinales de MeV que des différences de réponses au niveau des voies de signalisation des interférons ont été observées. Ces différences ont pu être imputées par la suite à trois mutations sur la protéine V (Ohno et al. 2004). La première touche un résidu tyrosine dans le domaine N-terminal de V. Au sein des morbillivirus, le domaine N-terminal semble être important pour la rétention dans le cytoplasme de la protéine STAT1 activée et de ce fait empêche l'induction des gènes dépendants de STAT1 (Ohno et al. 2004; Devaux et al. 2007; Bankamp et al. 2008; Nakatsu et al. 2008; Ramachandran et al. 2008; Caignard et al. 2009). Des études de gènes rapporteurs ont démontré que ce résidu tyrosine en

position 110 était responsable de cette inhibition de la translocation nucléaire de STAT1. De plus, cet effet ne se limite pas uniquement à la protéine V mais s'étend aussi à la protéine P étant donné qu'elles partagent le même domaine N-terminal (Devaux et al. 2007).

Les deux dernières mutations observées issues de la comparaison de séquences de la protéine V affectent des résidus du domaine C-terminal. Cependant il a été démontré que seule la première mutation qui affecte le résidu cystéine 272 du domaine en doigt de zinc de la protéine est importante. Des essais de gènes rapporteurs ont montré qu'une mutation sur un résidu de doigt zinc ne bloque plus la voie d'activation et de réponse des interférons de type I. Cet effet a été associé à une défaillance de la protéine V à interagir directement avec l'ARN hélicase MDA5 et avec le facteur de transcription STAT2 (Ohno et al. 2004; Ramachandran et al. 2008; Ramachandran and Horvath 2010). De plus, la mutation d'un résidu cystéine provoque une atténuation de la virulence *in vivo* lors d'une infection chez le furet par le CDV, démontrant l'importance de cette structure sur la pathogénèse (Svitek et al, article en préparation).

Cependant, ce sont des résidus de la région C-terminale n'ayant pas de rôle dans cette structure en doigt de zinc qui interagissent avec l'ARN hélicase MDA5 et les facteurs de transcription IRF3 et STAT2 (Caignard et al. 2009; Ramachandran and Horvath 2010; Irie et al. 2012). En effet, l'acide glutamique en position 235 est responsable de l'interaction directe entre MDA5 et la protéine V de MeV et cette interaction est suffisante pour bloquer l'activation des gènes des interférons (Ramachandran and Horvath 2010). Plus récemment, il a même été montré que la partie C-terminale de V est aussi impliquée dans le blocage de la dimérisation du facteur IRF3 et ainsi inhibe sa translocation nucléaire et l'activation des gènes des interférons (Irie et al. 2012). Cet effet serait complémentaire avec son effet sur MDA5 pour le blocage de l'activation des gènes IFN $\alpha$  et IFN $\beta$ . Dans une autre étude, l'acide aspartique situé en position 248 permet l'interaction de la protéine V avec STAT2 (Ramachandran et al. 2008). Deux autres résidus identifiés, les tryptophanes 240 et 250, sont aussi importants pour cette interaction mais dans une moindre mesure

(Figure 3B) (Caignard et al. 2009). Cette interaction avec STAT2 jouerait un rôle dans le blocage de l'activation des gènes dépendants de STAT2. Ainsi le domaine en doigt de zinc de la protéine V est nécessaire mais n'est pas responsable à lui seul de l'inhibition des voies de l'immunité innée.



B

- SV5 169-GFHRREYSIGWVGDEVKVTEWCNPSCS...-221
- MuV 168-GCHRREWSLSWVQGEVRFVFEWCNPICS...-220
- MeV 230-KGHRREISLIWNGDRVFI<sup>DR</sup>WCNPMCS...-282
- CDV 230-KGHRREVSLTWNGDSCWIDKWCNPICT...-282

**Figure 3. Synthèse et conservation de la protéine V.** (A) Synthèse de la protéine V à partir du cadre de lecture du gène P et représentation schématique de la structure en doigt de zinc prédite. (B) Alignement de séquence du domaine C-terminal de différentes protéines V de paramyxovirus. En violet sont représentés les résidus important pour l'interaction avec l'ARN hélicase MDA5 (Ramachandran et al). En rouge sont représentés les résidus interagissant avec STAT2 identifiés par des expériences de doubles hybrides (Caignard et al 2009) et en vert et bleu ceux identifiés par immunoprécipitation (Ramachandran et al. 2008)

## 1.2 La pathogenèse morbillivirale

Tous les morbillivirus causent une pathogenèse similaire chez leurs hôtes respectifs bien que la finalité de l'infection peut varier selon l'espèce. Une infection par MeV ne se révèle pas en général mortelle mais on estime qu'environ 20 millions de personnes ont été infectées en 2012, principalement dans les pays en voie de développement (W.H.O 2012). La mortalité associée à une infection par le CDV chez le chien, quant à elle, varie de 30% à 90% respectivement (Appel 1969; Moss and Griffin 2006).

Les morbillivirus se transmettent principalement par aérosol et sont hautement contagieux (Appel 1969; Griffin 2007). Une infection par un morbillivirus se caractérise par l'apparition d'une forte fièvre associée à des rougeurs cutanées, des signes gastro-entériques et respiratoires et une immunosuppression importante (Moss and Griffin 2006). L'hôte devient contagieux quelques jours avant l'apparition des éruptions cutanées et lorsque les symptômes sont les plus sévères. Durant la première semaine de l'infection, le virus se réplique dans les tissus lymphatiques du tractus respiratoire supérieur où il va infecter les cellules immunitaires via le récepteur SLAM présent à la surface des cellules (Sakaguchi et al. 1986; Iwatsuki et al. 1995; Zhu et al. 1997; Navaratnarajah et al. 2009). Ensuite, le virus est amplifié dans les organes lymphoïdes de l'hôte tels que le thymus, la rate ou les tissus lymphatiques associés aux muqueuses (MALT) (Appel 1969; von Messling et al. 2004). Cette virémie va induire une immunosuppression se traduisant par une leucopénie transitoire et une inhibition de la prolifération lymphocytaire (von Messling et al. 2003; Heaney et al. 2005; Moss and Griffin 2006).

Enfin, le virus va finir par se répandre dans les cellules épithéliales par l'intermédiaire du récepteur Nectin-4 de l'organisme infecté comme la peau, les tissus épithéliaux des poumons ou les intestins (von Messling et al. 2004; Takeda 2008; Beineke et al. 2009). L'absence d'une part de système immunitaire causée par l'immunosuppression et l'infection d'autre part des cellules épithéliales qui mène à une perte d'intégrité de la barrière épithéliale rendent l'individu infecté susceptible à des

infections secondaires. Ce sont ces infections secondaires qui sont souvent responsables de la mort de l'hôte (Moss and Griffin 2006).

Une infection par le CDV chez son hôte va reproduire les mêmes signes cliniques qu'une infection avec MeV à savoir des éruptions cutanées, fièvre, perte de poids, signes respiratoires, conjonctivite, une immunosuppression et dans de rares cas des signes neurologiques (von Messling et al. 2003).

### **1.2.1 Les cellules immunitaires, cibles principales du virus**

Les cellules immunitaires sont les cibles principales de l'infection morbillivirale (von Messling et al. 2004). Ce tropisme s'explique par la présence à la surface de cellules immunitaires du marqueur CD150 ou SLAM (Signaling Lymphocytes Activation Molecule) qui sert de récepteurs à tous les morbillivirus. (Griffin 2007; Navaratnarajah et al. 2009). En effet, un virus ne pouvant plus interagir avec ce récepteur n'est plus capable d'infecter les lymphocytes et ne cause aucune immunosuppression (von Messling et al. 2006; Leonard et al. 2010). SLAM est un récepteur de la superfamille des récepteurs SLAM. Il est présent uniquement à la surface des thymocytes, des lymphocytes activés, des cellules dendritiques matures, et des macrophages. La famille des récepteurs SLAM est importante pour l'établissement de la réponse immunitaire en régulant l'expression de cytokines telles que l'interleukine 4 (IL-4), l'IL-12 ou en encore le « tumour necrosis factor alpha »,  $TNF\alpha$  (Engel et al. 2003). Dès lors, son utilisation par les morbillivirus contribue fort probablement à l'immunosuppression à plusieurs niveaux.

### **1.2.2 Les effets de l'infection sur la réponse immunitaire**

Du fait que les cellules immunitaires sont les cibles primaires des morbillivirus, des changements au niveau de la réponse immunitaire vont être observés. Une leucopénie va apparaître dès la première semaine d'infection et se traduit par une diminution du nombre de lymphocytes B et T, de monocytes et de neutrophiles (Pillet and von Messling 2009). Cette diminution va provoquer entre autre des lésions dans les nodules lymphatiques, la rate ou encore les amygdales (Beineke et al. 2009). Une perte



de prolifération lymphocytaire en présence de mitogènes a aussi été observée (von Messling et al. 2003; Heaney et al. 2005). Des études ont montré qu'une infection par MeV induit un arrêt du cycle cellulaire dans les cellules T et la production d'IL-10 capable d'inhiber la synthèse de cytokines et la prolifération lymphocytaire (Taga et al. 1993; Schnorr et al. 1997). L'IL-10 n'est pas la seule cytokine affectée par l'infection. Une diminution de l'IL-12 et de l'IFN $\gamma$  a déjà été observée lors d'une infection par MeV chez l'homme ainsi qu'une augmentation de l'IL-4 (Atabani et al. 2001; Moss et al. 2002). Lors d'une infection mortelle par CDV chez des furets, la production d'IFN de type I et II, d'IL-2, IL-6, IL-4 et TNF $\alpha$  se retrouve diminuée (Svitek and von Messling 2007).

### **1.2.3 Les protéines virales dans l'immunosuppression**

Des rôles immunosuppresseurs ont été attribués à plusieurs protéines morbillivirales.

La protéine N de MeV est capable d'interagir et de se fixer sur le récepteur à la nucléoprotéine (NR) à la surface des lymphocytes et des cellules thymiques. La présence de la protéine N dans le milieu extracellulaire pouvant s'expliquer par le relâchement de celle-ci après la mort des cellules infectées (Laine et al. 2003).

L'expression des glycoprotéines virales des surfaces H et F est capable d'induire une inhibition de la prolifération lymphocytaire. Le contact de cellules exprimant les glycoprotéines virales provoquerait sur les cellules non infectées l'arrêt du cycle de réplication cellulaire en phase G0/G1 (Schnorr et al. 1997; Weidmann et al. 2000). Cet arrêt serait provoqué par le clivage de la protéine F qui bloquerait la voie de signalisation Akt impliquée dans l'activation des cellules T non infectées (Schnorr et al. 1997; Weidmann et al. 2000; Avota et al. 2001; Schneider-Schaulies et al. 2002).

La protéine non structurale C est importante pour l'infectivité du virus mais possède un rôle moins prononcé dans l'immunosuppression. Lors d'une infection par un virus MeV n'exprimant la protéine C dans le modèle macaque, une augmentation de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN a été observée comparativement à une infection au virus de type sauvage (Devaux et al. 2008). À l'inverse chez le furet,

une infection par un virus CDV ne produisant plus cette protéine reste mortelle et garde sa capacité à induire une leucopénie et une inhibition de la prolifération (von Messling et al. 2006).

La protéine accessoire V, quant à elle, est essentielle dans l'immunosuppression et la mortalité associée à l'infection. Ainsi un virus CDV ne synthétisant plus de protéine V n'est plus mortel chez le furet. Une leucopénie et une perte de prolifération lymphocytaire sont observées dès la première semaine d'infection mais demeurent transitoires, et les animaux infectés recouvrent leurs capacités dès la deuxième semaine d'infection. Une absence d'inhibition des cytokines a de plus été observée conférant à la protéine V un rôle important dans la réponse immunitaire dirigée contre le virus (von Messling et al. 2006; Svitek and von Messling 2007). L'interaction de cette protéine avec des éléments majeurs de la voie de signalisation de l'immunité innée peut expliquer ce phénomène mais les mécanismes moléculaires restent cependant à être caractérisés.

### **1.3 Interférence avec l'immunité innée**

L'immunité innée est une réponse rapide mais non spécifique de l'organisme face à un agent étranger. Elle est capable de ralentir la propagation de ces agents et d'initier une réponse immunitaire adaptative (Biron 1994). Suite à l'infection d'une cellule par un virus, la production d'IFN est déclenchée par la reconnaissance de motifs structuraux propres à l'agent infectieux, les MAMP (microbe associated molecular patterns) (Janeway et al. 1996). On dénombre quatre principaux types de MAMP viraux : l'ARN double brin (ARNdb), l'ARN simple brin (ARNsb), l'ADN CpG non méthylé et les glycoprotéines d'enveloppe. La détection de ces motifs moléculaires s'effectue grâce à des récepteurs spécialisés appelés PRR (pattern recognition receptor) qui auront pour rôle d'assurer la discrimination entre les molécules du soi et du non-soi et de promouvoir une réponse immunitaire contre l'agent pathogène (Akira et al. 2006; Kawai et Akira 2007; Thompson et Locarnini 2007). On distingue ainsi deux grandes familles de PRR décrites pour détecter les virus : les récepteurs Toll-like (TLR) et les ARN hélicases « retinoic acid-induced gene I (RIG-I)-like » (RLH).

### 1.3.1 Récepteurs TLR

La famille des TLR comprend 13 membres, chacun spécialisé dans la détection de motifs différents. Les TLR1 à 9 sont communs à l'homme et à la souris, tandis que le TLR10 semble fonctionnel uniquement chez l'homme et les TLR11-13 chez la souris (Takeda et Akira 2005; Akira et al. 2006; Thompson et Locarnini 2007). Bien qu'ils soient exprimés principalement par les cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques ou les macrophages, la majorité des cellules de l'organisme exprime les TLR. Leur expression peut être induite par différents agents pathogènes, cytokines ou stress cellulaires (Takeda et Akira 2005). Les membres de la famille des TLR partagent une structure protéique composée d'un domaine extracellulaire riche en leucine (LRR), nécessaire à la reconnaissance des PAMP, un domaine transmembranaire hydrophobe et un domaine de signalisation cytoplasmique, le domaine TIR (Toll/interleukin-1 receptor), responsable des interactions avec les protéines adaptatrices contenant elles aussi un domaine TIR (O'Neill et Bowie 2007).

Bien qu'initialement décrits comme médiateurs de l'immunité innée antibactérienne, il s'est avéré que les TLR jouent aussi un rôle dans la réponse antivirale, en particulier dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Ainsi, les TLR3, TLR7/8 et TLR9 sont les plus impliqués dans la défense contre les infections virales en détectant les acides nucléiques viraux (Eisenacher et al. 2007; Kawai et Akira 2007). Contrairement aux autres TLR qui sont exprimés à la surface cellulaire, ces derniers sont localisés dans des compartiments endosomaux (Akira et al. 2006; Vercammen et al. 2008). L'interaction de ces récepteurs avec leurs ligands se déroulerait après l'internalisation du virus dans les endosomes au cours de l'entrée virale pour les TLR7-9 et après lyse des cellules infectées et relargage des ARNdb viraux pour TLR3. La liaison du ligand au TLR cible provoque une dimérisation et un changement conformationnel de celui-ci, induisant le recrutement sélectif de molécules adaptatrices spécifiques : MyD88 pour les TLR7-9 et TRIF/TICAM1 pour TLR3 (Kawai et al. 2004; Vercammen et al. 2008). Ces adaptateurs coordonnent l'activation de plusieurs voies de signalisation contribuant à la synthèse d'IFN- $\alpha/\beta$  et de cytokines pro-inflammatoires (Fig. 3) (Kawai et Akira 2007).

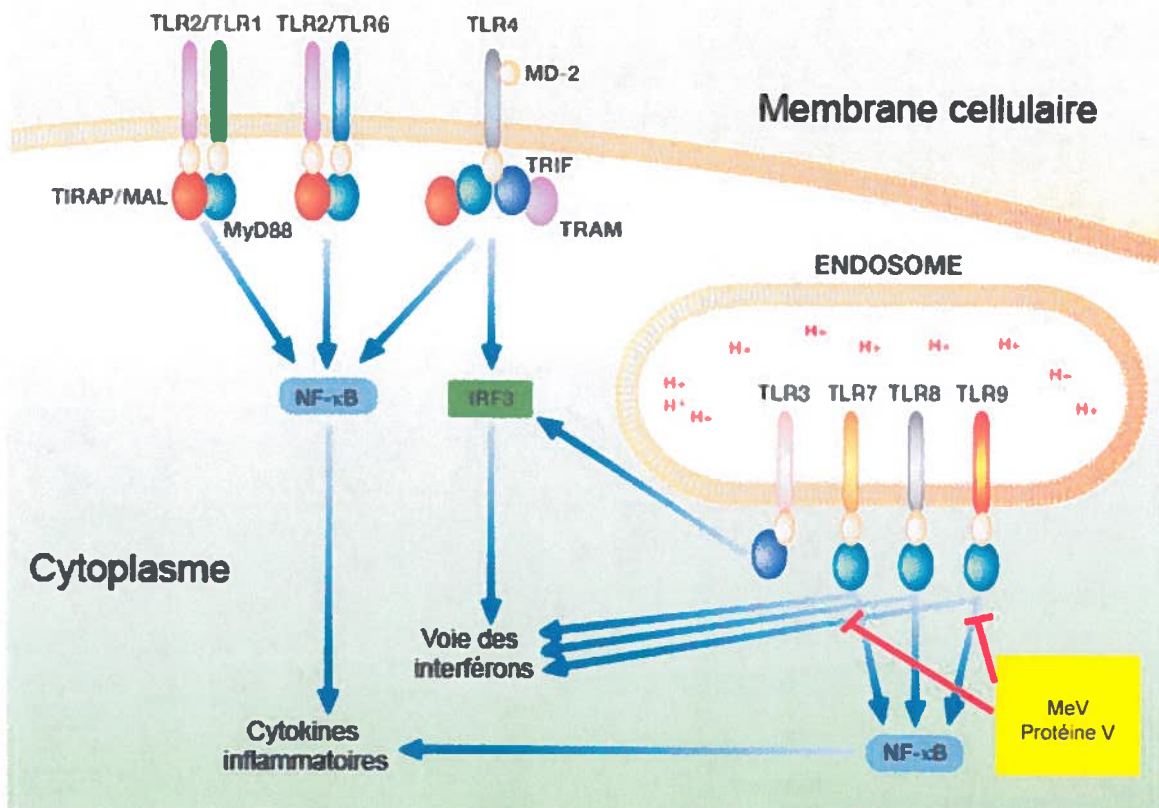
Alors que l'inhibition des voies des TLR et son importance dans la pathogenèse de virus à ARNs de polarité positive tel le virus de l'hépatite C ou de virus à ADN comme le virus de la vaccine a été démontrée (Li et al. 2005; Stack et al. 2005; Shehata et al. 2006; Sato et al. 2007), le rôle des virus à ARNs de polarité négative sur l'inhibition de cette voie de signalisation a été soulevé. En effet, des diminutions de l'induction des IFN de type I activée par la voie des TLR7/9 ont été observées dans des pDC infectées par MeV (Fig. 3) (Schlender et al. 2005; Klein Klouwenberg et al. 2009). Les mécanismes restent encore incertains bien qu'il semblerait que l'inhibition par MeV de la voie des TLR7/9 se ferait indirectement en empêchant la kinase iKK alpha de phosphoryler le facteur de transcription IRF7 (Pfaller et Conzelmann 2008).

### **1.3.2 Récepteurs cytosoliques de MAMP viraux : RLH**

Les TLR forment un système d'alerte efficace en cas de tentative d'intrusion d'un agent pathogène et permettent d'initier dans des délais très brefs une forte réponse antimicrobienne. Toutefois, leur action reste limitée de par leur localisation : les TLR sont localisés à la surface cellulaire ou à l'intérieur de compartiments endosomaux et sont incapables de détecter les virus intracytoplasmiques (Thompson et Locarnini 2007). De plus, l'expression des TLR est de manière générale restreinte aux cellules immunitaires : ils joueraient donc un rôle limité dans des infections qui visent principalement d'autres types cellulaires. L'étude de modèles où l'activation de l'expression des TLR est bloquée ou absente a permis d'identifier un second système de détection de la réplication virale intracellulaire.

#### **1.3.2.1 Reconnaissance des MAMP par les RLH**

Deux études ont identifié les hélicases RIG-I et melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) comme PRR intracellulaires capables de générer une réponse de type IFN- $\alpha/\beta$  et pro-inflammatoire suite à la détection des ARN viraux (Andrejeva et al. 2004; Yoneyama et al. 2004). Ces ARN hélicases appartiennent à la superfamille des hélicases 2 (Bamming et Horvath 2009) et partagent la même structure : un domaine hélicase en carboxy-terminal de type DExD/H, requis pour la détection des acides nucléiques (Lu et al. 2010), et deux domaines CARD (caspase



**Figure 4. Voie de signalisation des TLR et interférence virale.** Les TLR sont des senseurs permettant de détecter des agents pathogènes provoquant la production de cytokines inflammatoires et d'interférons par l'intermédiaire des facteurs de transcription IRF3 et NF-κB. Les TLR sont localisés à la membrane des cellules ou des endosomes. Différentes protéines adaptatrices servent à la transduction du signal (MyD88, TRIF, TRAF) (Boehme et Compton 2004). La protéine V de MeV et le RSV sont capables de bloquer la voie de transduction des TLR7/9.

recruitment domain) à l'extrémité amino-terminale, nécessaires pour la signalisation (Li et al. 2009).

RIG-I et MDA5 sont exprimées de façon ubiquitaire dans la plupart des tissus et sont inductibles par les IFN, ce qui permet une amplification autocrine et paracrine du système de détection (Kato et al. 2005). L'activité des RLH est régulée dans la cellule par un certain nombre de protéines comme des E3 ubiquitine ligases telles que TRIM25 ou RNF125 (Arimoto et al. 2007; Gack et al. 2007).

Bien que ces récepteurs partagent de fortes homologues de séquences, ils sont capables de distinguer différents motifs d'ARN viraux (Saito et Gale 2008). RIG-I a plus d'affinité pour les ARNdb contenant une extrémité 5'-triphosphate au niveau de son extrémité carboxy-terminale et d'une taille comprise entre 25 et 1000 nucléotides (Schlee et al. 2009; Schmidt et al. 2009). Du fait de sa longueur, de sa structure et de modifications post-traductionnelles majeures (addition d'une coiffe en 5', modifications nucléosidiques), ce type d'ARN est absent du cytosol de l'hôte et démontre ainsi son appartenance au monde viral (Kato et al. 2006; Marques et al. 2006; Saito et Gale 2008). RIG-I a été montrée comme étant essentiel pour la reconnaissance *in vivo* de nombreux virus à ARN incluant les flavivirus, les orthomyxovirus, les paramyxovirus et les rhabdovirus (Kato et al. 2006).

Le mode de reconnaissance des ARN du non-soi par MDA5 est moins connu que pour RIG-I. *In vivo*, MDA5 a été décrit initialement comme activateur de la signalisation IFN en réponse aux poly(I:C) et à l'infection par l'EMCV, un membre de la famille des *Picornaviridae* (Gitlin et al. 2006; Kato et al. 2006). MDA5 n'est pas capable de reconnaître les ARNdb avec des extrémités 5'-triphosphates, mais possède une forte affinité pour les ARNdb possédant une coiffe non méthylée (Zust et al. 2011). De plus, la liaison et l'activation de MDA5 par les ARNdb dépendent de la longueur de ces derniers ; il faut ainsi des ARNdb supérieurs à 1 kb pour activer la signalisation issue de MDA5 (Kato et al. 2008).

### **1.3.2.2 Activation et signalisation des RLH**

En absence de stimulus, RIG-I est maintenu sous une forme monomérique inactive dans la cellule via la présence d'un domaine répresseur (RD) à son extrémité carboxy-terminale induisant un repliement de la protéine et de ce fait empêche l'exposition de son domaine CARD (Saito et al. 2007). La liaison de l'ARN viral sur le domaine RD active le domaine ATPase de RIG-I induisant un changement conformationnel de RIG-I (Gee et al. 2008; Myong et al. 2009). Ce changement provoque son homodimérisation (Yoneyama et Fujita 2009). L'E3-ubiquitin ligase TRIM25 va ensuite polyubiquitinyler le domaine CARD de RIG-I et permettre le recrutement de la protéine adaptatrice MAVS (Gack et al. 2007; Gack et al. 2008; Zeng et al. 2010). La liaison entre RIG-I et MAVS se produit via une interaction entre la région CARD de RIG-I et un motif CARD présent à l'extrémité amino-terminale de MAVS (Meylan et al. 2005; Seth et al. 2005; Xu et al. 2005). De même, MDA5 s'associe avec MAVS via une interaction de type CARD-CARD (Kawai et al. 2005). La régulation de l'activation de MDA5 reste moins élucidée.

En plus de son domaine CARD, MAVS contient une région riche en proline et un domaine transmembranaire (TM) en carboxy-terminal permettant l'ancrage de MAVS dans la membrane mitochondriale (Seth et al. 2005). La forme activée de MAVS peut s'associer à d'autres partenaires comme TRAF3 (Saha et al. 2006). Cette association activerait les facteurs de transcription IRF-3 et IRF-7 indispensables à l'induction d'IFN- $\alpha/\beta$  via les kinases IKK $\epsilon$  et TBK1 (Figure4). En parallèle, MAVS permet l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par l'intermédiaire des protéines de la famille TRAF (Kawai et al. 2005; Seth et al. 2005; Xu et al. 2005). De plus, l'activation des voies IRF-3 et NF- $\kappa$ B par MAVS serait orchestrée par TRADD, une protéine connue jusqu'alors comme un adaptateur du récepteur au tumour necrosis factor (TNF) (Michallet et al. 2008).

### **1.3.3 Blocage des voies d'induction des IFN**

Les virus de l'ordre des *Mononegavirales* ont développé différentes stratégies afin de limiter la production d'IFN induit par les MAMP. Elle consiste à limiter la production d'ARN viral dans le but de réduire l'intensité de la réponse IFN ou de bloquer

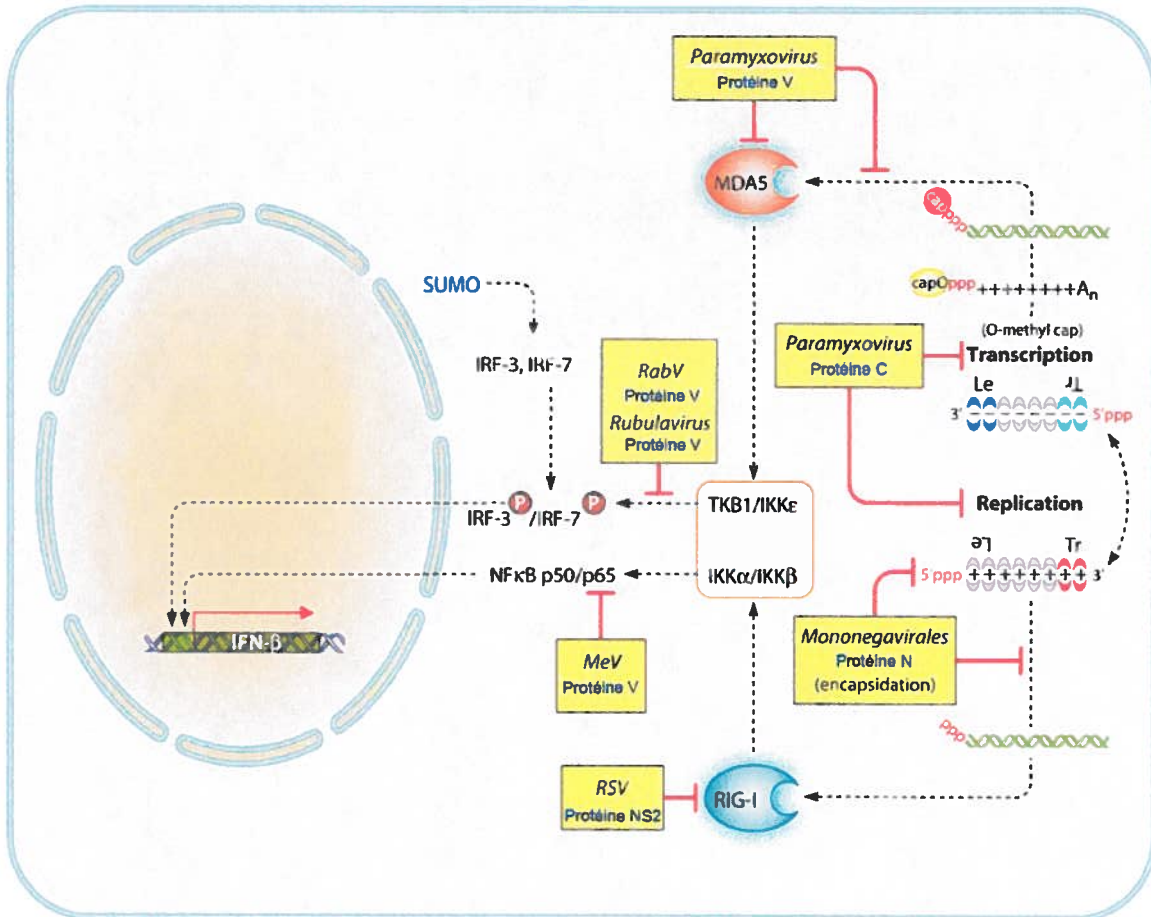
leur reconnaissance au niveau des RLR (Figure 5). Ces blocages s'effectuent principalement par les protéines accessoires C et V et dans une moindre mesure la protéine P.

L'une des défenses principales des virus demeure l'encapsidation des génomes et anti-génomes viraux par les protéines N qui empêche d'une part la formation d'ARNdb et d'autre part cache les motifs 3'ppp et les méthylations 2'O aux extrémités des ARN.

La protéine C des paramyxovirus joue aussi un rôle de régulateur de transcription viral en limitant la synthèse d'ARN viral (Cadd et al. 1996; Baron et Barrett 2000; Reutter et al. 2001; Malur et al. 2004). En l'occurrence, une infection par un virus MeV n'exprimant plus la protéine C va amener à une plus forte synthèse d'ARN viral et une diminution de synthèse protéique. Cela conduira à l'accumulation d'ARN viraux dans les cellules et facilitera leur reconnaissance par les RLR (Reutter et al. 2001; Nakatsu et al. 2006). De même, la protéine C de MeV va activer la protéine cellulaire ADAR1 et induire la déamination des extrémités 3'ppp des ARN viraux et bloquer l'activation des senseurs RIG-I et PKR (Toth et al. 2009).

Les protéines V de paramyxovirus comme hPIV-2, SeV ou MeV vont cibler la voie des RLR à plusieurs niveaux. Dans un premier temps, le domaine en doigt de zinc situé en C-terminal de la protéine V va interagir avec le domaine hélicase de la protéine MDA5 (Childs et al. 2007). Cette interaction va bloquer l'oligomérisation de MDA5 ainsi que son activité GTPase (Childs et al. 2009; Parisien et al. 2009). Dans un second temps, il a été récemment montré que les protéines V de SeV, MeV et NDV bloquent la translocation nucléaire du facteur IRF3 et empêche l'activation de promoteur IRF3-dépendant (Irie et al. 2012). En plus du blocage des protéines RIG-I et MDA5 de la voie des RLR, la protéine V de MeV est aussi capable de bloquer la translocation nucléaire de la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B, bloquant la voie NF- $\kappa$ B dépendante et l'induction de nombreuses cytokines induites par ce facteur de transcription (Schuhmann et al. 2011).





**Figure 5. Voies d'induction des IFN et interférence virale.** Voies de détection principales des virus de l'ordre *Mononegavirales* par les senseurs RIG-I et MDA5 et stratégies d'évasion virale les mieux caractérisées. Les lignes rouges représentent le blocage ou la compétition pour la liaison entre les protéines. Les lignes noires représentent le déroulement normal de la voie de signalisation (Gerlier et Lyles 2011).

### **1.3.4 La réponse à l'IFN**

L'expression de nombreux gènes de la réponse antivirale est amplifiée et/ou conditionnée par l'action des IFN. On dénombre trois familles d'IFN. Les deux principales sont les familles des IFN de types I et II régulées respectivement par les IFN $\alpha/\beta$ , IFN $\gamma$ .

#### **1.3.4.1 La voie des IFN de type I**

Les cellules sensibles à l'IFN- $\alpha/\beta$  sont celles qui présentent à leur surface le récepteur IFNAR (Novick et al. 1994). Ce récepteur, composé des sous-unités IFNAR-1 et 2, recrute les tyrosines kinases Jak1 et Tyk2, dès fixation de son ligand. Cette liaison provoque la phosphorylation des protéines Jak1 et Tyk2, et permet le recrutement puis la phosphorylation des facteurs de transcription Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) et STAT2. Les STAT activés dimérisent et s'associent à un troisième facteur, IRF-9, pour former le complexe ISGF3 (Platanias 2005). Ce complexe est ensuite transloqué dans le noyau où il va se fixer sur des séquences de régulation appelées IFN stimulated response elements (ISRE) et activer ainsi la transcription de nombreux gènes (Fig. 5) (Randall et Goodbourn 2008). Ces gènes ont principalement un rôle d'amplification de la réponse aux IFN de type I mais aussi dans la synthèse de protéines antivirales ou encore dans la présentation des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de classe I (de Veer et al. 2001).

#### **1.3.4.2 La voie des IFN de type II**

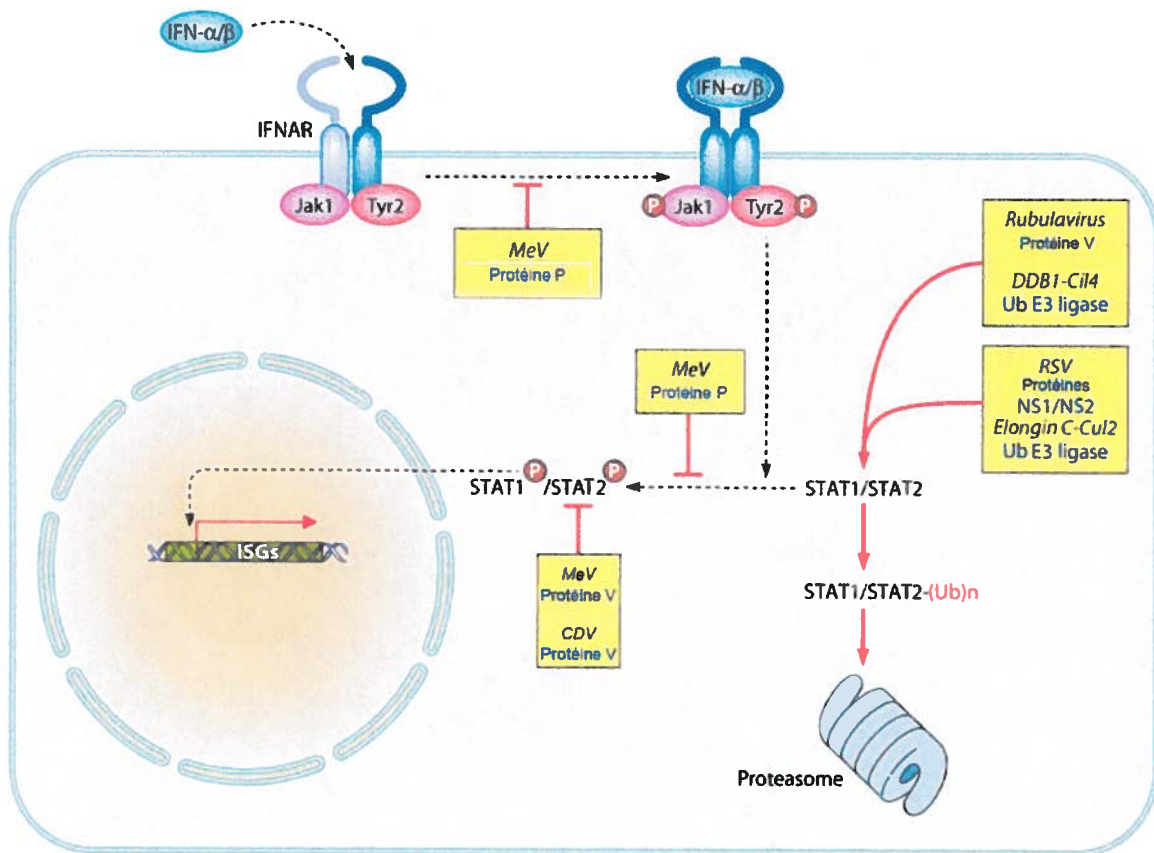
Les cellules immunitaires sont les seules à posséder des récepteur à l'IFN $\gamma$  (IFNGR) à leur surface (Biron 1994). Après activation par fixation de l'IFN $\gamma$ , les tyrosines kinases JAK1/JAK2 seront phosphorylées activant le recrutement, la phosphorylation et l'homodimérisation de STAT1. Cette dimérisation permet la translocation nucléaire de STAT1 et l'activation de gènes possédant des éléments de régulation à l'interféron gamma (GAS) (Platanias 2005). Les protéines produites vont avoir un rôle dans l'activation des macrophages et des cellules NK en augmentant la présentation antigénique par le CMH de classe II et la réponse cytotoxique (Biron et Brossay 2001).

#### **1.3.4.3 Interférence virale sur la voie JAK/STAT**

La voie JAK/STAT est une cible privilégiée des virus de l'ordre des *Mononegavirales*. La protéine V de MeV va se lier à JAK1 afin de bloquer la phosphorylation de STAT1 et de ce fait son activation (Caignard et al. 2007). Les protéines P et V des morbillivirus peuvent également se lier directement à STAT1 par l'intermédiaire de leur domaine N-terminal commun (Devaux et al. 2007; Rothlisberger et al. 2010). En plus, le domaine C-terminal unique va quant à lui être essentiel pour interagir avec STAT2 notamment grâce à des résidus tryptophanes conservés (Caignard et al. 2007). Cette double inhibition de STAT1 et STAT2 permet de bloquer la translocation nucléaire des dimères STAT1/STAT1 mais aussi STAT1/STAT2 et bloquer l'activation à la fois des voies des IFN de types I et II (Devaux et al. 2007; Ramachandran et al. 2008; Caignard et al. 2009; Rothlisberger et al. 2010). Mais d'autres mécanismes d'inhibition ont été élucidés comme par exemple celui de la protéine V des rubulavirus et les protéines NS1 et NS2 des pneumovirus vont adresser les protéines STAT vers le protéasome et induire leur dégradation au lieu de bloquer leur activation (Figure 6) (Elliott et al. 2007).

#### **1.3.5 Contrôle de la synthèse virale par les ISG**

L'expression de plusieurs centaines de gènes est régulée par l'IFN de type I dans les cellules stimulées (de Veer et al. 2001). Ces gènes de réponse à l'IFN ou IFN-stimulated genes (ISG) ont un rôle essentiel dans l'immunité innée. Ils possèdent en général soit une activité antivirale, soit participent eux-mêmes à la signalisation IFN (RLH, IRF-7, STAT1) et produisent ainsi une amplification de la réponse IFN et une activation de la réponse immunitaire adaptative (Sadler et Williams 2008). On regroupe les effets antiviraux des ISG en différents groupes : l'hydrolyse des ARNm, le blocage de la traduction des ARNm, le blocage de la transcription, la mutation des ARNm viraux, le détournement du trafic des protéines virales, l'induction de la mort cellulaire par l'apoptose et l'expression des CMH de classe I et II.



**Figure 6. Voies de réponse aux IFN et interférence virale.** Voies de réponse aux IFN de type I et stratégie d'évasion virale. Les lignes rouges représentent le blocage ou la compétition pour la liaison entre les protéines. Les lignes noires représentent le déroulement normal de la voie de signalisation (Gerlier et Lyles 2011).

#### **1.3.5.1 L'hydrolyse des ARNm**

L'hydrolyse d'ARNm va se faire par l'action de ribonucléases. Les protéines OAS et RNase L restent les mieux caractérisées. La protéine OAS (oligoadénylate-synthétase) induit l'activation de la ribonucléase L (RNase L) via la synthèse, à partir d'ATP, d'oligoadénylates liés en 2'-5'. La RNase L clive ainsi les régions simples brins d'ARN cellulaires ou viraux et dimères d'ARN clivés contenant des groupements 3'-phosphate (Silverman 1994). Il est intéressant de noter que ces petits fragments d'ARN sont capables d'activer les RLH pour induire la synthèse d'IFN- $\alpha/\beta$  (Malathi et al. 2007).

#### **1.3.5.2 Le blocage de la traduction**

La PKR est une sérine-thréonine kinase qui peut se lier aux ARNdb à son extrémité amino-terminale, et possède une activité enzymatique dans sa partie carboxy-terminale (Meurs et al. 1990). En présence d'ARNdb, la protéine subit un changement conformationnel activant son domaine kinase. Cette activation va permettre la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$  le rendant inactif et induisant de ce fait l'arrêt de la traduction des ARN messagers viraux et cellulaires (Williams 1999).

Les protéines de la famille ISG56 sont aussi impliquées dans le blocage de la traduction. Le prototype de cette famille, la protéine ISG56 est fortement induite en présence d'interféron de type I ou des virus à ARN négatif tels que SeV ou encore RSV (Der et al. 1998; Elco et al. 2005; Janssen et al. 2007). Ce sont des protéines cytoplasmiques possédant des motifs tétratricopeptides répétés plusieurs fois (TPR) interagissant entre eux et qui permettent la formation de grands complexes protéiques (D'Andrea et Regan 2003). Les protéines de la famille ISG56 vont se fixer à la sous-unité eIF3e du complexe eIF3 et bloquer l'initiation de la traduction en empêchant la formation du complexe ternaire eIF2/GTP/Met-tRNA<sub>i</sub> (Hui et al. 2003).

#### **1.3.5.3 Le blocage de la transcription virale**

Les protéines GTPases telles que Mx1 vont inhiber la multiplication de nombreux virus à ARN tels que Influenza (Haller et Kochs 2002). Mx1 est exclusivement induit par les IFN de type I. Elle agit en séquestrant les composants viraux nécessaires à la

réplication au niveau du réticulum endoplasmique lisse (Accola et al. 2002; MacMicking 2004; Torisu et al. 2004).

#### **1.3.5.4 La mutation des ARNm viraux**

Les protéines comme ADAR1 vont modifier les ARN viraux changeant un adénine en inosine qui sera reconnu comme guanine par les ribosomes et les ARN polymérase au lieu d'une thymine. Ce mécanisme introduit des mutations au sein du génome viral menant à la production de particule virale non viables (Pfaller et al. 2011).

#### **1.3.5.5 L'expression des CMH**

Les CMH sont des molécules présentatrices de peptides antigéniques à la surface des cellules. La reconnaissance des CMH par leurs récepteurs spécifiques va permettre l'induction d'une réponse immunitaire contre ces cellules et induire leur élimination. Il existe deux familles de CMH, les CMH de classe I exprimés à la surface de toutes les cellules et les CMH de classe II exprimés à la surface des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (cellules dendritiques, les lymphocytes B activés, les macrophages) (Neefjes et al. 2011).

Les CMH de classe I expriment des peptides antigéniques intracellulaires dégradés par le protéasome (Sijts et Kloetzel 2011). Ces peptides sont apprêtés au niveau du réticulum endoplasmique sur des chaînes lourdes HLA et légères  $\beta 2m$  par l'intermédiaire des protéines de transport TAP (Reits et al. 2003). Ces molécules sont ensuite exocytées pour être reconnues par des lymphocytes T CD8 (Jones et al. 1998). Une stimulation par les IFN de types I et II va induire une augmentation d'expression des gènes HLA,  $\beta 2M$  ou encore TAP associés au CMH de classe I (Giacomini et al. 1988).

Les CMH de classe II sont la deuxième classe de CMH qui exprime des peptides antigéniques préalablement endocytés. Ils se composent de deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  qui vont s'associer dans le Réticulum Endoplasmique puis sont transportées par le Golgi jusqu'aux vésicules endosomales où les peptides antigéniques sont dégradés. Une fois dans l'endosome, les peptides antigéniques se lient sur le CMH de classe II et sont

transportés à la surface où ils sont reconnus par les lymphocytes T CD4 et certains lymphocytes B (Vignali 1994; Neefjes et al. 2011). Contrairement au CMH de classe I, les IFN de types II sont associés à l'expression des gènes de la chaîne  $\alpha$  et  $\beta$  du CMH de classe II (Giacomini et al. 1988).

Du fait de l'importance des CMH dans la réponse immunitaire, de nombreux virus ont développé des mécanismes pour empêcher la présentation antigénique par les CMH. Les mécanismes viraux les plus étudiés restent ceux des virus à ADN qui vont bloquer entre autres la dégradation des peptides par le protéasome ou la transcription des gènes du CMH (Horst et al. 2011). Cependant le rôle des protéines des paramyxovirus sur les voies de CMH est encore méconnu bien que des études ont montré une relation entre une diminution d'expression des CMH et l'infection virale (Neumeister et al. 2001; Yilla et al. 2003).

#### 1.4 Problématique, hypothèses et objectifs de travail

Le genre *Morbillivirus* comprend le MeV, le CDV ainsi que d'autres virus infectant les animaux. Le CDV est responsable d'une maladie proche de celle de la rougeole mais qui touche les carnivores tels que les chiens et les furets. Lors d'une infection par MeV et CDV dans leurs hôtes naturels, une immunosuppression va apparaître empêchant l'établissement d'une réponse immunitaire nécessaire pour neutraliser l'infection (Moss et Griffin 2006).

Les morbillivirus sont des virus à ARN simple brin de polarité négative avec un génome codant pour six gènes. L'un de ces gènes code pour trois protéines : la phosphoprotéine P et deux protéines accessoires, V et C. La protéine accessoire V des virus du genre *Morbillivirus* interfère avec la réponse immunitaire innée de l'hôte *in vitro* et est donc un facteur de virulence important (Kerdiles et al. 2006). Ainsi la protéine V de MeV va s'associer avec plusieurs protéines cellulaires impliquées dans les voies de signalisation des interférons, tels que l'ARN hélicase MDA5 (Andrejeva et al. 2009) et les protéines STAT1 et STAT2 (Ramachandran et al. 2008, Rothlisberger et al. 2010).

Néanmoins, l'importance relative de ces interactions et leurs implications dans la pathogénèse morbillivirale demeurent encore inconnues.

Des virus mutants ont été caractérisés précédemment dans le laboratoire. L'un de ces virus (CDV VY110H) est muté sur la tyrosine en position 110 de la protéine V le rendant incapable d'interagir avec la protéine STAT1 et ainsi de bloquer à la fois la voie des IFN de type I et de type II. Un second virus produisant une protéine V portant une mutation sur une des cystéines de son domaine conservé en forme de doigt de zinc (CDV VC255S) est incapable d'interagir avec les protéines MDA5 et STAT2 et d'inhiber la voie d'induction des IFN ainsi que la voie de réponse aux IFN de type I. Bien que le virus CDV VY110H ne soit plus capable de bloquer la voie des IFN de type I et II, il s'est révélé létal lors d'une infection chez le furet. Au contraire, le virus CDV VC255S n'a provoqué qu'une maladie bénigne malgré sa capacité à inhiber la voie des interférons de type II en bloquant la translocation nucléaire des homodimères STAT1/STAT1.

En plus de ces observations, il a été précédemment démontré au cours de tests par gène rapporteur que le contrôle de la transcription du gène Mx1 corrélait avec la létalité des virus. Cette régulation de la transcription de Mx1 n'a pas été observée avec ISG54, un autre gène ISG. Ces résultats suggèrent la présence d'un contrôle sélectif des ISG par la protéine V. Nous émettons l'hypothèse que la protéine V du CDV interfère avec la réponse immunitaire en provoquant une induction différentielle des ISG qui conduira à l'immunosuppression morbillivirale.

Pour tester cette hypothèse, j'ai produit trois lignées cellulaires HeLa exprimant constitutivement la protéine VWT, VY110H et VC255S. J'ai caractérisé et comparé les profils transcriptionnels de ces lignées cellulaires suite à une stimulation aux IFN. Nous avons ensuite identifié les voies de signalisation impliquées dans la régulation des ISG et enfin déterminé le rôle de la présentation antigénique par les CMH dans l'immunosuppression.



## **CHAPITRE 2 - MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### **2.1 Lignées cellulaires et entretien**

Les cellules épithéliales humaines HeLa (CCL-2, ATCC) et les dérivés HeLapCG, HeLaVWT, HeLaVY110H et HeLaVC255S ont été cultivées dans le milieu Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Invitrogen) complémenté avec 5% de sérum fétal bovin (FBS, Invitrogen). Lorsque les cellules atteignent 90% de confluence, le milieu est remplacé par PBS1X - 0.2 g/L EDTA (Versene, Invitrogen) et les cellules sont incubées à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> jusqu'à détachement. Les cellules sont ensuite récupérées puis centrifugées 5 min à 800 g. Le culot est resuspendu dans un volume approprié de DMEM+5% FBS et 10% des cellules sont remises dans le flacon.

### **2.2 Génération des lignées cellulaires stables**

#### **2.2.1 Transfection**

Un puit d'une plaque à 6 puits a étéensemencé par des cellules HeLa dans du DMEM+5% FBS et incubé à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> jusqu'à atteindre 90% de confluence. Juste avant la transfection, le milieu est remplacé par de DMEM et le mélange de transfection préparé. Brièvement, 4 µg de plasmide vide pCG ou bien codant soit pour la protéine VWT, le mutant VY110H ou le mutant VC255S et 8 µL de Turbofect (Fermentas) ont été mélangé dans 500 µL d'OPTIMEM (Invitrogen) puis incubé 20 min à température ambiante. Le mélange de transfection est ensuite déposé goutte à goutte dans le puitensemencé et la plaque est incubée 24 h à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

#### **2.2.2 Sélection des cellules**

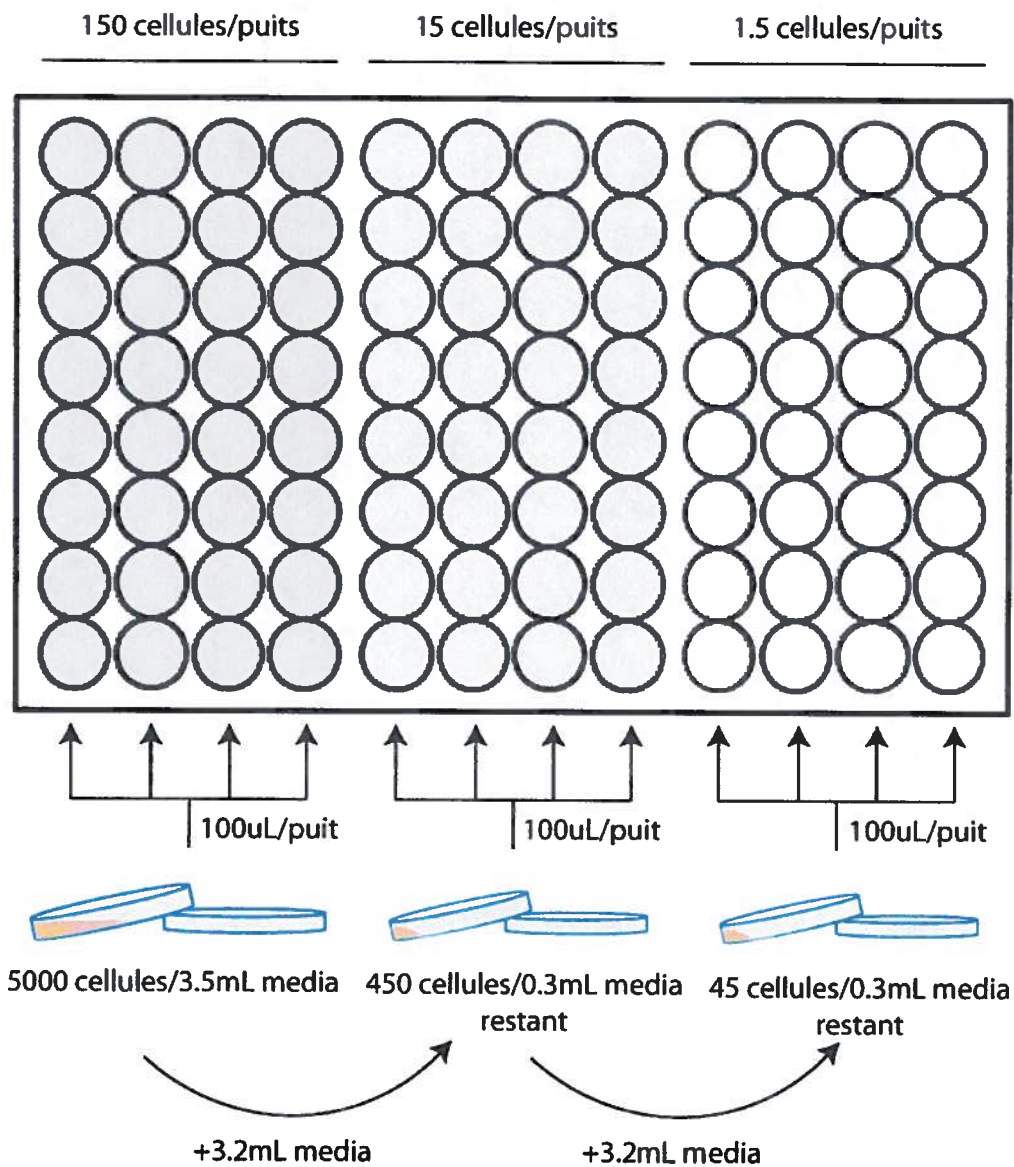
Le jour suivant, les cellules ont été détachées par de la Versene, divisée en trois puis resuspendues dans le milieu de sélection DMEM+5% FBS contenant 250 µg/mL de Zeocin (Invitrogen) pour ensemenecer 3 nouveaux puits d'une plaque à 6 puits. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> dans le milieu de sélection jusqu'à

l'apparition d'îlots. La sélection peut durer de 1 à 2 semaines avant que des échantillons de protéines ont été prélevés pour tester l'expression des protéines transfectées par immunobuvardage.

### **2.2.3 Isolement de clones par la méthode de dilution en série**

Le but est d'obtenir un îlot cellulaire provenant d'un clone cellulaire. Pour cela, une plaque 96 puits estensemencée comme décrit dans la figure 6. Brièvement, les cellules sont récupérées, centrifugées et comptées. Dans un premier temps, nous visons 150 cellules dans les 32 premiers puits. Nous allons préparer 5 000 cellules dans 3.5 mL de milieu de sélection dans une boîte de pétri stérile et nous distribuons 100 µL de ce mélange dans chacun des 32 premiers puits. Il reste environ 0.3 mL de milieu contenant 450 cellules dans la boîte de pétri. Dans un second temps, nous rajoutons à nouveau dans la boîte de pétri 3.2 mL de milieu de sélection. Nous avons ainsi dilué d'environ dix fois la concentration cellulaire initiale. Nous redistribuons 100µL du mélange dans les 32 puits suivants de la plaque. Enfin, nous recommençons une dernière fois l'étape précédente afin d'obtenir une seconde dilution de la concentration de cellules que nous distribuons dans les puits restants (Figure 7).

Les cellules sont entretenues dans du DMEM+10% FBS avec 250 µg/mL de Zeocin à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> jusqu'à leur confluence. Elles sont ensuite détachées puisensemencées dans une plaque 6 puits dans du milieu de sélection jusqu'à leur confluence. Les protéines sont récupérées pour tester l'expression des protéines recombinantes. Une seconde dilution en série est ensuite ré-effectuée à plus forte dilution. Lorsqu'une population clonale a été sélectionnée, une flasque T25cm<sup>2</sup> estensemencée dans du milieu de sélection. Les protéines sont extraites à nouveau afin de vérifier le niveau d'expression de la protéine transfectées et un test par cytométrie en flux est effectué afin d'évaluer si la population sélectionnée est monoclonale.



**Figure 7. Sélection clonale par dilution en série.** Un mélange de cinq mille cellules resuspendues dans 3.5mL de milieu de sélection est produit. Cent µL de ce mélange contenant approximativement 150 cellules est distribué dans chacun des 32 premiers puits d'une plaque 96 puits. Une dilution au dixième est effectuée en rajoutant 3.2mL de milieu de sélection sur le mélange initial restant et 100 µL contenant environ 15 cellules ont été mis dans chacun des 32 puits suivants. L'étape de dilution est répétée une troisième fois pour les 32 derniers puits de la plaque afin d'avoir environ 1.5 cellules dans chacun des puits.

## **2.2.4 Vérification de l'expression de la protéine V**

### **2.2.4.1 Extraction des protéines**

Les cellules sont d'abord lavées trois fois dans du PBS 1X froid puis lysées dans du tampon RIPA (1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1% sodium deoxycholate, 50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 150 mM NaCl) contenant un cocktail d'inhibiteur de protéases (Roche) à 4°C sous agitation pendant 20 min. Le lysat est ensuite récupéré et centrifugé à 12 000 g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant est récupéré et conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

### **2.2.4.2 Immunobuvardage**

Les échantillons sont mélangés avec un volume équivalent de tampon Laemmli (Tris HCL pH 6.8, 2% SDS, 10% glycérol, 0.01% bromophénol blue, DTT 100mM) et les protéines sont dénaturées après ébullition à 100°C pendant 5 min et transférées sur glace. Les échantillons sont ensuite chargés sur un gel de polyacrylamide 10% en condition dénaturantes (SDS-PAGE 10%). Le gel est transféré sur une membrane de polyvinyl-difluoride (PVDF, Millipore Corporation) à 12V pendant 30 min dans du tampon semi-dry (Tris 250mM, glycine 2M). La membrane est récupérée et bloquée à 4°C dans du tampon de blocage pendant la nuit. Le lendemain, elle est lavée trois fois par du tampon de lavage (TBS 1X, 0.1% Tween 20) pendant 5 min puis incubée pendant 1h dans du tampon de blocage contenant un sérum de lapin reconnaissant les résidus 18 à 39 de la partie N-terminale de la protéine V (von Messling et al. 2006). La membrane est soumise à trois nouvelles étapes de lavages puis incubée 1 h avec du tampon de blocage contenant un sérum anti-lapin couplé avec la peroxydase (Sigma-Aldrich). La membrane est à nouveau lavée trois fois et finalement incubée 5 min avec l'ECL Plus Western Blot Détection Kit (GE Healthcare) avant d'être révélée par système d'imagerie (Kodak).

### **2.2.4.3 Cytométrie en flux**

Les cellules des lignées cellulaires HeLaVWT, HeLaVY110H, HeLaVC255S ont été ensemencées dans des plaques à 6 puits contenant du DMEM+10% FBS jusqu'à 80% de confluence. Les cellules sont ensuite récupérées après 5 min d'incubation dans de la

Versene à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> et lavées dans du tampon Perm/Wash (BD Biosciences). Après centrifugation à 800g pendant 5 min, le culot est resuspendu dans du Cytoperm/Cytofix (BD biosciences) à 4°C durant la nuit puis soumis à une étape de lavage dans du tampon Perm/Wash et centrifugé 5 min à 800g. Les cellules sont incubées pendant 45 min avec l'anticorps anti-P/V clone 3.768 (Orvell et al. 1985) à 4°C puis à nouveau lavées dans le tampon Perm/Wash et centrifugées à 800g pendant 5 min. Un second marquage est alors effectué avec un anticorps anti-souris couplé à la phycoérythrine (JacksonImmunoResearch Laboratories, Inc.) pendant 45 min à 4°C à l'abri de la lumière. Une dernière étape de lavage est effectuée et les échantillons sont resuspendus dans 300 µL de 1% paraformaldéhyde (PFA) et lus sur le cytomètre BD FACSCalibur jusqu'à l'acquisition de 10 000 événements.

## **2.3 Préparation des échantillons pour l'analyse transcriptomique**

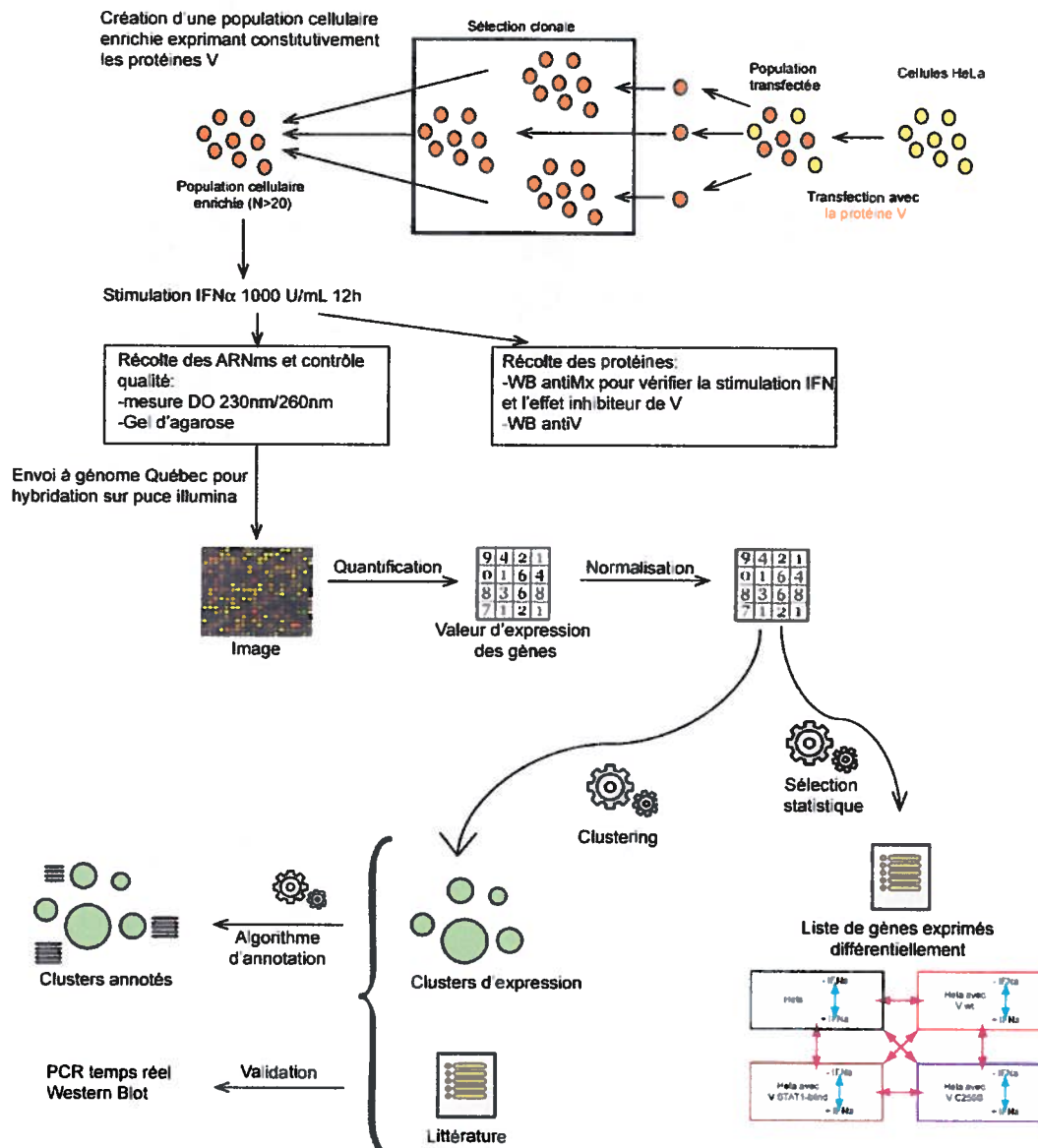
### **2.3.1 Stimulation des HeLa**

Chaque lignée cellulaire estensemencée dans quatre puits d'une plaque à 6 puits à raison de 300 000 cellules par puits et gardée à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> dans du DMEM+5% FBS jusqu'au lendemain. Pour chaque lignée, deux de ces puits seront incubés en présence d'IFN tandis que deux autres serviront de contrôle non stimulé. Pour cela, le milieu est remplacé et les cellules incubées dans du DMEM+5% FBS avec ou sans IFN $\alpha$  à une concentration de 1000 U/mL (R&D Systems) pendant 12 h à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> (Figure 8).

### **2.3.2 Extraction d'ARN**

L'ARN de chacune des lignées est récupéré à l'aide du RNeasy mini Kit (Quiagen). Pour ce faire, les cellules sont lavées trois fois dans du PBS 1X gardé à 4°C. Les cellules sont ensuite lysées dans 350 µL de tampon RLT contenant 10 µL/mL de  $\beta$ -mercaptoéthanol. Le lysat est transféré sur une colonne QIAshredder et centrifugé à vitesse maximale pendant 2 min. Le *flow-through* est recueilli puis mélangé avec 350 µL d'éthanol à 70% et purifié sur une mini colonne RNeasy. L'ARN est élué dans 30

μL d'eau sans ARNase puis aliquotés en fraction de 10 μL et conservé à -80°C jusqu'à utilisation.



**Figure 8. Processus expérimental de détermination des gènes induits par les IFN dans les lignées exprimant la protéine V.** Les lignées cellulaires sont produites puis stimulées par l'IFN. L'ARN et les protéines sont extraits et soumis respectivement à l'analyse par biopuce et immunobuvardage. Les données des biopuces sont recueillies, normalisées et comparées suivant les différentes conditions. Elles sont soumises à des analyses statistiques de regroupement et les fonctions des gènes identifiés sont récupérées dans la base de données GO. Dans un dernier temps, 17 gènes sélectionnés par cette étude sont confirmés quantitativement par immunobuvardage ou PCR quantitative en temps réel.

## 2.4 Analyse des puces à ADN

### 2.4.1 La technologie Illumina

La technologie Illumina est un système permettant l'étude d'expression génomique à haut débit. Elle repose sur un réseau de billes en silicium au sein desquelles des oligonucléotides sont attachés. Les billes sont déposées aléatoirement dans des puits présents sur une surface prédéfinie (par exemple une lame de verre) et la biopuce ainsi générée est décodée en identifiant la combinaison billes-oligonucléotides présente dans chaque puit.

#### 2.4.1.1 Description de la puce Illumina HumanHT-12

La puce Illumina HumanHT-12 v4.0 utilisée permet de détecter le niveau de transcription des gènes déjà caractérisés ou prédits ainsi que les différentes versions résultant d'épissage alternatif. Pour cela, chaque puce possède plus de 47 000 sondes représentant 99.98% du génome humain. Chaque sonde est conçue afin de couvrir toute la base de données NCBI RefSeq Release 38 et Unigene. De plus, la surface sur laquelle les billes sont déposées peut contenir jusqu'à 12 échantillons à tester facilitant les études à haut débit.

#### 2.4.1.2 Fonctionnement de la puce

L'analyse de l'expression des gènes est effectuée en deux étapes et repose sur l'utilisation des sondes oligonucléotidiques d'une taille de 79 bases divisées en deux parties. La partie 5' se compose de 50 nt conçus pour s'hybrider avec les transcrits du génome humain. La partie 3' code pour 29nt qui servira à l'identification de la bille. Chaque partie 3' d'une sonde est unique et permet d'identifier l'oligonucléotide sans ambiguïté une fois déposée sur la puce (Figure 9A).

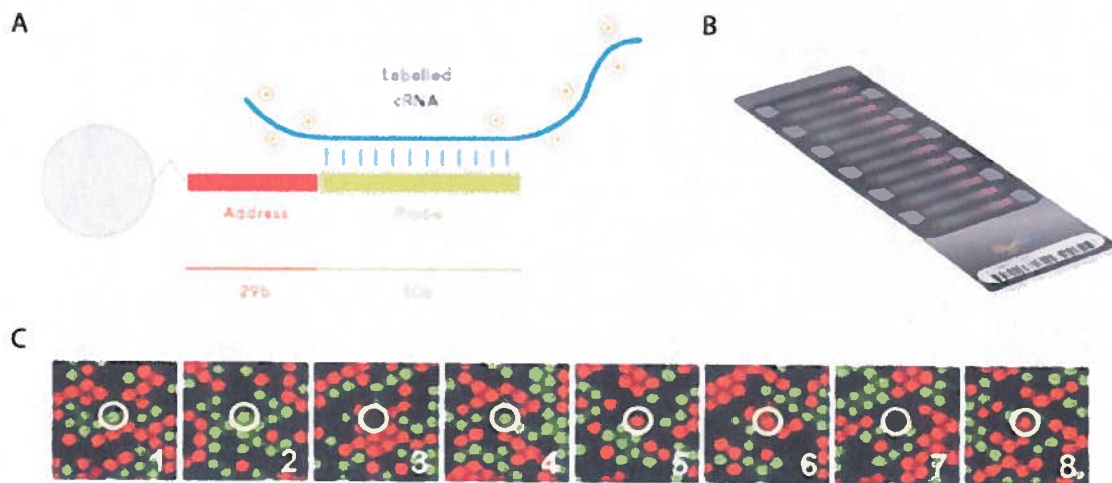
Jusqu'à 47 000 oligonucléotides différents sont ainsi créés. L'ARN extrait des cellules est transformé en ADNc double brin par transcription inverse afin de rendre les échantillons plus stables dans la durée. Pour l'hybridation, l'ADNc produit est transcrit *in vitro* en ARNc. Lors de cette transcription, les bases d'uraciles sont marquées à la biotine qui permettra d'évaluer le niveau d'expression du gène correspondant. L'ARNc marqué est mélangé avec les sondes oligonucléotidiques pour hybridation. Les billes de

silicium sont alors introduites dans le mélange et déposées aléatoirement en quantité égale et uniformément à la surface de la plaque en verre contenant les puits à billes (Figure 9B). La plaque est lavée et incubée en présence d'une molécule fluorescente reconnaissant la biotine. La puce est ensuite lue grâce à un laser qui évaluera l'intensité du signal de chaque bille.

Une dernière étape est nécessaire afin d'identifier la bille qui a été lue. Ce décodage sera possible grâce à la séquence unique d'identification présente sur l'oligonucléotide. La puce est alors incubée séquentiellement avec des sondes de 3nt de couleurs différentes (verte pour la carboxyfluorescéine, rouge pour cyanine 3, ou non marqué) à très fortes concentrations qui vont venir s'hybrider sur la partie 3' de la sonde oligonucléotidiques, puis lavées afin de retirer tous signaux non spécifiques. Ainsi après chaque étape d'hybridation, les billes seront soit vertes, soit rouges, soit non colorées et si l'on assigne un chiffre à chaque couleur (0 pour non coloré, 1 pour vert et 2 pour rouge), on obtient un code d'identification numérique. Des étapes d'hybridation sont répétées plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un code d'identification numérique permettant de distinguer sans ambiguïté l'identité de chaque bille et des sondes d'oligonucléotides (Gunderson et al. 2004).

La Figure 9C donne un exemple d'identification par hybridation séquentielle. À la première hybridation, le vert est détecté. Nous assignons alors le nombre 1 à cette bille. À la seconde hybridation, le vert est à nouveau détecté et le nombre 1 est à nouveau assigné. Nous répétons les hybridations jusqu'à ce que nous obtenions alors le code 11012202 qui nous permettra d'identifier la bille et la séquence d'oligonucléotides qui y est rattachée.





**Figure 9. Fonctionnement la puce Illumina HumanHT-12.** (A) L'ARNc extrait des cellules et biotinylé va s'hybrider la partie 5' de la sonde oligonucléotidique. La partie 3' servira à son identification et a son attachement à la bille de silicium. (B) Les billes sont placées sur une plaque en verre pouvant héberger jusqu'à 12 échantillons différents. (C) Exemple d'identification. La bille isolée possède le code 11012202.

### **2.4.2 Évaluation de l'expression des gènes**

La qualité des ARN extrait des différentes lignées cellulaires stables est évaluée par nanodrop et par gel d'électrophorèse avant d'être envoyées au centre d'innovation Génome Québec et de l'Université McGill. La qualité des échantillons est de nouveau évaluée par bioanalyzer afin de s'assurer qu'ils n'ont pas été dégradés durant le transport. L'hybridation de l'ARN sur les puces et leur décodage ont ensuite été effectués (Figure 8).

Les données obtenues sont tout d'abord normalisées en utilisant l'algorithme Limma au sein de l'application FlexArray. La variance entre chaque échantillon est inférieure à 0.001. La différence d'expression des gènes après stimulation par l'IFN dans chaque lignée est évaluée par le test statistique EB de Wright et Simon. Toute expression de gènes supérieures à 2 ( $p < 0.05$ ) est considérée comme significative.

### **2.4.3 Clusterisation et analyse fonctionnelle**

Les gènes ayant le même profil d'expression ont été regroupés sous forme de clusters en utilisant l'algorithme de distance des K-moyen (K-mean) par corrélation de Pearson avec un maximum de 50 itérations à partir du logiciel MEV. Sept clusters ont été isolés car ils représentaient la meilleure classification. Une seconde clusterisation hiérarchique (HCL) calculant les moyennes des distances entre chaque groupe (average distance clustering) a été effectuée en parallèle sur les différents échantillons et a identifié deux groupes de deux échantillons se ressemblant. Les gènes de chacun des sept clusters ont été soumis au logiciel DAVID afin de rechercher les processus biologiques et les voies de signalisation les impliquant en interrogeant les bases de données GO (Gene Ontology) et KEGG respectivement (Dennis et al. 2003). Le seuil d'analyse du logiciel DAVID a été fixé de telle sorte que chaque résultat soit constitué d'au moins 5 gènes et d'une  $p$ -value  $< 0.001$  (Figure 8).

## **2.4.4 Validation des données de la puce à ADN**

### **2.4.4.1 Vérification par PCR temps réel**

L'expression de 17 gènes sélectionnés a de plus été évaluée par PCR quantitative en temps réel. Les échantillons d'ARN utilisés pour la biopuce ont été envoyés au service de génomique de l'IRIC. Le niveau de transcription des gènes ACTB et HPRT1 a été utilisé afin de normaliser l'expression des 17 autres gènes. Le niveau de transcription des ARNm est représenté par la formule changement d'expression =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### **2.4.4.2 Vérification par immunobuvardage**

L'immunobuvardage est effectué comme décrit dans la partie 3.2.4.2 Une première incubation avec des anticorps dirigés contre les protéines Mx1 (Origene), STAT1 et STAT2 (Santa-Cruz Biotechnology) est faite et des anticorps secondaire anti-souris ou lapin couplé à la peroxydase (Sigma-Aldrich) sont utilisés pour la détection.

## **2.5 Évaluation du niveau d'expression des CMH de classe I**

### **2.5.1 Préparation des échantillons**

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 6 puits dans du DMEM+10% FBS jusqu'à 50% de confluence. Le milieu a été changé puis remplacé par du DMEM+10% FBS contenant 1000 U/mL d'IFN $\alpha$  pendant 12 h, 24 h et 48 h à 37C, 5% CO $_2$ . Pour chaque temps d'incubation, un puit non stimulé est aussi utilisé et servira à normaliser le niveau d'expression des CMH de classe I par rapport aux cellules stimulées

### **2.5.2 Cytométrie en flux**

Pour chaque puits, les cellules sont divisées en deux groupes qui serviront pour les marquages de surfaces et les marquages intracellulaires. Pour les marquages intracellulaires du CMH de classe I, les cellules sont fixées et perméabilisées pendant 20 min à 4°C dans du Cytoperm/Cytofix (BD biosciences). Les cellules sont ensuite

lavées dans le tampon de FACS pour le marquage de surface ou du tampon Perm/Wash pour le marquage intracellulaire. Les cellules sont ensuite centrifugées à 800 g pendant 5 min. Les cellules sont incubées avec l'anticorps anti-HLA-PE (Biolegends) pendant 30 min à 4°C à l'abri de la lumière. Les cellules sont à nouveau lavées dans le tampon FACS et centrifugées à 800 g pendant 5 min puis resuspendues dans 500 µL de PBS 1X. Le niveau d'expression des CMH de classe I est ensuite mesuré par un cytomètre BD Fortessa (BD Biosciences) jusqu'à acquisition de 25 000 événements.

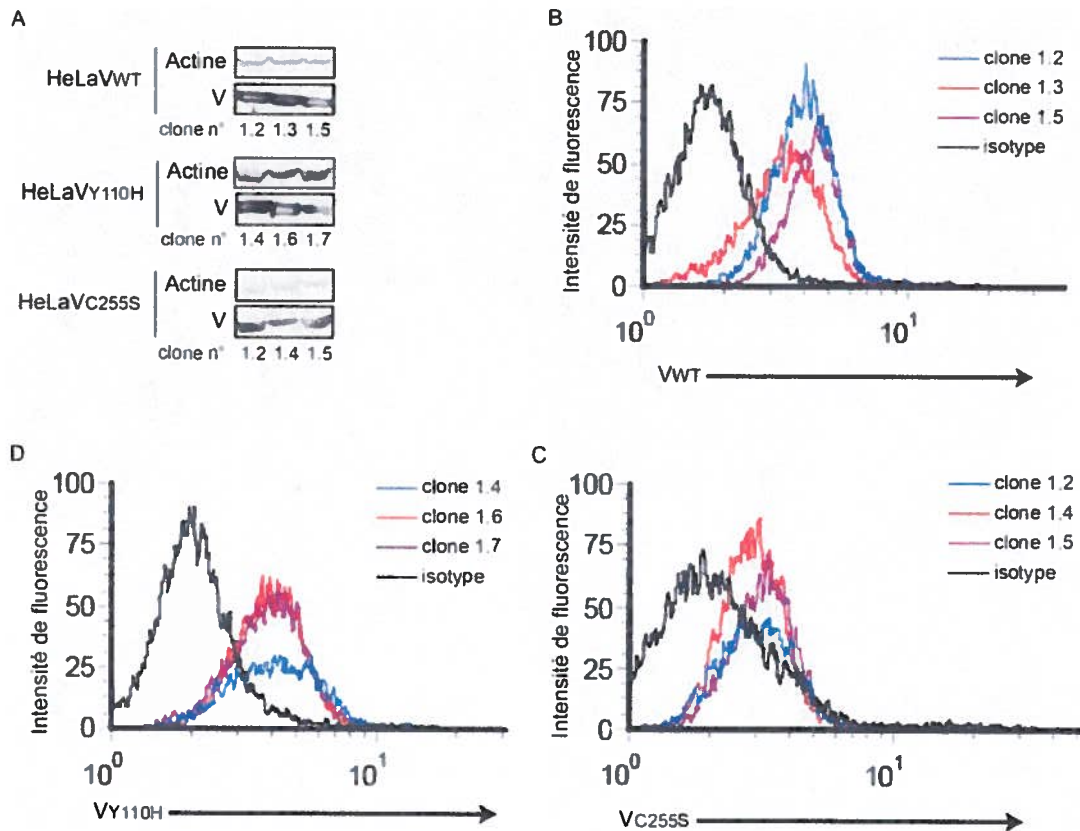
## **CHAPITRE 3 - RÉSULTATS**

### **3.1 La fonctionnalité des protéines V est conservée dans les lignées cellulaires stables HeLaVWT, HeLaVY110H et HeLaVC255S**

#### **3.1.1 Les lignées stables sont issues de populations monoclonales et expriment les protéines VWT, VY110H et VC255S à niveau équivalent**

Afin d'étudier les effets de la protéine V sur la réponse immunitaire, nous avons choisi de générer des lignées cellulaires stables capables d'exprimer constitutivement les protéines VWT, VY110H et VC255S. L'utilisation d'une population cellulaire homogène nous permettra d'empêcher l'apparition d'un signal provenant de cellules n'exprimant pas la protéine V et d'un effet indirect de celles-ci après stimulation sur le reste de la population cellulaire.

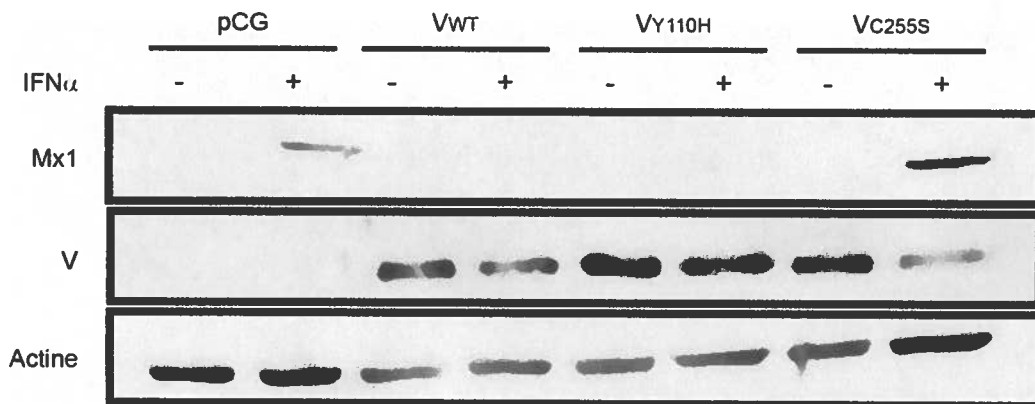
Nous avons choisi la lignée cellulaire HeLa d'une part parce qu'il s'agit de cellules épithéliales, l'une des cibles de l'infection morbillivirale, et d'autre part parce qu'elle a été utilisée précédemment dans des études de profilage transcriptionnel. De plus, l'origine humaine de cette lignée nous assure la disponibilité de réactifs pour les validations subséquentes. Suite à la transfection, une première sélection clonale par dilution en série a été effectuée en présence de zéocine. Après avoir testé l'expression de la protéine V par immunobuvardage dans les clones sélectionnés (données non présentées), nous avons procédé à une seconde sélection clonale. Nous avons isolés des populations cellulaires monoclonales exprimant l'une des protéines V que nous avons testées par immunobuvardage (Figure 10 A) et cytométrie en flux (Figure 10 B-D). Pour chacune des protéines V, une vingtaine de clones ont été isolés et par la suite, regroupés en trois populations cellulaires pour chaque protéine V afin d'éviter tout biais provoqué par un clone mal fonctionnel. Ces lignées serviront à établir les profils transcriptionnels des cellules en présence de V.



**Figure 10. Évaluation des niveaux d'expression de la protéine V des clones cellulaires stables après sélection.** (A) Expression des protéines V dans les lignées cellulaires stables après sélection. Les extraits protéiques totaux ont été récupérés pour l'analyse. Un sérum dirigé contre la partie N-terminale de la protéine V a été utilisé. (B-D) Analyse de l'expression de la protéine VWT, VY110H et VC255S dans ces mêmes lignées par cytométrie en flux. L'anticorps monoclonal dirigé contre la protéine P est utilisé. En noir est représenté le signal en présence de contrôle isotypique, tandis qu'en bleu, rouge et violet est représentée le niveau d'expression de la protéine V dans les lignées. 10 000 événements ont été acquisitionnés sur un BD FACSCalibur.

### 3.1.2 L'expression des protéines VWT et VY110H bloque la réponse à l'IFN

La protéine V des morbillivirus interfère avec la réponse immunitaire en bloquant par exemple la réponse aux IFN. Avant d'effectuer l'analyse transcriptomique, nous avons évalué si l'expression constitutive de la protéine V dans nos lignées stables permettait de maintenir une inhibition de la réponse antivirale. Les lignées HeLa<sub>pCG</sub> (exprimant constitutivement le plasmide d'expression vide pCG utilisé pour l'expression de la protéine V), HeLaVWT, HeLaVY110H, HeLaVC255S, ont été stimulées par l'IFN $\alpha$  afin d'enclencher la synthèse des ISG. Dans un premier temps, l'expression de Mx1, une protéine induite par les IFN, est détectée uniquement dans les lignées HeLa<sub>pCG</sub> et HeLaVC255S suite à la stimulation (Figure 11). De plus, l'expression de la protéine VWT et les protéines mutantes VY110H et VC255S sont synthétisées en quantité équivalente en présence et absence d'IFN, malgré de légères variations des protéines VWT et VC255S observées après stimulation qui n'ont pas été reproduites dans des expériences supplémentaires (Figure 16). Ceci nous indique d'une part que l'expression de la protéine V n'est pas régulée par cette cytokine, et confirme d'autre part que seules les protéines VWT et VY110H empêchent l'induction d'un état antiviral.



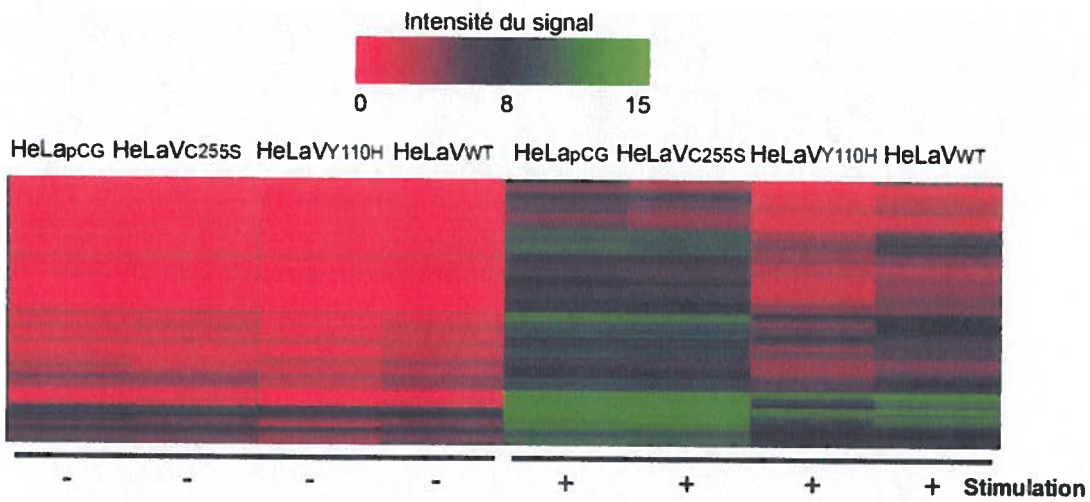
**Figure 11.** Expression des protéines Mx1 et V dans les lignées après stimulation par l'IFN. Les extraits protéiques totaux issus des lignées stables ont été récupérés après 12 h de stimulation par 1000 U/mL d'IFN $\alpha$ . Un sérum dirigé contre la partie N-terminale de la protéine V et un anticorps monoclonal ciblant Mx1 ont été utilisés pour la détection des protéines.

### 3.2 Les protéines VWT et VY110H réduisent la transcription des ISG

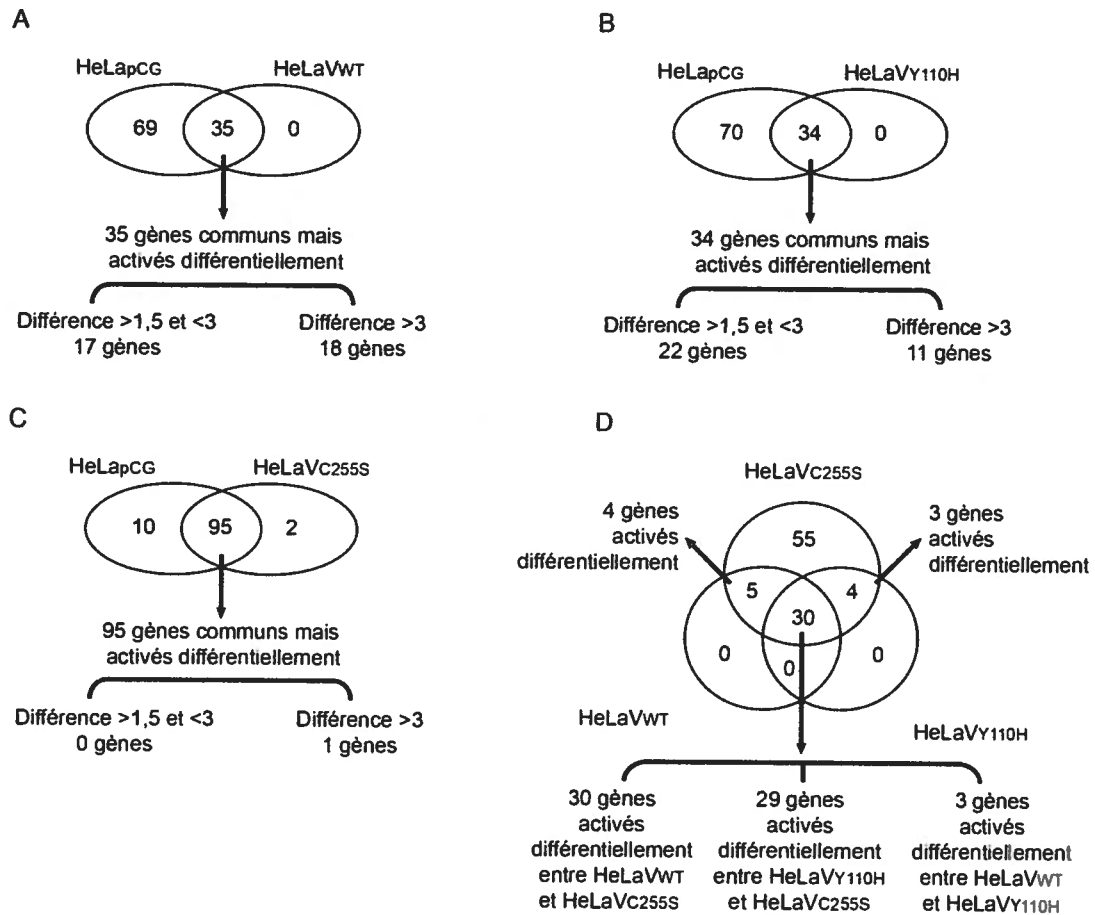
La protéine VY110H ne bloque plus les voies des IFN de type I et II mais un virus portant cette mutation demeure toujours virulent. A l'inverse, un virus produisant la protéine VC255S perd sa virulence bien qu'il conserve sa capacité d'interférer avec la voie des IFN de type II. Pour caractériser cette corrélation entre la virulence et une expression différentielle des ISG, nous avons comparé les profils transcriptionnels des cellules produisant les différentes protéines V mutées par micropuces à ADN. En absence d'IFN, le niveau de transcription reste relativement similaire dans toutes les lignées. A l'opposé, en présence d'IFN, deux types de profils apparaissent. Le premier, comprenant les cellules HeLa<sub>pCG</sub> et HeLa<sub>VC255S</sub>, indique une forte augmentation de la transcription des gènes induits par les IFN tandis que le second, constitué des lignées HeLa<sub>VWT</sub> et HeLa<sub>VY110H</sub>, ne montre qu'une augmentation limitée de la transcription de certains gènes uniquement (Figure 12 et Annexe II et III).

Après stimulation, 104 gènes sont régulés à la hausse dans les cellules HeLa<sub>pCG</sub>, alors que seuls 35 et 34 gènes sont augmentés dans les lignées HeLa<sub>VWT</sub> et HeLa<sub>VY110H</sub>, respectivement. Cependant, bien qu'activées, le niveau d'induction de ces gènes dans les HeLa<sub>VWT</sub> et HeLa<sub>VY110H</sub> reste inférieur à celui observé dans les HeLa<sub>pCG</sub> (jusqu'à 1.5 fois) (Figure 13 A et B). Les cellules HeLa<sub>VC255S</sub>, quant à elles, ne montrent qu'une très faible interférence de la protéine V sur l'activation des ISG avec 97 gènes surexprimés à des niveaux similaires aux HeLa<sub>pCG</sub> (Figure 13 C). Pour finir, en étudiant les différences dans les profils transcriptionnels des lignées HeLa exprimant les différentes protéines V, nous avons constaté qu'environ la moitié des gènes (55 gènes) était exclusivement induit en présence de VC255S. Trente gènes sont communs aux trois profils mais leur induction dans les HeLa<sub>VWT</sub> et HeLa<sub>VY110H</sub> reste très réduite par rapport aux HeLa<sub>VC255S</sub> (Figure 13 D), indiquant que seules les protéines VWT et VY110H limitent fortement l'activation des ISG.





**Figure 12. Profils transcriptionnels des différentes lignées HeLa transgéniques en absence et présence d'IFN.** Les profils sont regroupés par lignées cellulaires en fonction de leur similarité dans une carte d'expression « heatmap ». Un code de couleur allant du rouge au vert représente l'intensité des signaux avec la couleur rouge désignant un signal d'intensité minimale tandis que la couleur verte désigne un signal d'intensité maximale.

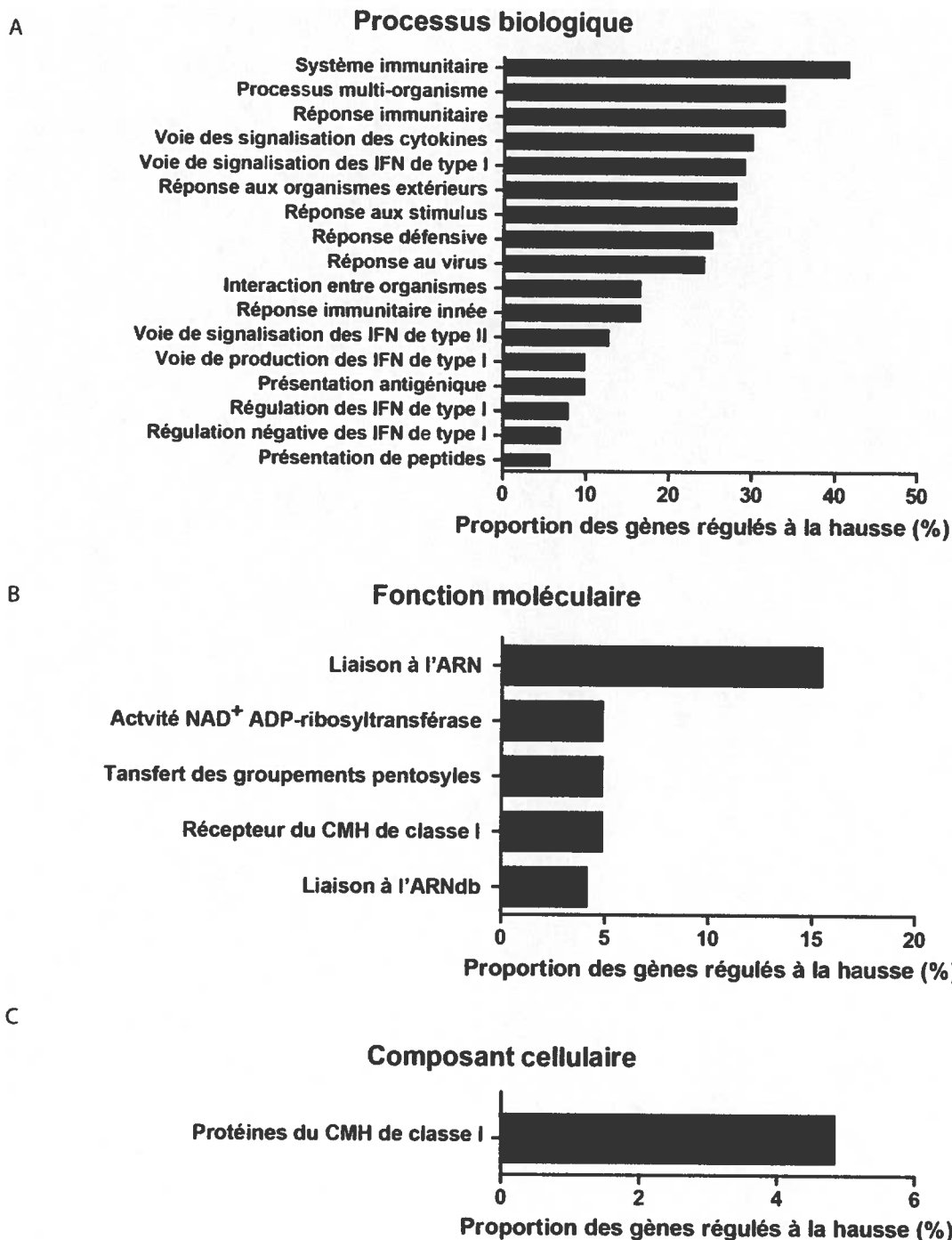


**Figure 13. Analyse comparative des profils transcriptionnels des gènes activés par l'IFN.** Diagrammes de Venn montrant les gènes communs entre les cellules HeLa<sub>pCG</sub> et HeLa<sub>VWT</sub> (A) ou HeLa<sub>VY110H</sub> (B) ou HeLa<sub>Vc255S</sub> (C). Comparaison entre les 3 différentes protéines V (D). Le nombre de gènes communs dont la différence d'induction entre chaque lignée est supérieure à 1,5 est indiqué en bas du diagramme. Seuls les gènes dont l'induction est supérieure à 2 après stimulation et avec une p-value < 0.05 ont été sélectionnés pour l'analyse comparative.

### 3.3 La protéine V cible majoritairement les gènes impliqués dans la réponse immunitaire antivirale

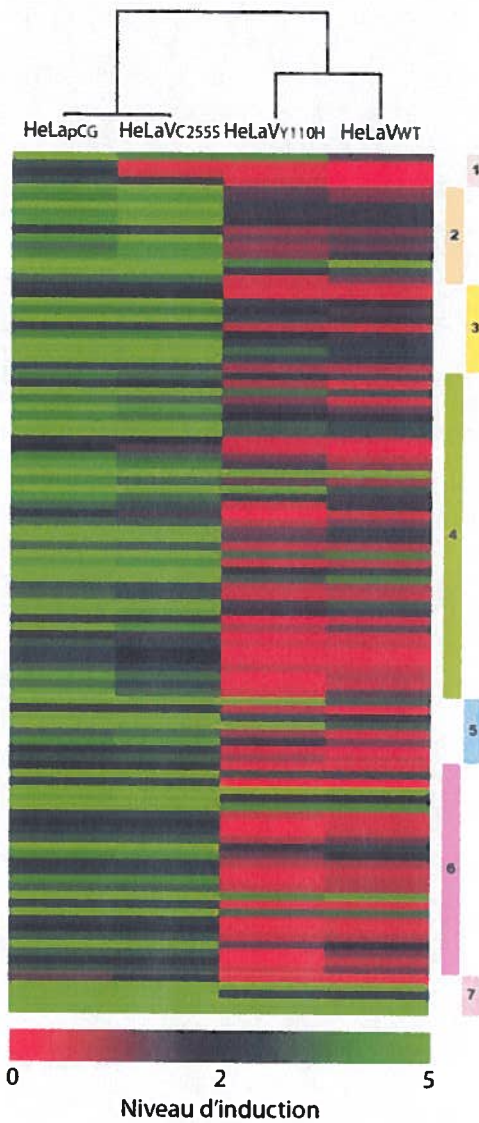
Les ISG ont des rôles très variés afin de lutter contre les agents pathogènes. Pour mieux caractériser les effets de la protéine V sur la réponse antivirale, nous avons classifié les ISG identifiés dans notre analyse de micropuces à ADN en fonction de leur fonction moléculaire, de la location cellulaire, ou de leur implication dans un processus biologique (Gene Ontology). Cela a révélé qu'une forte proportion des ISG induits était impliquée dans les processus de réponse immunitaire et antivirale ou encore dans le métabolisme des protéines (Figure 14 A). Ils ont principalement un rôle dans la liaison aux ARN (Figure 14 B) et sont impliqués dans la présentation antigénique du CMH de classe I (Figure 14 C). La liste de toutes les fonctions reconnues est indiquée dans l'annexe 2.

Les profils transcriptionnels ont été soumis à une étude statistique afin d'identifier les groupes de gènes ou clusters se comportant de façon identique (Figure 15 A). Les clusters 1, 2, 3 et 5 ne contenaient pas un nombre significatif de gènes associés à des fonctions biologiques similaires. Les trois clusters restant sont par contre composés de gènes impliqués dans les processus de réponses immunitaires et antivirales ( $P < 10^{-10}$ ) ainsi que dans les voies des IFN de type I et des cytokines ( $P < 10^{-4}$ ). Les profils transcriptionnels des clusters 4 et 6 montrent une augmentation d'induction des gènes de la réponse immunitaire et antivirale dans les cellules HeLa<sub>pCG</sub> et HeLa<sub>VC255S</sub> alors que ceux-ci sont fortement réduits dans les HeLa<sub>VWT</sub> et HeLa<sub>VY110H</sub>. Cependant les gènes composant le cluster 7 ne semblent pas beaucoup affectés par la protéine V (Figure 15 B).

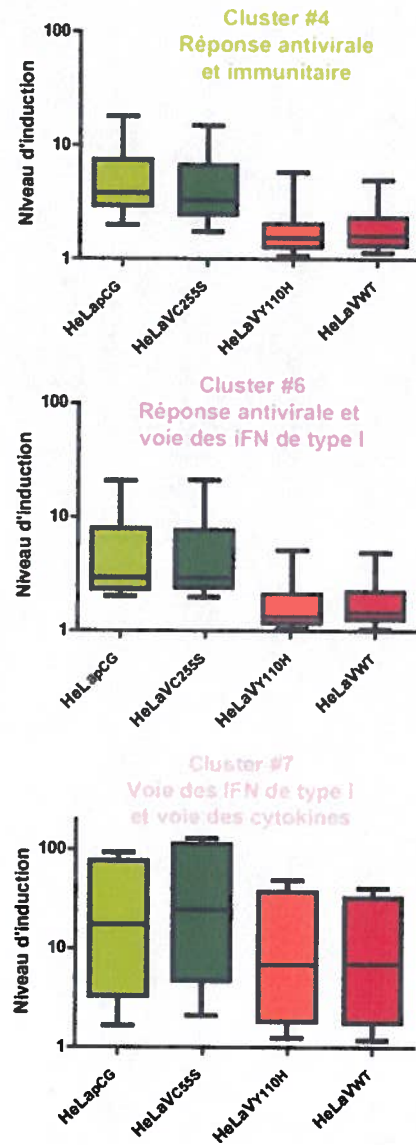


**Figure 14. Classification fonctionnelle des gènes régulés par la protéine V.** Les 104 gènes régulés par la protéine V sont regroupés selon les critères de classification de la base de données GO : processus biologiques (A), fonction moléculaire (B) et composant cellulaire (C). Seules classes sur-représentées après soumission et ayant une p-value < 0.001 ont été récupérées pour l'analyse.

A



B



**Figure 15. Profils transcriptionnels des gènes activés par les IFN après clusterisation.** (A) Carte d'expression des clusters des gènes après analyse selon la méthode des K-moyen. Les gènes dont l'induction est supérieure à 2 et avec une  $p$ -value < 0.05 sont considérés dans l'analyse statistique. Un minimum de 7 clusters permet de différencier les différents sous-groupes de gènes. La liste des gènes de chaque cluster se trouve en annexe 1. (B) Les gènes de trois clusters sont impliqués dans des fonctions biologiques communes avec une  $p$ -value < 0.001. Les données représentent une moyenne de trois réplicats.

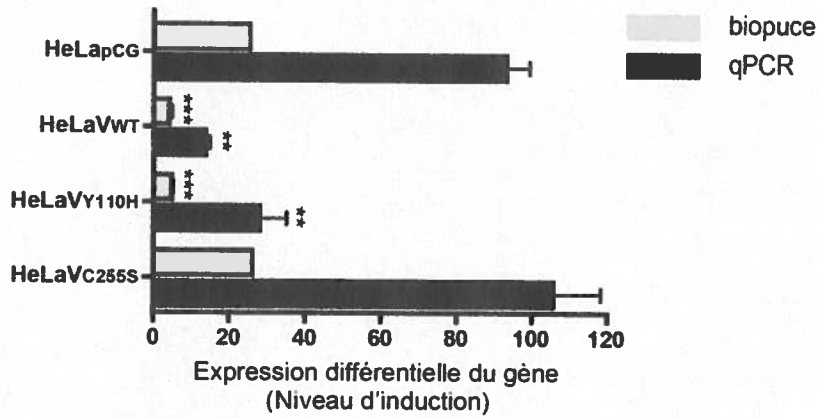
### 3.4 La protéine V bloque l'expression des ISG identifiés par biopuce

Afin de confirmer l'exactitude des données de l'analyse des biopuces au niveau transcriptionnel et protéique, nous avons comparé d'une part le niveau d'expression de deux gènes du cluster numéro 4 fortement induits, Mx1 et OAS1, par qPCR en temps réel et d'autre part des gènes Mx1, STAT1 et STAT2 par immunobuvardage.

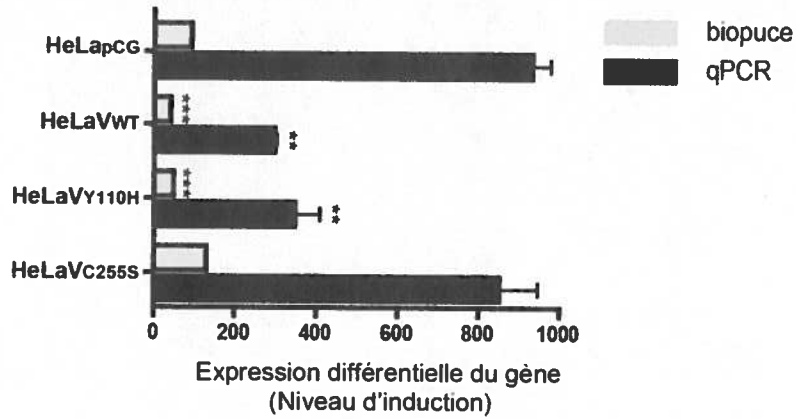
La quantification des ARNm des gènes Mx1 et OAS1 par qPCR en temps réel a démontré une réduction significative est observée après stimulation en présence de la protéine VWT ou VY110H comparativement aux cellules HeLa<sub>pCG</sub> et HeLa<sub>VC255S</sub> (Figure 16 A et B) confirmant les résultats des analyses par biopuce.

Une analyse d'expression protéique par immunobuvardage a démontré l'absence de la protéine Mx1 dans les cellules non stimulées ainsi qu'un niveau d'expression basal des protéines STAT1 et STAT2. De plus, nous constatons que Mx1 est produite seulement dans les cellules HeLa<sub>pCG</sub> et HeLa<sub>VC255S</sub> suite à la stimulation tandis que le niveau des protéines STAT1 et STAT2 est aussi augmenté. Cependant, l'expression de ces dernières reste à un niveau basal dans les cellules HeLa<sub>VWT</sub> et HeLa<sub>VY110H</sub> (Figure 16 C). Ces données sont cohérentes avec celles obtenues dans l'analyse transcriptomique et prises ensemble nous permettent de valider l'étude par puce à ADN.

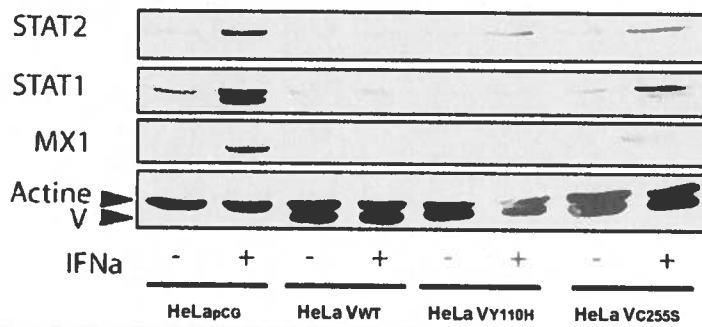
A.



B.



C.



**Figure 16. Validation des données de biopuces.** Comparaison de l'induction des gènes OAS1 (A) et MX1 (B) par qPCR temps réel et puce à ADN. Les données représentent l'expression des gènes dans les cellules stimulées par l'IFN par rapport aux cellules non stimulées. Un test de Student sur une moyenne de 3 réplicats a été effectué par rapport aux valeurs des cellules HeLa<sub>pcG</sub>. \*\* :  $p < 0.01$  et \*\*\* :  $p < 0.001$ . (C) Expression des protéines STAT1, STAT2, Mx1 et V par immunobuvardage après 12h de stimulation par 1000 U/mL d'IFN $\alpha$ .

### 3.5 Les gènes des voies des RLR et des CMH de classe I sont particulièrement visés par la protéine V

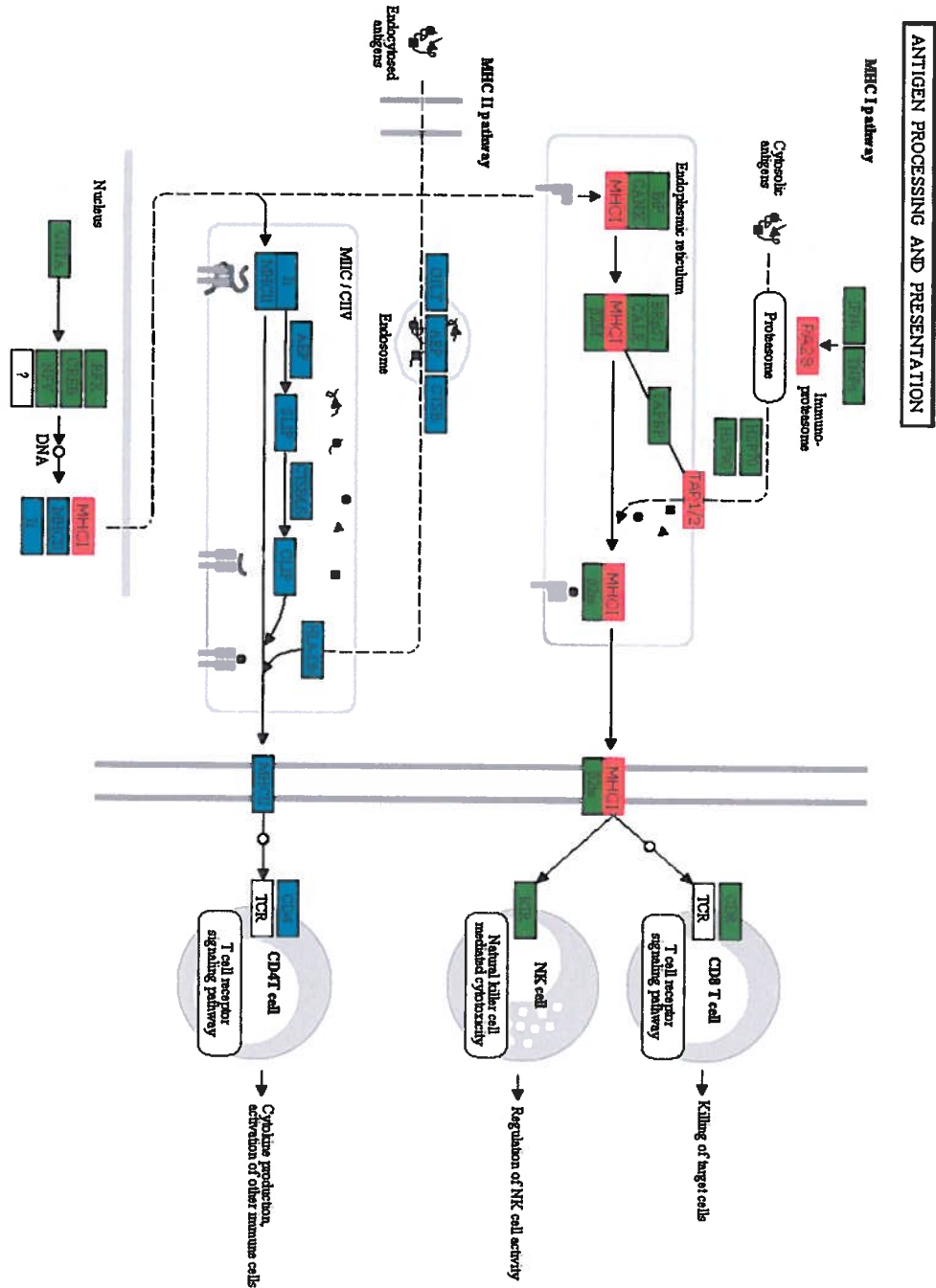
Pour identifier les voies de signalisation impliquant les ISG affectés par la protéine V afin de découvrir de nouveaux rôles de la protéine V dans l'immunosuppression, nous avons interrogé la base de données KEGG. Cette base de données rassemble toutes les interactions protéines-protéines identifiées et regroupe leur rôle dans les voies de signalisation connues. Cela nous a permis à l'identification de plusieurs voies de signalisation afin de mieux cibler le rôle de la protéine V (Tableau 1).

Voie de signalisation	Nombre	P-Value	Gènes impliqués
<b>Rougeole</b>	13	5.73E-13	ADAR, IRF9, DDX58, IRF7, MX1, OAS1, OAS2, OAS3, IFIH1, TNFS1, STAT1, STAT2, EIF2KA2
<b>Voie des RLR</b>	6	1.42E-04	DDX58, IFIH1, ISG15, IRF7, TRIM25, CXCL10
<b>Voie du CMH de classe I</b>	6	2.97E-04	PSME1, PSME2, TAP1, HLA-C, HLA-B, HLA-E, HLA-F

**Tableau 1. Identification des voies de signalisation affectées par la protéine V déduites des profils transcriptionnels.** Les voies de signalisation de la base de données KEGG ont servi de base d'analyse pour la recherche de voie de signalisation régulées par V. Un minimum de 5 gènes et une p-value<0.001 ont été utilisées comme critère de sélection pour l'identification.



La première voie de signalisation ressortant de cette analyse est celle de la voie de signalisation de la rougeole. Ce résultat attendu nous confirme une fois de plus le rapport entre CDV et MeV et l'activité conservée de leur protéine V. Nous y voyons que ce sont principalement les voies des RLR et JAK/STAT qui sont touchées ainsi que certains gènes de l'apoptose comme la protéine TRAIL ou CASP1 (Annexe I Figure 22). La seconde voie de signalisation affectée par la présence de V est celle des RLR avec les protéines RIG-I, MDA5, ISG15 ou encore IRF7 régulées à la baisse. De plus, on remarque que certains gènes de voies de signalisation activées par la voie des RLR sont aussi touchés. Ainsi ce sont la voie des MAPK, de l'apoptose ou encore du protéasome qui semblent être compromises (Annexe 1 Figure 23). La dernière voie de signalisation identifiée est celle des CMH de classe I. En effet, l'expression des gènes des chaînes lourdes HLA ou des transporteurs TAP n'est pas induite en présence de V (Figure 17).



**Figure 17. Voie de signalisation des CMH de classe I et II.** Schéma basé sur le diagramme HSA04612 de la base de données KEGG. En rouge sont représentés les gènes dont l'induction est bloquée par la protéine V par biopuce. En vert et bleu sont indiqués les gènes impliqués dans la voie des CMH de classe I et de classe II respectivement, et ne sont pas régulés par V.

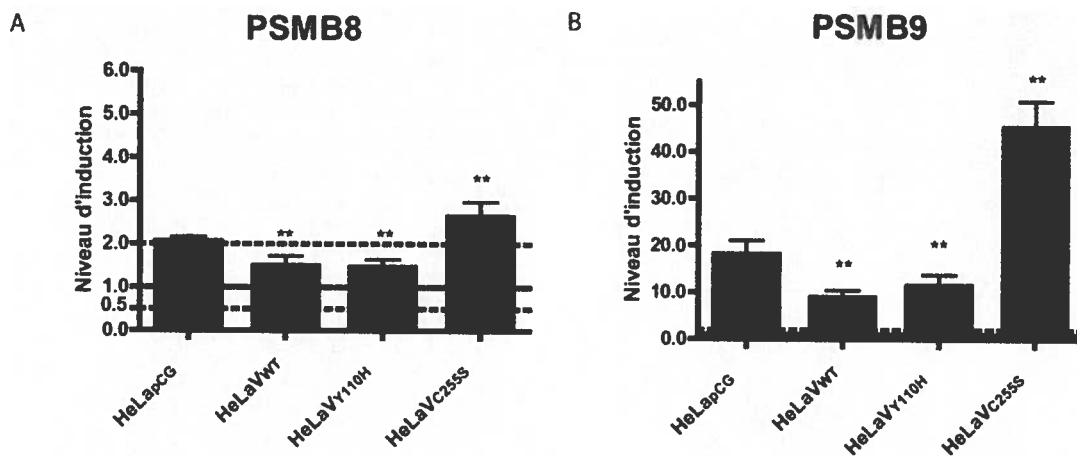
### **3.6 La protéine V bloque la voie des CMH de classe I**

Parmi les voies de signalisation identifiées, nous avons décidé d'étudier le rôle de la protéine V sur la voie des CMH de classe I car la régulation à la baisse des gènes du CMH de classe I laisse la possibilité d'une baisse d'efficacité de la présentation antigénique en présence de V. Alors que l'interférence des virus à ADN sur la présentation antigénique est bien établie (Fruh et al. 1999), ceci n'est pas connu pour les virus à ARNs à polarité négative.

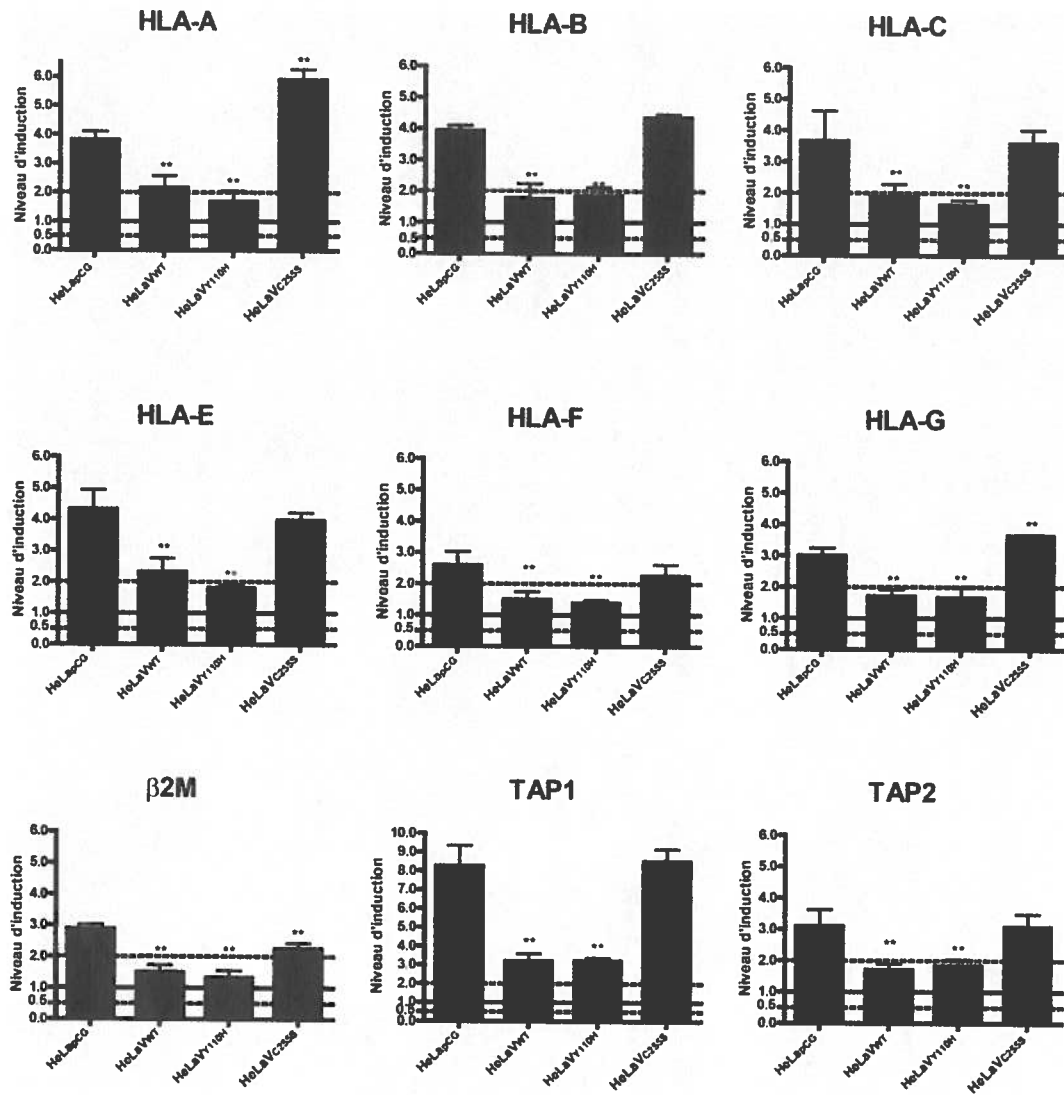
#### **3.6.1 La transcription des gènes de l'immunoprotéasome et du CMH de classe I est bloquée par V**

Dans un premier temps, nous avons cherché à confirmer les observations des profils transcriptionnels en évaluant le niveau d'expression des gènes du CMH de classe I par qPCR en temps réel. Une diminution de l'activation de deux gènes de l'immunoprotéasome, PSMB8 et PSMB9, apparaît en présence de la protéine VWT ou VY110H. De plus, en présence de la protéine VC255S, ces gènes sont plus fortement induits que dans les cellules n'exprimant pas la protéine V (Figure 18).

Une fois les protéines virales dégradées par l'immunoprotéasome, les peptides antigéniques sont amenés et apprêtés par les protéines TAP1 et TAP2 au niveau des chaînes lourdes HLA et  $\beta$ 2M. En comparant le niveau d'induction de ces gènes, nous constatons que pour tous les gènes testés, leurs inductions sont réduites significativement lorsque la protéine VWT ou VY110H est exprimée. Par contre, l'induction de ces mêmes gènes est identique dans les lignées HeLa<sub>apCG</sub> et HeLa<sub>VC255S</sub>, à l'exception du gène HLA-A, qui est activé environ 1,5 fois plus dans les HeLa<sub>VC255S</sub> (Figure 19).



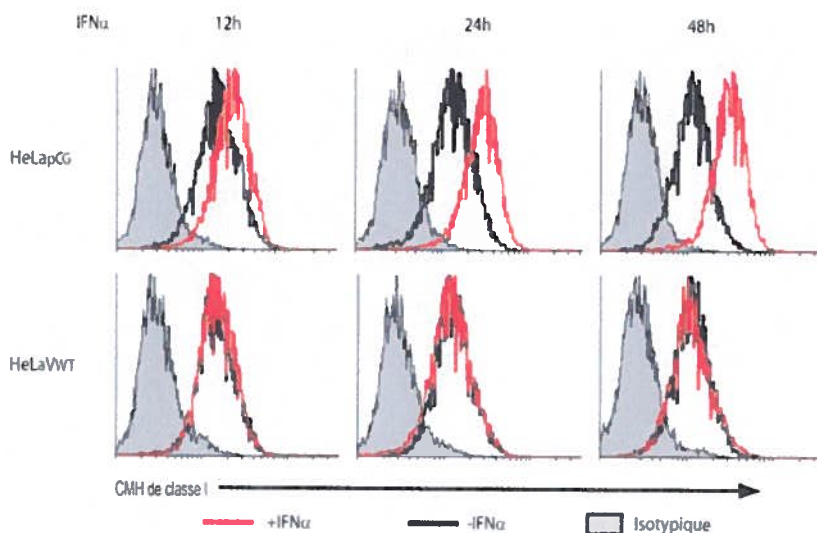
**Figure 18. Niveau d'induction des gènes du protéasome par qPCR temps réel.** Expression des gènes de l'immunoprotéasome PSMB8 (A) et PSMB9 (B) dans les cellules stimulées par l'IFN par rapport aux cellules non stimulées dans les lignées HeLa stables. Un niveau d'induction inférieur à 0.5 ou supérieur à 2 est considéré comme biologiquement significatif. Un test de Student sur une moyenne de trois réplicats a été effectué par rapport aux valeurs des cellules HeLaapCG. \*\*:  $p < 0.01$ .



**Figure 19. Niveau d'induction des gènes du CMH de classe I.** Expression des gènes du CMH de classe I dans les cellules stimulées par l'IFN par rapport aux cellules non stimulées dans les lignées HeLa stables. Un niveau d'induction inférieur à 0.5 ou supérieur à 2 est considéré comme biologiquement significatif. Un test de Student sur une moyenne de trois réplicats a été effectué par rapport aux valeurs des cellules HeLaCG. \*\* :  $p < 0.01$ .

### 3.6.2 La protéine V bloque l'expression du CMH de classe I à la surface des cellules

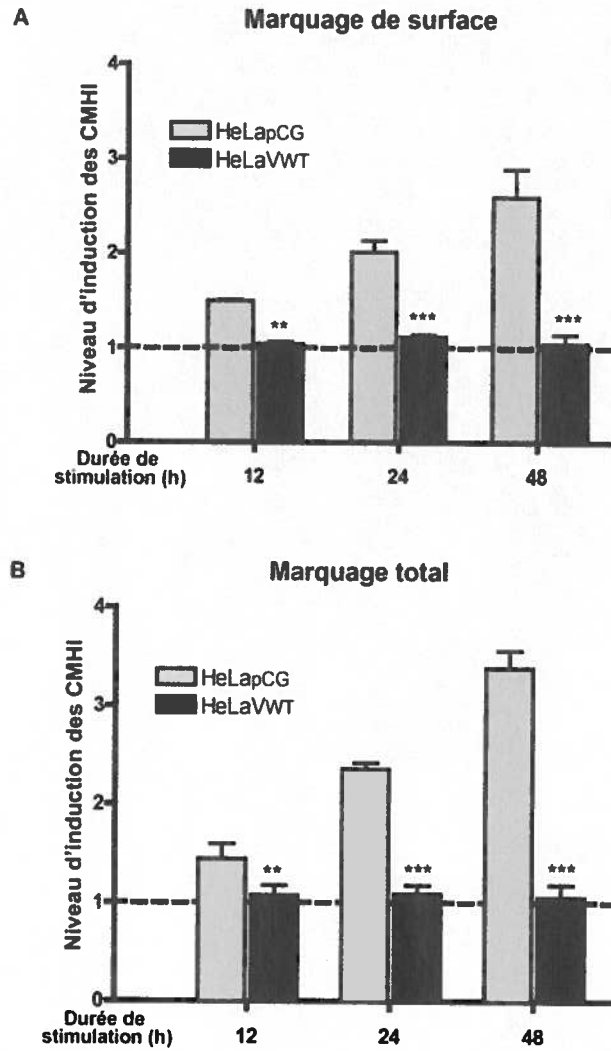
Basée sur notre observation que la protéine V bloquait l'induction des gènes des voies du CMH de classe I, nous avons investigué la conséquence de cet effet sur l'expression des CMH de classe I à la surface des cellules par cytométrie en flux. Jusqu'à présent, notre étude a montré que l'activation des gènes du CMH de classe I était inhibée dans les cellules HeLaVWT et HeLaVY110H et non dans les HeLaVC255S. Étant donné les similitudes entre les profils transcriptionnels des lignées cellulaires HeLaVWT et HeLaVY110H ainsi que HeLapCG et HeLaVC255S, nous avons choisi de concentrer notre analyse dans les lignées HeLaVWT et HeLapCG car elles sont susceptibles d'indiquer la plus grande différence sur l'expression du CMH de classe I. Après stimulation, le CMH de classe I est induit à la surface des HeLapCG alors que son expression se maintient à un niveau basal dans les HeLaVWT (Figure 20).



**Figure 20. Expression à la surface des cellules du CMH de classe I.** Le niveau d'expression du CMH de classe I à la surface des cellules HeLapCG et HeLaVWT sans IFN (noir) et après 12 h, 24 h, et 48 h de stimulation à l'IFN $\alpha$  (rouge) est analysé par cytométrie en flux. Les cellules marquées par un contrôle isotypique sont représentées par la courbe grise. 25 000 événements ont été acquis et lus sur un BD LSRFortessa.

La quantification du CMH de classe I à la surface des cellules a montré une augmentation de leur expression, jusqu'à trois fois, seulement en absence de V (Figure 21 A).

Enfin, pour s'assurer que cet effet ne soit pas provoqué par une rétention du CMH de classe I dans la cellule par la protéine V, nous avons analysé le niveau d'expression total du CMH de classe I dans les cellules. Nous remarquons que la quantité de CMH de classe I dans les cellules est augmentée en présence d'IFN seulement dans les HeLapCG alors qu'elle se maintient à un niveau basal en présence de la protéine V (Figure 21 B). Ces données confirment que la protéine V interfère avec le CMH de classe I en bloquant son expression.



**Figure 21. Quantification de l'induction du CMH de classe I par cytométrie en flux.** Le niveau d'expression du CMH de classe I à la surface (A) et total (B) dans les cellules après 12 h, 24 h, et 48 h de stimulation à l'IFN par rapport aux cellules non stimulées dans les lignées stables HeLapCG (gris) et HeLaVWT (noir). 25 000 événements ont été acquis sur un BD LSRFortessa. Un test de Student sur une moyenne de 3 réplicats a été effectué par rapport aux valeurs des cellules HeLapCG aux différents temps. \*\* :  $p < 0.01$  et \*\*\* :  $p < 0.001$ .



## CHAPITRE 4 – DISCUSSION

La protéine V des morbillivirus inhibe ou à défaut régule la réponse de défense cellulaire face à l'infection. Cette inhibition joue un rôle important dans la virulence et l'immunosuppression morbillivirale. En interagissant avec des molécules clés de la réponse aux IFN, elle est capable d'empêcher la synthèse d'IFN de type I et de bloquer leur effet. En étudiant la pathogenèse grâce à des virus recombinants, une infection par un virus portant une mutation sur la tyrosine 110 en partie N-terminale de la protéine V s'est prouvée létale dans des furets bien qu'il ne soit plus capable d'inhiber la voie des IFN de type I et II. A l'opposé, un virus codant pour une protéine V dont la structure en doigt de zinc est absente ne s'avère pas mortel bien qu'il ne soit plus capable de bloquer la voie des IFN de type I (Svitek et al, article en préparation). Cette aptitude à bloquer sélectivement la voie des IFN nous a amené à caractériser son impact sur l'expression d'ISG en détail.

### 4.1 La protéine V régule l'expression des ISG

L'étude des profils transcriptionnels a montré dans un premier temps que l'expression de la protéine V dans les cellules à l'état quiescent ne perturbe pas la transcription des gènes nécessaires au fonctionnement normal de la cellule. C'est cependant uniquement lors de la présence d'une réponse de défense cellulaire, en l'occurrence celle des IFN de type I, que l'effet de la protéine V se manifeste. Donc suite à une stimulation aux IFN, une forte inhibition des ISG est observée en présence de la protéine VWT ou VY110H mais pas VC255S.

La majorité des ISG régulés sont impliqués dans la réponse immunitaire et antivirale, affectant les gènes de la voie des RLR tels que RIG-I et MDA5, et de la voie JAK/STAT avec STAT1, STAT2 et IRF9. Cette faculté de diminuer l'expression des gènes des principales voies de réponse à une infection est intéressante étant donné qu'elle s'ajoute à la capacité de la protéine V à bloquer directement ces voies. Elle serait alors capable non seulement d'empêcher l'activation d'une réponse IFN mais

aussi de bloquer la boucle d'amplification normalement initiée par celle-ci (Platanias et al, 2008).

La capacité de la protéine V des morbillivirus à bloquer la translocation nucléaire des protéines STAT1 et STAT2 empêche l'activation des ISG dépendants de ces activateurs transcriptionnels (Platanias et al, 2008). Cependant, le blocage partiel de l'induction des ISG par les protéines VWT et VY110H laisse supposer la présence d'autres activateurs transcriptionnels activés par les IFN non régulés par la protéine V. En effet, il existe plusieurs protéines de type STAT pouvant être activés par les IFN. Ils s'associent et forment des homo- ou hétérodimères qui induiront la transcription de gènes (Platanias et al, 2008). En plus des STAT, d'autres molécules possèdent la capacité d'induire la transcription des ISG. Plus particulièrement, l'activation par l'IFN de la voie de signalisation PI3K ainsi que de la voie des MAPK qui conduira à la phosphorylation de p38 est capable d'induire directement la transcription des ISG (Ronni et al, 1995, Bandyopadhyay et al. 1995, Grant et al. 1995). Les paramyxovirus hPIV3 et SeV, par exemple, modulent la réponse à l'IFN en bloquant la voie JAK/STAT mais aussi la voie des MAPK en interagissant avec les protéines STAT1 et GRB2 respectivement (Caignard et al, 2009).

#### **4.2 La protéine V retarde l'apparition de la réponse immunitaire adaptative**

L'inhibition des ISG va permettre de moduler la réponse immunitaire innée. Dans notre étude, plusieurs gènes des voies des RLR et JAK/ STAT et des CMH de classe I sont fortement supprimés par la protéine V. De plus, on remarque la diminution d'expression d'autres gènes, TRAIL, CASP1 et PKR, qui sont impliqués dans les voies de l'apoptose, de la synthèse de cytokines et des MAPK respectivement.

L'infection morbillivirale s'accompagne d'une immunosuppression se caractérisant entre autre par une leucopénie et une baisse de la prolifération lymphocytaire et d'une réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires (von Messling et al, 2006, Svitek et al, 2007). Dans cette étude, une diminution de l'expression de la protéine CASP1 a été observée. La protéine CASP1 est responsable

du clivage de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 en IL-1 $\beta$  qui aura un rôle dans divers processus cellulaires comme la prolifération cellulaire, la différenciation ou encore l'apoptose (Loppnow et al, 2000). En agissant sur CASP1, la protéine V réduirait la production et donc les effets d'IL-1 $\beta$ . Cette diminution pourrait expliquer en partie l'inhibition de la prolifération cellulaire que l'on observe durant une infection morbillivirale et mais aussi l'inhibition de l'apoptose (Pillet et al, 2009).

L'apoptose est une voie de défense de la cellule à l'infection. Les cellules apoptotiques sont rapidement phagocytées facilitant la présentation des antigènes viraux (Albert et al. 2004). Les morbillivirus sont capables de provoquer ou de bloquer l'apoptose (Pillet et al. 2009 ; Cruz et al. 2006 ; Esolen et al. 1995 ; Thot et al. 2009). Une étude a montré que la protéine V de MeV interagit avec p73 et empêche l'activation de p53 et de l'apoptose alors qu'une autre étude montre, au contraire, un effet de l'infection par MeV sur PKR qui activerait l'apoptose (Cruz et al, 2006, Thot et al, 2009). Dans le cas d'une infection par CDV, une inhibition de l'apoptose spécifique aux types cellulaires a été observée durant une infection létale chez les furets (Pillet et al, 2009). En tenant en compte de la régulation à la baisse des gènes TRAIL, PKR et Eif2aK observée dans notre étude, il est possible que la protéine V contribue à l'inhibition de l'apoptose en empêchant la synthèse de ces trois protéines.

Les CMH sont des protéines majeures de la réponse immunitaire. Ils permettent d'initier la réponse immunitaire adaptative. Du fait de leur importance, de nombreux virus notamment à ADN vont bloquer leur expression pour empêcher la reconnaissance antigénique (Fruh et al, 1999). Cependant, le rôle des morbillivirus sur l'expression des CMH est très peu caractérisé (Yilla et al 2003, Leopardi et al, 1993). Nous avons montré que l'induction des gènes des chaînes lourdes HLA et secondaire  $\beta$ 2M était inhibée par la protéine V après stimulation. Cette observation a été confirmée par cytométrie en flux où nous avons vu un blocage de l'induction des gènes du CMH qui empêche leur surexpression à la surface des cellules exprimant la protéine VWT. Cependant la présence d'un niveau d'expression basal des CMH de classe I dans les cellules produisant la protéine V nous montre que cet effet inhibiteur n'est pas causé par une induction de la dégradation des CMH par la protéine V. De part cela, le virus

laisserait à la cellule la possibilité de toujours exprimer à sa surface le CMH de classe I. Les cellules NK expriment à leur surface des récepteurs de type *killer-cell immunoglobulin-like* (KIR) qui régulent les fonctions cytotoxiques de cellules NK en interagissant avec les CMH de classe I à la surface des cellules cibles. Cette interaction a pour rôle de bloquer l'activation des cellules NK (Vilches et Parham 2002). Cependant lors d'une infection, la diminution d'expression des CMH de classe I va empêcher l'interaction du CMH de classe I avec les récepteurs KIR et conduire à l'activation des cellules NK et la destruction des cellules infectées (Mocikat et al. 2003). Notre étude a montré que la protéine V des morbillivirus va maintenir un niveau d'expression basal du CMH de classe I qui pourrait empêcher la détection d'une baisse du CMH de classe I par les cellules NK activées et leur destruction. Enfin, le blocage d'une surexpression des CMH de classe I à la surface des cellules retarderait la reconnaissance des peptides antigéniques par le TCR du lymphocyte T (Gao et Jacobsen 2000) et donc la mise en place de la réponse immunitaire adaptative laissant le temps au virus de se répliquer et de se propager.

#### **4.3 La structure en doigt de zinc est importante pour une réponse efficace aux IFN**

La protéine V des morbillivirus est importante pour l'immunosuppression et le contrôle de la réponse immunitaire (von Messling et al. 2006). Le résidu Y110 est responsable de son interaction avec la protéine STAT1 et du blocage des voies de signalisation des IFN de type I et de type II (Ohno et al. 2004; Caignard et al. 2007; Devaux et al. 2007; Bankamp et al. 2008; Nakatsu et al. 2008; Ramachandran et al. 2008). La particularité de cette protéine reste son domaine C-terminal formant une structure en doigt de zinc hautement conservée chez les paramyxovirus (Horvath 2004; Lamb 2007). Des mutations sur les résidus cystéine le composant rendent la protéine incapable d'inhiber les voies d'induction des IFN et de réponse aux IFN de type I (Ohno et al. 2004). Son rôle dans la virulence et la létalité du virus est d'autant plus important qu'un virus portant l'une de ces mutations devient atténué *in vivo* (Svitek et al, article en préparation). Dans notre étude, l'abolition de la structure en doigt de zinc permet

l'induction des ISG à un niveau similaire à celui observé dans des cellules normales. Il semble en effet que le rôle de domaine C-terminal de la protéine V dans la régulation de ces ISG soit important pour la virulence provoquée par celle-ci.

Récemment, des résidus, autre que les résidus cytéine, responsables de l'interaction avec les molécules MDA5 et STAT2 ont été identifiées au sein de cette structure. Trois résidus, W246, D248 et W250 sont importants pour l'interaction directe de V avec STAT2 (Ramachandran et al. 2008; Caignard et al. 2009). Une protéine mutée sur l'un de ces résidu va perdre sa capacité à inhiber la voie des IFN de type I mais conservera sa capacité à bloquer la voie MDA5. Une étude transcriptomique en présence de ce mutant montrera probablement un profil similaire à celui observé avec la protéine VC255S étant donné que les deux protéines V mutantes partagent leur incapacité à bloquer la réponse aux IFN de type I. Enfin, la mutation sur le résidu 235 va empêcher l'interaction de V avec MDA5 et de ce fait, la production d'IFN $\beta$  (Ramachandran et Horvath 2010). Elle reste cependant capable de bloquer la voie des IFN de type I. Il est probable que si l'on étudie la réponse aux ISG de cellules exprimant cette protéine V, le profil transcriptomique sera partagé. D'une part, les gènes régulés uniquement par la voie MDA5 ne pourront pas être induits à l'inverse des ISG induit spécifiquement par STAT2. Mais du fait de la redondance de la réponse aux IFN et des boucles d'amplification provoquées par ces deux voies, l'intensité de la réponse pourrait être plus faible.

Au vu des résultats de cette étude et des connaissances actuelles sur la protéine V des morbillivirus, une introduction des mutations abolissant l'interaction avec STAT2 au sein de virus recombinants mènera à son atténuation étant donné qu'il sera capable de répondre aux IFN et d'activer les ISG nécessaires au contrôle de l'infection. Par contre, un virus dont la protéine V ne bloque plus MDA5 sera probablement moins atténué que son homologue précédent. En effet, il sera toujours capable de bloquer les voies de réponses aux IFN et donc sera encore virulent voire mortel.

#### 4.4 Conclusion

Nous avons vu que les protéines VWT et VY110H, qui sont associées à la mortalité *in vivo*, réduisent considérablement l'induction des ISG contrairement à la protéine VC255S et va de ce fait bloquer les réponses immunitaires. Les résultats obtenus en présence du mutant VC255S suggèrent que la forte inhibition de l'induction des ISG, bien que partielle, soit responsable de la virulence de la protéine V et que la structure en doigt de zinc est importante pour celle-ci. En plus du blocage de la voie des IFN, cette inhibition va se traduire par une interférence avec des voies de l'apoptose et des CMH de classe I. En bloquant ces voies, le virus retardera la destruction des cellules infectées par les lymphocytes T CD8 et les cellules NK lui permettant de se répliquer sans interférence. Pour conclure, notre étude aura soulevé l'importance de la structure en doigt de zinc de la protéine V dans l'induction des ISG et le rôle de la protéine V dans le retardement de la réponse immunitaire adaptative.

Une étude plus approfondie sur la présentation antigénique et sur l'induction de la réponse immunitaire adaptative lors d'une infection est cependant nécessaire afin de mieux caractériser son importance sur la pathogenèse. Nous pouvons aussi pousser l'étude transcriptomique et regarder la réponse cellulaire chez des PBMC de furets infectés par différents virus mutants. Nous pourrions étudier l'importance du type cellulaire dans le contrôle de l'infection mais aussi caractériser le rôle de la régulation des cytokines durant l'infection. Pour conclure, notre étude aura soulevé l'importance de la structure en doigt de zinc de la protéine V dans l'induction des ISG et suggère un rôle de la protéine V dans le retard de la réponse immunitaire adaptative.

## BIBLIOGRAPHIE

- Accola, M. A., B. Huang, et al. (2002). "The antiviral dynamin family member, MxA, tubulates lipids and localizes to the smooth endoplasmic reticulum." J Biol Chem **277**(24): 21829-35.
- Akira, S., S. Uematsu, et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.
- Andrejeva, J., D. F. Young, et al. (2002). "Degradation of STAT1 and STAT2 by the V proteins of simian virus 5 and human parainfluenza virus type 2, respectively: consequences for virus replication in the presence of alpha/beta and gammainterferons." J Virol **76**:2159-67.
- Andrejeva, J., K. S. Childs, et al. (2004). "The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(49): 17264-9.
- Appel, M. J. (1969). "Pathogenesis of canine distemper." Am J Vet Res **30**(7): 1167-82.
- Arimoto, K., H. Takahashi, et al. (2007). "Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(18): 7500-5.
- Atabani, S. F., A. A. Byrnes, et al. (2001). "Natural measles causes prolonged suppression of interleukin-12 production." J Infect Dis **184**(1): 1-9.
- Avota, E., A. Avots, et al. (2001). "Disruption of Akt kinase activation is important for immunosuppression induced by measles virus." Nat Med **7**(6): 725-31.
- Bamming, D. and C. M. Horvath (2009). "Regulation of signal transduction by enzymatically inactive antiviral RNA helicase proteins MDA5, RIG-I, and LGP2." J Biol Chem **284**(15): 9700-12.
- Bankamp, B., J. M. Fontana, et al. (2008). "Adaptation to cell culture induces functional differences in measles virus proteins." Virology **5**: 129.
- Baron, M. D. and T. Barrett (2000). "Rinderpest viruses lacking the C and V proteins show specific defects in growth and transcription of viral RNAs." J Virol **74**(6): 2603-11.
- Barrett, T. (1999). "Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores." Vet Microbiol **69**(1-2): 3-13.
- Beineke, A., C. Puff, et al. (2009). "Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper." Vet Immunol Immunopathol **127**(1-2): 1-18.
- Biron, C. A. (1994). "Cytokines in the generation of immune responses to, and resolution of, virus infection." Curr Opin Immunol **6**(4): 530-8.
- Biron, C. A. and L. Brossay (2001). "NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections." Curr Opin Immunol **13**(4): 458-64.
- Blumberg, B. M., M. Leppert, et al. (1981). "Interaction of VSV leader RNA and nucleocapsid protein may control VSV genome replication." Cell **23**(3): 837-45.

- Boehme, K. W. and T. Compton (2004). "Innate sensing of viruses by toll-like receptors." J Virol **78**(15): 7867-73.
- Cadd, T., D. Garcin, et al. (1996). "The Sendai paramyxovirus accessory C proteins inhibit viral genome amplification in a promoter-specific fashion." J Virol **70**(8): 5067-74.
- Caignard, G., M. Guerbois, et al. (2007). "Measles virus V protein blocks Jak1-mediated phosphorylation of STAT1 to escape IFN-alpha/beta signaling." Virology **368**(2): 351-62.
- Caignard, G., M. Bourai, et al. (2009). "Inhibition of IFN-alpha/beta signaling by two discrete peptides within measles virus V protein that specifically bind STAT1 and STAT2." Virology **383**(1): 112-20.
- Cathomen, T., B. Mrkic, et al. (1998). "A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain." EMBO J **17**(14): 3899-908.
- Cattaneo, R., G. Rebmann, et al. (1987). "Altered transcription of a defective measles virus genome derived from a diseased human brain." EMBO J **6**(3): 681-8.
- Cattaneo, R., K. Kaelin, et al. (1989). "Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein." Cell **56**(5): 759-64.
- Childs, K., N. Stock, et al. (2007). "mda-5, but not RIG-I, is a common target for paramyxovirus V proteins." Virology **359**(1): 190-200.
- Childs, K. S., J. Andrejeva, et al. (2009). "Mechanism of mda-5 Inhibition by paramyxovirus V proteins." J Virol **83**(3): 1465-73.
- de Veer, M. J., M. Holko, et al. (2001). "Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays." J Leukoc Biol **69**(6): 912-20.
- Delpeut, S., R. N. Rouxel., et al. (2012). "L'étude de la maladie de Carré chez ses hôtes naturels : un modèle de pathogenèse morbillivirale." Virologie Volume **16**(Numéro 3).
- Dennis, G., Jr., B. T. Sherman, et al. (2003). "DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery." Genome Biol **4**(5): P3.
- Devaux, P., V. von Messling, et al. (2007). "Tyrosine 110 in the measles virus phosphoprotein is required to block STAT1 phosphorylation." Virology **360**(1): 72-83.
- Devaux, P., G. Hodge, et al. (2008). "Attenuation of V- or C-defective measles viruses: infection control by the inflammatory and interferon responses of rhesus monkeys." J Virol **82**(11): 5359-67.
- Der, SD., A. Zhou, et al. (1998). "Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays." Proc Natl Acad Sci U S A. **92**(26):15623-8.



- D'Andrea, LD. et L. Regan. (2003). "TPR proteins: the versatile helix." Trends Biochem Sci **28**(12): 655-62.
- Eisenacher, K., C. Steinberg, et al. (2007). "The role of viral nucleic acid recognition in dendritic cells for innate and adaptive antiviral immunity." Immunobiology **212**(9-10): 701-14.
- Elco, CP., JM Guenther, et al. (2005). "Analysis of genes induced by Sendai virus infection of mutant cell lines reveals essential roles of interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and interferon but not toll-like receptor 3." J Virol **79**(7):3920-9.
- Elliott, J., O. T. Lynch, et al. (2007). "Respiratory syncytial virus NS1 protein degrades STAT2 by using the Elongin-Cullin E3 ligase." J Virol **81**(7): 3428-36.
- Engel, P., M. J. Eck, et al. (2003). "The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease." Nat Rev Immunol **3**(10): 813-21.
- Fontana, J. M., B. Bankamp, et al. (2008). "Regulation of interferon signaling by the C and V proteins from attenuated and wild-type strains of measles virus." Virology **374**(1): 71-81.
- Gack, M. U., Y. C. Shin, et al. (2007). "TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity." Nature **446**(7138): 916-920.
- Gack, M. U., A. Kirchhofer, et al. (2008). "Roles of RIG-I N-terminal tandem CARD and splice variant in TRIM25-mediated antiviral signal transduction." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(43): 16743-8.
- Gee, P., P. K. Chua, et al. (2008). "Essential role of the N-terminal domain in the regulation of RIG-I ATPase activity." J Biol Chem **283**(14): 9488-96.
- Gerlier, D. and D. S. Lyles (2011). "Interplay between innate immunity and negative-strand RNA viruses: towards a rational model." Microbiol Mol Biol Rev **75**(3): 468-90, second page of table of contents.
- Giacomini, P., P. B. Fisher, et al. (1988). "Regulation of class II MHC gene expression by interferons: insights into the mechanism of action of interferon (review)." Anticancer Res **8**(6): 1153-61.
- Gitlin, L., W. Barchet, et al. (2006). "Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(22): 8459-64.
- Griffin, D. E., Ed. (2007). Measles virus. Fields' virology 5th Ed. Philadelphia, London, Lippincott Williams & Wilkins.
- Gubbay, O., J. Curran, et al. (2001). "Sendai virus genome synthesis and assembly are coupled: a possible mechanism to promote viral RNA polymerase processivity." J Gen Virol **82**(Pt 12): 2895-903.
- Gunderson, K. L., S. Kruglyak, et al. (2004). "Decoding randomly ordered DNA arrays." Genome Res **14**(5): 870-7.
- Haas, L., M. D. Baron, et al. (1995). "Editing of morbillivirus P gene transcripts in infected animals." Vet Microbiol **44**(2-4): 299-306.

- Haller, O. and G. Kochs (2002). "Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity." Traffic **3**(10): 710-7.
- Hamaguchi, M., T. Yoshida, et al. (1983). "Transcriptive complex of Newcastle disease virus. I. Both L and P proteins are required to constitute an active complex." Virology **128**(1): 105-17.
- Heaney, J., S. L. Cosby, et al. (2005). "Inhibition of host peripheral blood mononuclear cell proliferation ex vivo by Rinderpest virus." J Gen Virol **86**(Pt 12): 3349-55.
- Homann, H. E., P. H. Hofschneider, et al. (1990). "Sendai virus gene expression in lytically and persistently infected cells." Virology **177**(1): 131-40.
- Horikami, S. M., J. Curran, et al. (1992). "Complexes of Sendai virus NP-P and P-L proteins are required for defective interfering particle genome replication in vitro." J Virol **66**(8): 4901-8.
- Horst, D., M. C. Verweij, et al. (2011). "Viral evasion of T cell immunity: ancient mechanisms offering new applications." Curr Opin Immunol **23**(1): 96-103.
- Horvath, C. M. (2004). "Weapons of STAT destruction. Interferon evasion by paramyxovirus V protein." Eur J Biochem **271**(23-24): 4621-8.
- Hui, DJ., CR. Bhasher, et al. (2003). "Viral stress-inducible protein p56 inhibits translation by blocking the interaction of eIF3 with the ternary complex eIF2.GTP.Met-tRNAi." J Biol Chem **278**(41): 39477-82
- Irie, T., K. Kiyotani, et al. (2012). "Inhibition of interferon regulatory factor 3 activation by paramyxovirus V protein." J Virol **86**(13): 7136-45.
- Iwatsuki, K., M. Okita, et al. (1995). "Immunohistochemical analysis of the lymphoid organs of dogs naturally infected with canine distemper virus." J Comp Pathol **113**(2): 185-90.
- Janeway, C. A., Jr., C. C. Goodnow, et al. (1996). "Danger - pathogen on the premises! Immunological tolerance." Curr Biol **6**(5): 519-22.
- Janssen, R., J. Pennings, et al. (2007). "Host transcription profiles upon primary respiratory syncytial virus infection." J Virol **81**(11):5958-67.
- Jones, E. Y., J. Tormo, et al. (1998). "Recognition surfaces of MHC class I." Immunol Rev **163**: 121-8.
- Kato, H., S. Sato, et al. (2005). "Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response." Immunity **23**(1): 19-28.
- Kato, H., O. Takeuchi, et al. (2006). "Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses." Nature **441**(7089): 101-5.
- Kato, H., O. Takeuchi, et al. (2008). "Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5." J Exp Med **205**(7): 1601-10.

- Kawai, T., S. Sato, et al. (2004). "Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6." Nat Immunol **5**(10): 1061-8.
- Kawai, T., K. Takahashi, et al. (2005). "IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction." Nat Immunol **6**(10): 981-8.
- Kawai, T. and S. Akira (2007). "Antiviral signaling through pattern recognition receptors." J Biochem **141**(2): 137-45.
- Kerdiles, Y. M., C. I. Sellin, et al. (2006). "Immunosuppression caused by measles virus: role of viral proteins." Rev Med Virol **16**:49-63.
- Klein Klouwenberg, P., L. Tan, et al. (2009). "The role of Toll-like receptors in regulating the immune response against respiratory syncytial virus." Crit Rev Immunol **29**(6): 531-50.
- King, A. M. Q., Lefkowitz, E., Adams, M.J. & Carstens, E.B., Ed. (2012). Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, California, Elsevier.
- Kingston, R. L., W. A. Baase, et al. (2004). "Characterization of nucleocapsid binding by the measles virus and mumps virus phosphoproteins." J Virol **78**(16): 8630-40.
- Laine, D., M. C. Trescol-Biemont, et al. (2003). "Measles virus (MV) nucleoprotein binds to a novel cell surface receptor distinct from FcγRII via its C-terminal domain: role in MV-induced immunosuppression." J Virol **77**(21): 11332-46.
- Lamb, R. A. P., G.D., Ed. (2007). Paramyxoviridae: the viruses and their replication. Fields' virology 5th Ed. Philadelphia, London, Lippincott Williams & Wilkins.
- Leonard, V. H., G. Hodge, et al. (2010). "Measles virus selectively blind to signaling lymphocytic activation molecule (SLAM; CD150) is attenuated and induces strong adaptive immune responses in rhesus monkeys." J Virol **84**(7): 3413-20.
- Li, K., E. Foy, et al. (2005). "Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(8): 2992-7.
- Li, X., C. Lu, et al. (2009). "Structural basis of double-stranded RNA recognition by the RIG-I like receptor MDA5." Arch Biochem Biophys **488**(1): 23-33.
- Liston, P. and D. J. Briedis (1994). "Measles virus V protein binds zinc." Virology **198**(1): 399-404.
- Liston, P., R. Batal, et al. (1997). "Protein interaction domains of the measles virus nucleocapsid protein (NP)." Arch Virol **142**(2): 305-21.
- Lu, C., H. Xu, et al. (2010). "The structural basis of 5' triphosphate double-stranded RNA recognition by RIG-I C-terminal domain." Structure **18**(8): 1032-43.
- MacMicking, J. D. (2004). "IFN-inducible GTPases and immunity to intracellular pathogens." Trends Immunol **25**(11): 601-9.

- Malathi, K., B. Dong, et al. (2007). "Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity." Nature **448**(7155): 816-9.
- Malur, A. G., M. A. Hoffman, et al. (2004). "The human parainfluenza virus type 3 (HPIV 3) C protein inhibits viral transcription." Virus Res **99**(2): 199-204.
- Marques, J. T., T. Devosse, et al. (2006). "A structural basis for discriminating between self and nonself double-stranded RNAs in mammalian cells." Nat Biotechnol **24**(5): 559-65.
- Meurs, E., K. Chong, et al. (1990). "Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon." Cell **62**(2): 379-90.
- Meylan, E., J. Curran, et al. (2005). "Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus." Nature **437**(7062): 1167-72.
- Michallet, M. C., E. Meylan, et al. (2008). "TRADD protein is an essential component of the RIG-like helicase antiviral pathway." Immunity **28**(5): 651-61.
- Moss, W. J. and D. E. Griffin (2006). "Global measles elimination." Nat Rev Microbiol **4**(12): 900-8.
- Moss, W. J., J. J. Ryon, et al. (2002). "Differential regulation of interleukin (IL)-4, IL-5, and IL-10 during measles in Zambian children." J Infect Dis **186**(7): 879-87.
- Myong, S., S. Cui, et al. (2009). "Cytosolic viral sensor RIG-I is a 5'-triphosphate-dependent translocase on double-stranded RNA." Science **323**(5917): 1070-4.
- Nakatsu, Y., M. Takeda, et al. (2006). "Translational inhibition and increased interferon induction in cells infected with C protein-deficient measles virus." J Virol **80**(23): 11861-7.
- Nakatsu, Y., M. Takeda, et al. (2008). "Measles virus circumvents the host interferon response by different actions of the C and V proteins." J Virol **82**(17): 8296-306.
- Navaratnarajah, C. K., V. H. Leonard, et al. (2009). "Measles virus glycoprotein complex assembly, receptor attachment, and cell entry." Curr Top Microbiol Immunol **329**: 59-76.
- Neefjes, J., M. L. Jongsma, et al. (2011). "Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation." Nat Rev Immunol **11**(12): 823-36.
- Neumeister, C., R. Nanan, et al. (2001). "Measles virus and canine distemper virus target proteins into a TAP-independent MHC class I-restricted antigen-processing pathway." J Gen Virol **82**(Pt 2): 441-7.
- Normile, D. (2008). "Rinderpest. Driven to extinction." Science **319**(5870): 1606-9.
- Novick, D., B. Cohen, et al. (1994). "The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning." Cell **77**(3): 391-400.
- O'Neill, L. A. and A. G. Bowie (2007). "The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **7**(5): 353-64.

- Ohno, S., N. Ono, et al. (2004). "Dissection of measles virus V protein in relation to its ability to block alpha/beta interferon signal transduction." J Gen Virol **85**(Pt 10): 2991-9.
- Orvell, C., H. Sheshberadaran, et al. (1985). "Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed against four structural components of canine distemper virus." J Gen Virol **66** ( Pt 3): 443-56.
- Parisien, J. P., D. Bamming, et al. (2009). "A shared interface mediates paramyxovirus interference with antiviral RNA helicases MDA5 and LGP2." J Virol **83**(14): 7252-60.
- Paterson, R. G., G. P. Leser, et al. (1995). "The paramyxovirus SV5 V protein binds two atoms of zinc and is a structural component of virions." Virology **208**(1): 121-31.
- Pfaller, C. K. and K. K. Conzelmann (2008). "Measles virus V protein is a decoy substrate for I $\kappa$ B kinase alpha and prevents Toll-like receptor 7/9-mediated interferon induction." J Virol **82**(24): 12365-73.
- Pfaller, C. K., Z. Li, et al. (2011). "Protein kinase PKR and RNA adenosine deaminase ADAR1: new roles for old players as modulators of the interferon response." Curr Opin Immunol **23**(5): 573-82.
- Pillet, S. and V. von Messling (2009). "Canine distemper virus selectively inhibits apoptosis progression in infected immune cells." J Virol **83**(12): 6279-87.
- Platanias, L. C. (2005). "Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling." Nat Rev Immunol **5**(5): 375-86.
- Ramachandran, A., J. P. Parisien, et al. (2008). "STAT2 is a primary target for measles virus V protein-mediated alpha/beta interferon signaling inhibition." J Virol **82**(17): 8330-8.
- Ramachandran, A. and C. M. Horvath (2010). "Dissociation of paramyxovirus interferon evasion activities: universal and virus-specific requirements for conserved V protein amino acids in MDA5 interference." J Virol **84**(21): 11152-63.
- Randall, R. E. and S. Goodbourn (2008). "Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures." J Gen Virol **89**(Pt 1): 1-47.
- Reits, E., A. Griekspoor, et al. (2003). "Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I." Immunity **18**(1): 97-108.
- Reutter, G. L., C. Cortese-Grogan, et al. (2001). "Mutations in the measles virus C protein that up regulate viral RNA synthesis." Virology **285**(1): 100-9.
- Riedl, P., M. Moll, et al. (2002). "Measles virus matrix protein is not cotransported with the viral glycoproteins but requires virus infection for efficient surface targeting." Virus Res **83**(1-2): 1-12.
- Rima, B. K. and W. P. Duprex (2009). "The measles virus replication cycle." Curr Top Microbiol Immunol **329**: 77-102.

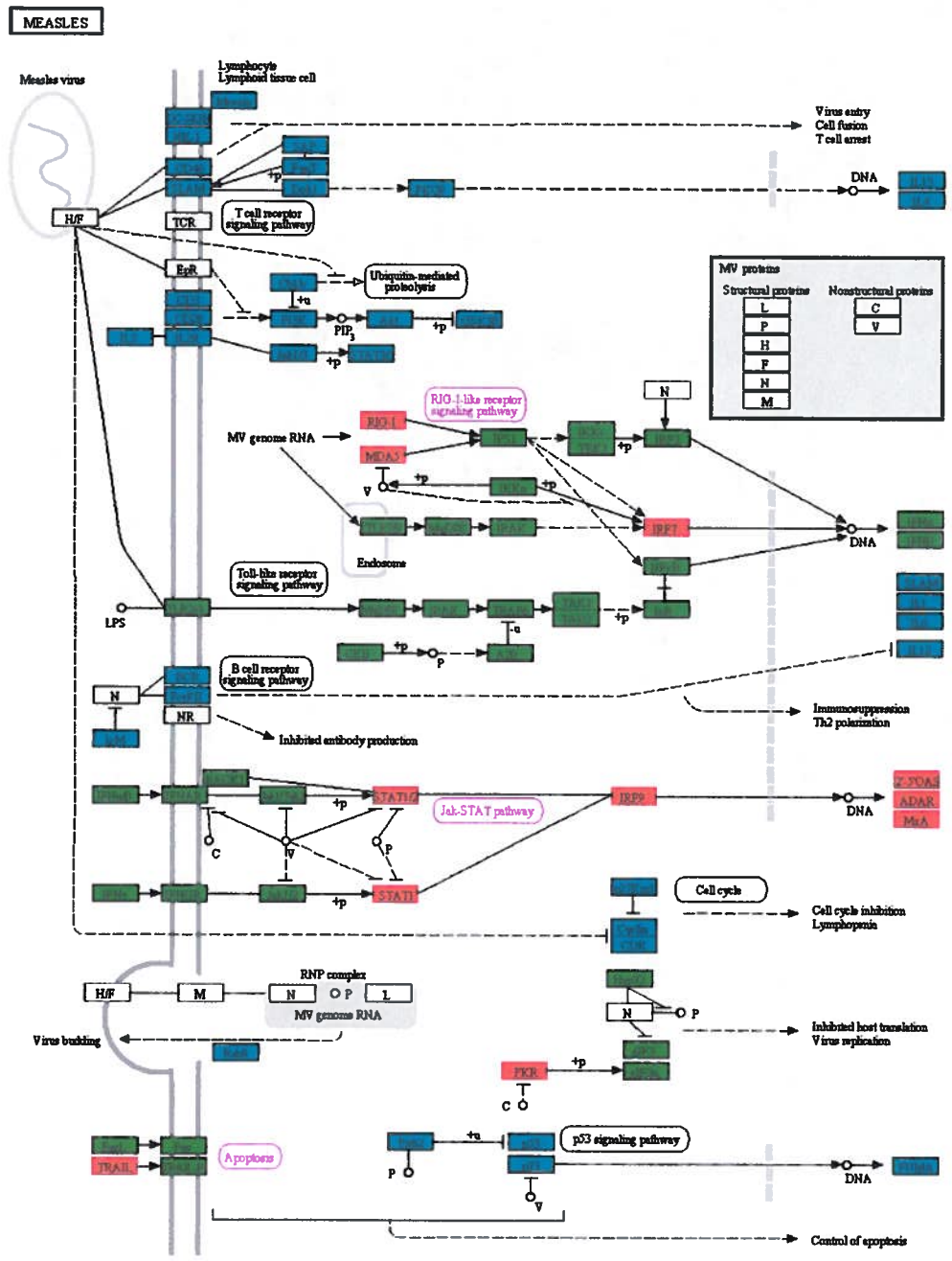
- Rothlisberger, A., D. Wiener, et al. (2010). "Two domains of the V protein of virulent canine distemper virus selectively inhibit STAT1 and STAT2 nuclear import." J Virol **84**(13): 6328-43.
- Sadler, A. J. and B. R. Williams (2008). "Interferon-inducible antiviral effectors." Nat Rev Immunol **8**(7): 559-68.
- Saha, S. K., E. M. Pietras, et al. (2006). "Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif." EMBO J **25**(14): 3257-63.
- Saito, T. and M. Gale, Jr. (2008). "Differential recognition of double-stranded RNA by RIG-I-like receptors in antiviral immunity." J Exp Med **205**(7): 1523-7.
- Saito, T., R. Hirai, et al. (2007). "Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(2): 582-7.
- Sakaguchi, M., Y. Yoshikawa, et al. (1986). "Characteristics of fresh isolates of wild measles virus." Jpn J Exp Med **56**(2): 61-7.
- Sato, K., T. Ishikawa, et al. (2007). "Expression of Toll-like receptors in chronic hepatitis C virus infection." J Gastroenterol Hepatol **22**(10): 1627-32.
- Schlee, M., A. Roth, et al. (2009). "Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus." Immunity **31**(1): 25-34.
- Schlender, J., V. Hornung, et al. (2005). "Inhibition of toll-like receptor 7- and 9-mediated alpha/beta interferon production in human plasmacytoid dendritic cells by respiratory syncytial virus and measles virus." J Virol **79**(9): 5507-15.
- Schmidt, A., T. Schwerd, et al. (2009). "5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(29): 12067-72.
- Schneider-Schaulies, S., K. Bieback, et al. (2002). "Regulation of gene expression in lymphocytes and antigen-presenting cells by measles virus: consequences for immunomodulation." J Mol Med (Berl) **80**(2): 73-85.
- Schnorr, J. J., M. Seufert, et al. (1997). "Cell cycle arrest rather than apoptosis is associated with measles virus contact-mediated immunosuppression in vitro." J Gen Virol **78** ( Pt 12): 3217-26.
- Schuhmann, K. M., C. K. Pfaller, et al. (2011). "The measles virus V protein binds to p65 (RelA) to suppress NF-kappaB activity." J Virol **85**(7): 3162-71.
- Seth, R. B., L. Sun, et al. (2005). "Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3." Cell **122**(5): 669-82.
- Shehata, M. A., A. Abou El-Enein, et al. (2006). "Significance of toll-like receptors 2 and 4 mRNA expression in chronic hepatitis C virus infection." Egypt J Immunol **13**(1): 141-52.

- Sijts, E. J. and P. M. Kloetzel (2011). "The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses." Cell Mol Life Sci **68**(9): 1491-502.
- Silverman, R. H. (1994). "Fascination with 2-5A-dependent RNase: a unique enzyme that functions in interferon action." J Interferon Res **14**(3): 101-4.
- Stack, J., I. R. Haga, et al. (2005). "Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence." J Exp Med **201**(6): 1007-18.
- Summers, B. A. and M. J. Appel (1994). "Aspects of canine distemper virus and measles virus encephalomyelitis." Neuropathol Appl Neurobiol **20**(6): 525-34.
- Svitek, N. and V. von Messling (2007). "Early cytokine mRNA expression profiles predict Morbillivirus disease outcome in ferrets." Virology **362**(2): 404-10.
- Taga, K., H. Mostowski, et al. (1993). "Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth." Blood **81**(11): 2964-71.
- Tahara, M., M. Takeda, et al. (2007). "Altered interaction of the matrix protein with the cytoplasmic tail of hemagglutinin modulates measles virus growth by affecting virus assembly and cell-cell fusion." J Virol **81**(13): 6827-36.
- Takeda, M. (2008). "Measles virus breaks through epithelial cell barriers to achieve transmission." J Clin Invest **118**(7): 2386-9.
- Takeda, K. and S. Akira (2005). "Toll-like receptors in innate immunity." Int Immunol **17**(1): 1-14.
- Thomas, S. M., R. A. Lamb, et al. (1988). "Two mRNAs that differ by two nontemplated nucleotides encode the amino coterminal proteins P and V of the paramyxovirus SV5." Cell **54**(6): 891-902.
- Thompson, A. J. and S. A. Locarnini (2007). "Toll-like receptors, RIG-I-like RNA helicases and the antiviral innate immune response." Immunol Cell Biol **85**(6): 435-45.
- Toritsu, H., K. Kusuvara, et al. (2004). "Functional MxA promoter polymorphism associated with subacute sclerosing panencephalitis." Neurology **62**(3): 457-60.
- Toth, A. M., Z. Li, et al. (2009). "RNA-specific adenosine deaminase ADAR1 suppresses measles virus-induced apoptosis and activation of protein kinase PKR." J Biol Chem **284**(43): 29350-6.
- Vercammen, E., J. Staal, et al. (2008). "Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3." Clin Microbiol Rev **21**(1): 13-25.
- Vidal, S. and D. Kolakofsky (1989). "Modified model for the switch from Sendai virus transcription to replication." J Virol **63**(5): 1951-8.
- Vignali, D. A. (1994). "The interaction between CD4 and MHC class II molecules and its effect on T cell function." Behring Inst Mitt(94): 133-47.
- von Messling, V., C. Springfield, et al. (2003). "A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression." J Virol **77**(23): 12579-91.

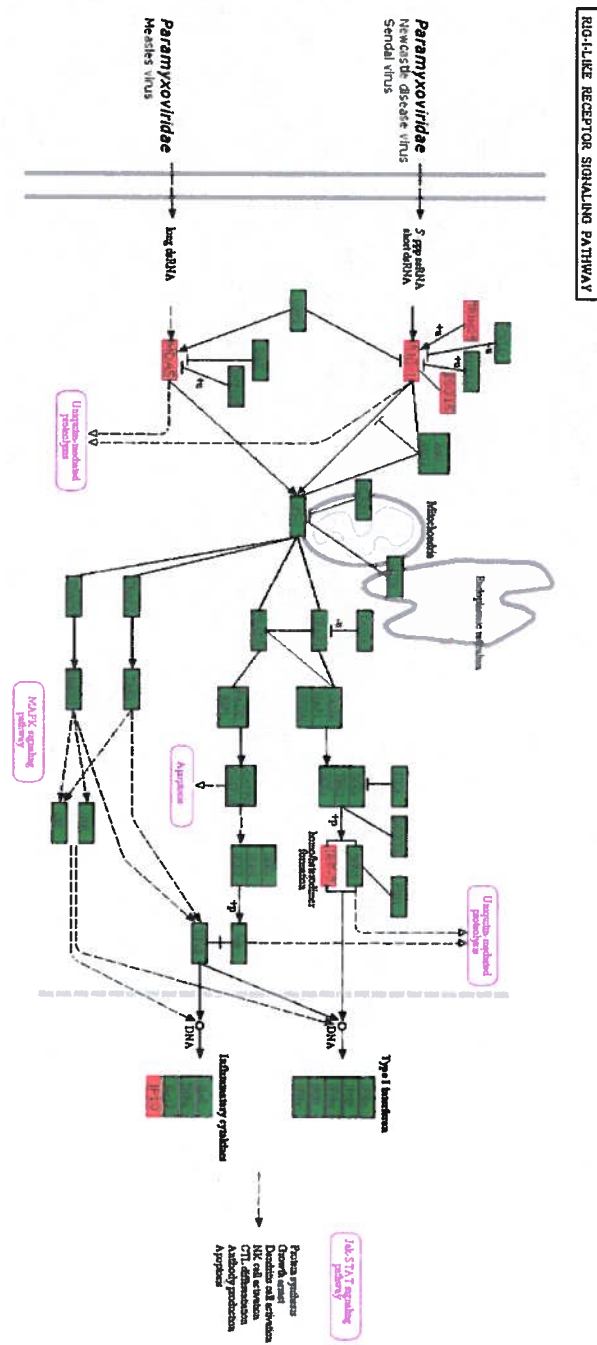
- von Messling, V., D. Milosevic, et al. (2004). "Tropism illuminated: lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host immune system." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(39): 14216-21.
- von Messling, V., N. Svitek, et al. (2006). "Receptor (SLAM [CD150]) recognition and the V protein sustain swift lymphocyte-based invasion of mucosal tissue and lymphatic organs by a morbillivirus." J Virol **80**(12): 6084-92.
- W.H.O (2012). Measles Fact sheet. **286**.
- Weidmann, A., A. Maisner, et al. (2000). "Proteolytic cleavage of the fusion protein but not membrane fusion is required for measles virus-induced immunosuppression in vitro." J Virol **74**(4): 1985-93.
- Williams, B. R. (1999). "PKR; a sentinel kinase for cellular stress." Oncogene **18**(45): 6112-20.
- Xu, L. G., Y. Y. Wang, et al. (2005). "VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling." Mol Cell **19**(6): 727-40.
- Yilla, M., C. Hickman, et al. (2003). "Edmonston measles virus prevents increased cell surface expression of peptide-loaded major histocompatibility complex class II proteins in human peripheral monocytes." J Virol **77**(17): 9412-21.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, et al. (2004). "The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses." Nat Immunol **5**(7): 730-7.
- Yoneyama, M. and T. Fujita (2009). "RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors." Immunol Rev **227**(1): 54-65.
- Zeng, W., L. Sun, et al. (2010). "Reconstitution of the RIG-I pathway reveals a signaling role of unanchored polyubiquitin chains in innate immunity." Cell **141**(2): 315-30.
- Zhu, Y. D., J. Heath, et al. (1997). "Experimental measles. II. Infection and immunity in the rhesus macaque." Virology **233**(1): 85-92.
- Zust, R., L. Cervantes-Barragan, et al. (2011). "Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5." Nat Immunol **12**(2): 137-43.



# ANNEXE I : VOIES DE SIGNALISATION COMPLEMENTAIRES



**Figure 22. Voie de signalisation de MeV.** Schéma basé sur le diagramme HSA05162 de la base de données KEGG. En rouge sont représentés les gènes dont l'induction est bloquée par la protéine V identifiés dans les profils transcriptionnels. En vert sont indiqués les gènes des voies de signalisation (violet) impliquant des gènes régulés par la protéine V. En bleu les gènes de voies de signalisation n'ayant aucune interaction avec la protéine V.



**Figure 23. Voie de signalisation des RLR.** Schéma basé sur le diagramme HSA04622 de la base de données KEGG. En rouge sont représentés les gènes dont l'induction est bloquée par la protéine V identifiés dans les profils transcriptionnels. En vert sont indiqués les gènes des voies de signalisation (violet) impliquant les gènes bloqués par la protéine V.

## ANNEXE II : TABLEAU D'EXPRESSION DES GENES

Gènes induits :

Cluster #1

Nom officiel	Description	Niveau d'induction			
		HelapCG	HeLaWT	HeLaVY110H	HeLaVC255S
CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	14,14	3,69	1,72	3,61
CYP2J2	cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2	2,77	1,23	1,06	1,23
GBP4	guanylate binding protein 4	2,19	1,20	1,03	1,31
TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	2,83	1,29	1,02	1,90

Cluster #2

Nom officiel	Description	Niveau d'induction			
		HelapCG	HeLaWT	HeLaVY110H	HeLaVC255S
C19ORF66	chromosome 19 open reading frame 66	4,18	1,77	1,68	5,16
GBP1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	4,27	2,32	2,15	4,93
HLA-B	major histocompatibility complex, class I, C; major histocompatibility complex, class I, B	3,25	1,66	1,53	3,95
IFIH1	interferon induced with helicase C domain 1	6,25	2,81	2,14	7,47

Cluster #2 (suite)

Nom officiel	Description	Niveau d'induction			
		HelapCG	HeLaWt	HeLaVy110H	HeLaVc255S
IRF1	interferon regulatory factor 1	2,09	1,59	1,52	2,31
LAMP3	lysosomal-associated membrane protein 3	3,03	1,65	1,30	3,33
PARP10	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 10	4,31	1,57	1,70	4,81
PARP14	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14	6,14	2,42	2,35	7,41
PSMB8	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 8 (large multifunctional peptidase 7)	3,67	1,64	1,76	4,20
SP110	SP110 nuclear body protein	3,85	1,83	1,81	4,55
TDRD7	tudor domain containing 7	3,72	1,87	1,60	4,16
UBE2L6	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	15,47	5,14	3,72	17,78

Cluster #3

Nom officiel	Description	Niveau d'induction			
		HeLa <sub>pcc</sub>	HeLa <sub>Wt</sub>	HeLa <sub>V110H</sub>	HeLa <sub>Vc255S</sub>
HERC6	hect domain and RLD 6	6,48	1,94	2,35	6,19
HLA-H	major histocompatibility complex, class I, H (pseudogene)	2,29	1,26	1,27	2,23
IFITM2	interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D)	3,78	1,87	1,99	3,79
IRF7	interferon regulatory factor 7	7,33	2,11	2,58	6,65
LOC400759	interferon-induced guanylate-binding protein 1 pseudogene	2,12	1,24	1,23	2,05
OAS3	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	10,48	2,48	3,29	10,56
PHF11	PHD finger protein 11	3,65	1,81	1,95	3,58
PLSCR1	phospholipid scramblase 1	6,54	2,30	2,45	6,52
PSME1	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 1 (PA28 alpha)	2,45	1,42	1,50	2,53
SAMD9	sterile alpha motif domain containing 9	5,19	2,26	2,52	5,33
SLC25A28	solute carrier family 25, member 28	2,26	1,30	1,39	2,16

Cluster #4

Nom officiel	Description	Niveau d'induction			
		HelapCG	HeLaVWT	HeLaVY110 <sub>H</sub>	HeLaVC255S
C1R	complement component 1, r subcomponent	2,23	1,22	1,26	2,01
CFH	complement factor H	2,14	1,27	1,20	1,85
DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	5,84	2,38	1,95	4,79
DDX60	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60	3,89	1,53	1,69	3,13
DDX60L	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60-like	2,95	1,36	1,31	2,45
ECCGF1	thymidine phosphorylase	4,49	1,58	1,80	3,74
EIF2AK2	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	3,61	1,79	2,15	3,27
HES4	hairy and enhancer of split 4 (Drosophila)	3,54	1,28	1,58	3,07
HLA-E	major histocompatibility complex, class I, E	3,77	1,37	1,62	3,09
HLA-F	major histocompatibility complex, class I, F	2,37	1,21	1,21	1,99
HS.1250 87	Unknown	4,88	1,68	1,88	4,33
HS.4892 54	Unknown	3,75	1,92	2,01	3,45

Cluster #4 (suite)

Nom officiel	Description	Niveau d'induction			
		HeLa <sub>pcG</sub>	HeLa <sub>WT</sub>	HeLa <sub>VY110</sub> <sub>H</sub>	HeLa <sub>VC255S</sub>
IDO1	indoleamine 2,3-dioxygenase 1	2,14	1,31	1,06	1,80
IFI35	interferon-induced protein 35	12,02	2,75	3,03	10,76
IFI44	interferon-induced protein 44	8,20	2,79	3,31	7,27
IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	17,95	4,96	5,81	14,44
IFIT2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	13,56	3,69	2,90	11,69
IFIT3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	16,86	3,60	3,16	14,94
IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)	4,03	1,84	2,27	3,27
ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier	9,87	2,86	4,72	7,71
ISG20	interferon stimulated exonuclease gene 20kDa	8,25	2,29	2,03	7,06
LAP3	leucine aminopeptidase 3	3,19	1,63	1,42	2,90
LOC100128274	putative p150	3,06	1,35	1,37	2,39
LOC643384	Unknown	3,10	1,35	1,28	2,68

Cluster #4 (suite)

Nom officiel	Description	Niveau d'induction			
		HelapCG	HeLaVWT	HeLaVY110H	HeLaVC255S
LY6E	lymphocyte antigen 6 complex, locus E	3,36	1,32	1,19	2,53
MX2	myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	13,07	2,90	1,83	10,22
NT5C3	5'-nucleotidase, cytosolic III	3,17	1,90	1,29	2,77
OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	9,42	2,32	1,66	8,52
OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	6,51	1,90	1,73	5,73
PARP9	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	7,75	2,75	2,91	6,95
PNPT1	polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1	2,25	1,28	1,17	1,96
PSMB9	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional peptidase 2)	5,23	1,72	1,48	4,13
TRIM22	tripartite motif-containing 22	4,66	1,43	1,16	3,36
TRIM25	tripartite motif-containing 25	2,18	1,25	1,45	1,97
TRIM5	tripartite motif-containing 5	3,10	1,42	1,36	2,88
TXNIP	thioredoxin interacting protein	2,01	1,14	1,26	1,73
UBA7	ubiquitin-like modifier activating enzyme 7	4,43	1,41	1,29	4,00



Cluster #4 (suite)

Nom officiel	Description	Niveau d'induction			
		HeLaPCG	HeLaVWT	HeLaVY110H	HeLaVC255S
WARS	tryptophanyl-tRNA synthetase	2,41	1,18	1,17	2,02
XAF1	XIAP associated factor 1	4,74	1,72	1,32	3,26
ZC3HAV1	zinc finger CCH-type, antiviral 1	2,80	1,49	1,39	2,55

Cluster #5

Nom officiel	Description	Niveau d'induction			
		HeLaPCG	HeLaVWT	HeLaVY110H	HeLaVC255S
ADAR	adenosine deaminase, RNA-specific	2,88	1,24	1,52	3,24
DTX3L	deltex 3-like (Drosophila)	1,93	1,19	1,40	2,16
IRF9	interferon regulatory factor 9	7,52	2,96	5,84	8,19
KIAA1618	ring finger protein 213	2,04	1,18	1,27	2,21
LGALS3BP	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	2,85	1,34	1,50	3,08
PARP12	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12	3,91	1,64	1,91	4,38
PRIC285	peroxisomal proliferator-activated receptor A interacting complex 285	14,95	2,98	5,07	17,30
STAT2	signal transducer and activator of transcription 2, 113kDa	5,34	2,08	2,65	6,35

Cluster #6

Nom officiel	Description	Niveau d'induction			
		HeLaPCG	HeLaWt	HeLaVY110H	HeLaVC255S
BST2	NPC-A-7; bone marrow stromal cell antigen 2	2,08	1,24	1,22	2,13
CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)	3,07	1,59	1,13	2,97
CD68	CD68 molecule	3,90	1,41	1,22	3,92
CFB	complement factor B	2,98	1,44	1,34	2,86
H1F0	H1 histone family, member 0	2,46	1,03	1,06	2,51
HCP5	HLA complex P5	3,08	1,43	1,33	3,01
HERC5	hect domain and RLD 5	8,83	2,71	2,79	9,06
IFI16	interferon, alpha-inducible protein 6	4,77	2,02	2,06	5,08
IFI44L	interferon-induced protein 44-like	12,61	4,91	5,14	13,43
IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	20,52	4,47	3,80	20,22
LBA1	tetratricopeptide repeat and ankyrin repeat containing 1	2,37	1,32	1,19	2,52
LOC389386	similar to LAP3 protein	2,47	1,25	1,20	2,46
NT5E	5'-nucleotidase, ecto (CD73)	2,05	1,26	1,22	1,97

Cluster #6 (suite)

Nom officiel	Description	Niveau d'induction			
		HelapCG	HeLaWt	HeLaVY110H	HeLaVC255S
OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	19,43	3,85	3,84	21,14
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor-like	2,09	1,35	1,14	2,09
PSME2	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 2 (PA28 beta)	2,15	1,48	1,42	2,24
SAMD9L	sterile alpha motif domain containing 9-like	3,84	1,93	1,65	4,04
SLC15A3	solute carrier family 15, member 3	7,81	2,08	1,70	7,30
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	8,93	3,25	3,13	8,80
TLR3	toll-like receptor 3	2,09	1,27	1,15	2,08
TMEM140	transmembrane protein 140	2,92	1,63	1,31	2,74
TMEM62	transmembrane protein 62	2,46	1,33	1,15	2,47
TRIM21	tripartite motif-containing 21	2,95	1,63	1,45	3,00
USP18	ubiquitin specific peptidase 18	8,16	2,64	2,17	8,58
USP41	ubiquitin specific peptidase 41	2,36	1,26	1,16	2,27

Cluster #6 (suite)

Nom officiel	Description	Niveau d'induction			
		HeLa <sub>apCG</sub>	HeLa <sub>Wt</sub>	HeLa <sub>VY110H</sub>	HeLa <sub>VC255S</sub>
ZNFx1	NFX1-type zinc finger-containing protein 1	2,52	1,29	1,35	2,6

Cluster #7

Nom officiel	Description	Niveau d'induction			
		HeLa <sub>apCG</sub>	HeLa <sub>Wt</sub>	HeLa <sub>VY110H</sub>	HeLa <sub>VC255S</sub>
HLA-C	major histocompatibility complex, class I, C; major histocompatibility complex, class I, B	1,69	1,19	1,26	2,09
IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27	59,19	23,96	25,35	96,27
IFI6	interferon, alpha-inducible protein 6	17,43	6,98	6,86	24,45
MX1	myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	91,86	40,93	48,54	129,68
TAP1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	5,01	2,40	2,44	7,37

**Tableau 2. Liste des gènes régulés différentiellement en présence d'IFN dans les lignées stables. Les gènes sont organisés en clusters comme indiqués dans la figure 14.**

## ANNEXE IV : LISTE DES ANNOTATIONS GO

Cluster #1:

Catégorie	GO ID	Nom	Nombre de gènes	P-value
Processus biologique	GO:0019373	Epoxygenase P450 pathway	1	2.540E-2
	GO:0071614	linoleic acid epoxygenase activity	1	7.962E-3
	GO:0008404	arachidonic acid 14,15-epoxygenase activity	1	7.962E-3
	GO:0008392	arachidonic acid epoxygenase activity	1	7.962E-3
	GO:0008405	arachidonic acid 11,12-epoxygenase activity	1	7.962E-3
Fonction moléculaire	GO:0003958	NADPH-hemoprotein reductase activity	1	2.388E-2
	GO:0008391	arachidonic acid monooxygenase activity	1	2.388E-2
	GO:0005125	cytokine activity	1	2.804E-2
	GO:0005126	cytokine receptor binding	2	2.831E-2

Cluster #2

Catégorie	GO ID	Nom	Nombre de gènes	P-value
Processus biologique	GO:0019221	cytokine-mediated signaling pathway	4	1.430E-3
	GO:0060337	type I interferon-mediated signaling pathway	3	1.497E-3
	GO:0060333	interferon-gamma-mediated signaling pathway	3	1.702E-3
	GO:0044419	interspecies interaction between organisms	4	8.564E-3
	GO:0032480	negative regulation of type I interferon production	2	2.592E-2
Fonction moléculaire	GO:0003950	NAD+ ADP-ribosyltransferase activity	2	3.816E-3
	GO:0016763	transferase activity, transferring pentosyl groups	2	1.314E-2

## Cluster #3

Catégorie	GO ID	Nom	Nombre de gènes	P-value
Processus biologique	GO:0060337	type I interferon-mediated signaling pathway	3	7.660E-4
	GO:0002376	immune system process	6	2.905E-3
	GO:0006955	immune response	5	4.990E-3
	GO:0009615	response to virus	3	1.725E-2
Composant cellulaire	GO:0019221	cytokine-mediated signaling pathway	3	2.961E-2
	GO:0008537	Proteasome activator complex	1	3.779E-2

## Cluster #4

Catégorie	GO ID	Nom	Nombre de gènes	P-value
Processus biologique	GO:0060337	type I interferon-mediated signaling pathway	13	3.794E-21
	GO:0019221	cytokine-mediated signaling pathway	13	5.945E-14
	GO:0009615	response to virus	12	3.204E-13
	GO:0051707	response to other organism	13	3.928E-10
	GO:0009607	response to biotic stimulus	13	5.161E-9
	GO:0051704	multi-organism process	15	1.228E-8
	GO:0006955	immune response	14	9.282E-8
	GO:0002376	immune system process	16	5.637E-7
	GO:0032480	negative regulation of type I interferon productio	4	1.374E-4

Cluster #4 (suite)

Catégorie	GO ID	Nom	Nombre de gènes	P-value
Processus biologique	GO:0060337	type I interferon-mediated signaling pathway	13	3.794E-21
	GO:0019221	cytokine-mediated signaling pathway	13	5.945E-14
	GO:0009615	response to virus	12	3.204E-13
	GO:0051707	response to other organism	13	3.928E-10
	GO:0009607	response to biotic stimulus	13	5.161E-9
	GO:0051704	multi-organism process	15	1.228E-8
	GO:0006955	immune response	14	9.282E-8
	GO:0002376	immune system process	16	5.637E-7
	GO:0032480	negative regulation of type I interferon production	4	1.374E-4
	GO:0001818	negative regulation of cytokine production	5	3.488E-4
	GO:0032479	regulation of type I interferon production	4	8.748E-4
	GO:0045087	innate immune response	7	1.019E-3
	GO:0032606	type I interferon production	4	1.425E-3
	GO:0006952	defense response	10	1.840E-3
	GO:0044419	interspecies interaction between organisms	7	2.175E-3
	GO:0060333	interferon-gamma-mediated signaling pathway	4	4.885E-3
GO:0035457	cellular response to interferon-alpha	2	5.386E-3	
GO:0035455	response to interferon-alpha	2	1.791E-2	
GO:0032020	ISG15-protein conjugation	2	2.684E-2	
Fonction moléculaire	GO:0003723	RNA binding	9	1.553E-3
	GO:0000175	3'-5'-exoribonuclease activity	2	2.967E-2
	GO:0016896	exoribonuclease activity, producing 5'-phosphomonoesters	2	4.550E-2

Cluster #4 (suite)

Catégorie	GO ID	Nom	Nombre de gènes	P-value
Fonction moléculaire	GO:0032393	MHC class I receptor activity	2	4.550E-2
Composant cellulaire	GO:0042612	MHC class I protein complex	2	2.936E-2

Cluster #5

Catégorie	GO ID	Nom	Nombre de gènes	P-value
Processus biologique	GO:0060337	type I interferon-mediated signaling pathway	3	1.041E-4
	GO:0019221	cytokine-mediated signaling pathway	3	4.078E-3
	GO:0006382	adenosine to inosine editing	1	4.604E-2
Fonction moléculaire	GO:0003692	left-handed Z-DNA binding	1	2.711E-2
	GO:0003726	double-stranded RNA adenosine deaminase activity	1	4.066E-2
	GO:0005654	Nucleoplasm	4	4.339E-3
Composant cellulaire	GO:0005654	Nucleoplasm	4	4.339E-3



## Cluster #6

Catégorie	GO ID	Nom	Nombre de gènes	P-value
Processus biologique	GO:0009615	response to virus	6	5.274E-5
	GO:0051707	response to other organism	7	4.627E-4
	GO:0060337	type I interferon-mediated signaling pathway	4	7.931E-4
	GO:0002376	immune system process	10	1.452E-3
	GO:0009607	response to biotic stimulus	7	1.809E-3
	GO:0006955	immune response	7	3.293E-2
	GO:0006952	defense response	7	3.796E-2
	GO:0007249	I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	4	4.303E-2
	GO:0051704	multi-organism process	7	4.511E-2
	Fonction moléculaire	GO:0008234	Cysteine-type peptidase activity	3
Composant cellulaire	GO:0042612	MHC class I protein complex	2	2.936E-2

## Cluster #7

Catégorie	GO ID	Nom	Nombre de gènes	P-value
Processus biologique	GO:0060337	type I interferon-mediated signaling pathway	4	1.513E-7
	GO:0019221	cytokine-mediated signaling pathway	4	2.116E-5
	GO:0002474	antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I	2	2.108E-3
	GO:0006955	immune response	4	4.326E-3

Cluster #7 (suite)

Catégorie	GO ID	Nom	Nombre de gènes	P-value
Processus biologique	GO:0048002	antigen processing and presentation of peptide antigen	2	7.045E-3
	GO:0042981	regulation of apoptotic process	4	1.197E-2
	GO:0043067	regulation of programmed cell death	4	1.247E-2
	GO:0010941	regulation of cell death	4	1.344E-2
	GO:0006917	induction of apoptosis	3	1.808E-2
	GO:0012502	induction of programmed cell death	3	1.835E-2
	GO:0019882	antigen processing and presentation	2	2.696E-2
	GO:0002376	immune system process	4	3.019E-2
	GO:0006915	apoptotic process	4	3.044E-2
	GO:0012501	programmed cell death	4	3.161E-2
GO:0043065	positive regulation of apoptotic process	3	4.946E-2	
Fonction moléculaire	GO:0046980	tapasin binding	1	3.227E-2
	GO:0046979	TAP2 binding	1	4.302E-2
	GO:0015421	oligopeptide-transporting ATPase activity	1	4.302E-2
	GO:0046977	TAP binding	1	4.302E-2
	GO:0046978	TAP1 binding	1	4.302E-2
Composant cellulaire	GO:0042825	TAP complex	1	2.100E-2
	GO:0042824	MHC class I peptide loading complex	1	2.625E-2

**Tableau 3. Liste des annotations GO des gènes régulés différentiellement en présence d'IFN dans les lignées stables. Les annotations sont organisées en clusters comme indiqués dans la figure 14.**