RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
Liberté
Égalité
Fraternité

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE ALFORT
Paris - 1765

IDENTIFICATION DE NOUVEAUX FACTEURS DE PATHOGENICITÉ ET DE VIRULENCE POUR LE VIRUS DE LA PESTE PORCINE AFRICAINE

THESE DE DOCTORAT

pour obtenir le grade de

Docteur de l'École nationale vétérinaire d'Alfort

Spécialité : Biologie Moléculaire et cellulaire

École doctorale n°581

Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

par

Juliette DUPRÉ

Directeur de thèse : Damien VITOUR
Co-directeur de thèse : Grégory CAIGNARD
Encadrante de thèse : Marie-Frédérique LE POTIER

Thèse présentée et soutenue à Maisons-Alfort, le 18 mars 2024

Préparée dans l'Unité UMR VIROLOGIE, INRAE-ANSES-ENVA et l'Unité UVIP, ANSES

Composition du jury avec voix délibérative :

Présidente & Rapporteur	Sandie MUNIER, Professeure, Université Paris Cité
Rapporteur & Examinateur	Frédérick ARNAUD, Directeur de recherche, INRAE (Lyon)
Examinateur	Pierre-Olivier VIDALAIN, Directeur de recherche, CNRS (Lyon)
Examinatrice	Marylène TIGNON, Chercheuse, Sciensano (Belgique)

École nationale vétérinaire d'Alfort
7, avenue du général de Gaulle
94 704 Maisons-Alfort Cedex
01 43 96 71 00
vet-alfort.fr

PARIS EST SUP

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Frédérick Arnaud et la Pr. Sandie Munier pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse en tant que rapporteurs. Je remercie aussi la Dr. Marylène Tignon et le Dr. Pierre-Olivier Vidalain pour leur participation à mon jury en tant qu'examinateurs.

Merci beaucoup à mes encadrants Grégory Caignard et Marie-Frédérique Le Potier ainsi qu'à mon directeur de thèse Damien Vitour.

Je remercie grandement Grégory pour son encadrement vraiment stimulant. Je suis très reconnaissante pour son implication, sa bienveillance, sa patience et sa confiance ainsi que pour m'avoir guidée et soutenue tout au long de ces années.

Je tiens à remercier chaleureusement Damien de m'avoir accueillie au sein de son équipe dès mon stage de M1, puis en M2 et enfin pour ce travail de thèse. Merci pour sa disponibilité sans faille ainsi que pour ses nombreux conseils toujours pertinents et constructifs.

Merci beaucoup à Marie-Frédérique pour avoir participé au bon déroulement de cette cotutelle, pour son super accueil au sein de son unité de Ploufragan et pour m'avoir associée à cette belle histoire de souche atténuée. Merci pour tous ses conseils et pour sa relecture du manuscrit.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de thèse : Nolwenn Jouvenet, Ignacio Caballero-Posada et Nadia Haddad. Merci pour ces moments d'échanges si constructifs et bienveillants.

Je souhaite témoigner toute ma reconnaissance à l'équipe I5. Je les remercie pour la bonne ambiance qui règne dans cette équipe. Ils m'ont beaucoup apporté durant ces quelques années. Je remercie tout particulièrement Aurore qui a été d'une aide incontestable tout au long de mes stages et de ma thèse. Merci pour ses nombreux conseils et pour son aide

technique. Elle restera pour moi un exemple de rigueur, d'efficacité et d'organisation. Merci aussi à Pascal ainsi qu'à Marine. J'étends aussi ces remerciements à toute l'équipe BIOR et notamment à Stephan Zientara pour m'avoir accueillie dans son UMR.

Je souhaite remercier l'Unité UVIP de Ploufragan et en particulier Mireille. Merci pour son aide à la paillasse, pour sa réactivité et son dynamisme.

Je tiens à remercier tous les membres de l'UMR de Virologie. Travailler à leurs côtés pendant ces quelques années fut un véritable plaisir. En particulier, je remercie les doctorants présents et passés : les Manon, Lise, Adèle, Axel, Valentine, Sarah, Pascal, Aïlona et Chloé. Merci pour tous ces très bons moments partagés. Je remercie aussi le duo Bahia et Lauren pour toute leur aide, administrative pour l'une et au labo pour l'autre.

Enfin, je remercie mille fois Marie, Manon D et Manon L qui sont très vite passées de collègues à amies ! Merci pour les sorties en tous genres, les week-end et les voyages. En particulier je remercie Marie pour son énergie, son optimisme et son soutien indéfectible ! Merci aussi à Betadine & Fernand de nous avoir bien diverti dans le bureau des doctorants au cours de ces quelques années !

Enfin, merci à tous mes proches pour leur soutien sans faille !

Résumé

La Peste Porcine Africaine est une maladie hautement pathogène causant une fièvre hémorragique chez les suidés. Elle est responsable de nombreuses épizooties, causant de grandes pertes économiques pour la filière porcine. Le virus de la Peste Porcine Africaine (*African Swine fever virus, ASFV*) est un virus à ADN double brin appartenant à la famille des *Asfvarviridae* et composé de plus de 150 protéines dont une grande partie n'a pas encore de fonction décrite. Il existe une étroite relation entre la capacité de certaines protéines virales à inhiber la réponse interféron de type I (IFN-I) et les processus d'atténuation et de virulence de l'ASFV, mais peu de mécanismes explicatifs ont été décrits sur le plan moléculaire. L'objectif de mon travail de thèse a été d'identifier les mécanismes moléculaires à l'origine du détournement de la machinerie cellulaire et d'autres expliquant l'échappement à la réponse immunitaire innée par l'ASFV. Dans un premier temps, nous avons effectué un crible sans *a priori* pour rechercher les partenaires cellulaires d'une centaine de protéines virales codées par l'ASFV. Des cribles double-hybride en levure ont ainsi été réalisés, en utilisant les protéines virales comme appâts contre une banque d'ADNc issus de macrophages alvéolaires de porc. Quatre-vingt-huit nouvelles interactions virus-hôte ont ainsi pu être identifiées. Un interacteur cellulaire, BANF1, a particulièrement retenu notre attention en raison de son rôle inhibiteur de cGAS et du fait qu'il soit l'interacteur cellulaire majoritairement identifié lors de nos cribles, en utilisant les protéines A151R et MGF360-21R comme appâts. Nous nous sommes ensuite intéressés à la fonction de ces deux protéines virales et avons pu montrer qu'elles étaient capables d'inhiber la voie IFN-I. Dans un deuxième temps, nous avons montré que des macrophages alvéolaires porcins infectés par une souche d'ASFV atténuée (ASFV-989) produisent trois fois plus d'IFN-I par rapport à ceux infectés par la souche parentale Georgia 2007/01. Or, huit gènes ont été délétés dans cette souche atténuée et l'un d'entre eux (MGF505-4R) code pour une protéine que nous avons aussi décrite pour inhiber la réponse IFN-I. Nous avons pu montrer que MGF505-4R interagit avec un composant de la voie IFN-I (TRAF3). MGF505-4R représente ainsi un nouveau facteur de virulence pouvant probablement expliquer le processus d'atténuation de la souche ASFV 989 sur le plan moléculaire. La connaissance des mécanismes explicatifs et interactions sous-jacentes au détournement des voies représente une ressource précieuse pour le développement de stratégies antivirales dont les vaccins vivants atténués.

ABSTRACT

African swine fever is a highly pathogenic disease that causes hemorrhagic fever in swine. It is responsible for numerous epizootics, causing major economic losses for the swine industry. The African Swine Fever virus (ASFV) is a double-stranded DNA virus belonging to the *Asfvarviridae* family and composed of more than 150 proteins, many of which still have no described function. There is a close relationship between the ability of certain viral proteins to inhibit the type I interferon (IFN-I) response and the processes of virulence and attenuation of ASFV, but few explanatory mechanisms have been described at the molecular level. The aim of my project was to identify the molecular mechanisms underlying the hijacking of the cellular machinery and others explaining the escape from the innate immune response by ASFV. Firstly, we carried out an unbiased screen to identify the cellular partners of a hundred viral proteins encoded by ASFV. Yeast two-hybrid screens were carried out, using viral proteins as bait against a cDNA library derived from pig alveolar macrophages. Eighty-eight new virus-host interactions were identified. One cellular interactor, BANF1, particularly caught our attention because of its role as a cGAS inhibitor and the fact that it was the most frequently identified cellular interactor when the A151R and MGF360-21R proteins were used as baits. We then investigated the function of these two viral proteins and were able to show that they could inhibit the IFN-I pathway. Secondly, we showed that porcine alveolar macrophages infected with an attenuated strain of ASFV (ASFV-989) produced three times more IFN-I than those infected with the parental Georgia 2007/01 strain. Eight genes have been deleted in this attenuated strain, and one of them (MGF505-4R) encodes for a protein that we have also described as inhibiting the IFN-I response. We were able to show that MGF505-4R interacts with a component of the IFN-I pathway (TRAF3). MGF505-4R thus represents a new virulence factor that can probably explain the attenuation process of ASFV 989 at a molecular level.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS **3**

RESUME **5**

ABSTRACT **6**

TABLE DES MATIÈRES **7**

LISTE DES FIGURES **10**

LISTE DES TABLEAUX **12**

LISTE DES ANNEXES **12**

LISTE DES ABRÉVIATIONS **13**

INTRODUCTION **18**

I. LE VIRUS DE LA PESTE PORCINE AFRICAINE 18

1. Épidémiologie *18*

a. La PPA est endémique en Afrique 18

b. Émergences hors du continent africain au 20ème siècle 19

c. Nouvelle introduction sur le continent européen en 2007 21

d. Situation asiatique 23

2. Hôtes et transmissions *24*

a. Cycles impliquant la tique 25

b. La tique molle, un vecteur compétent pour l'ASFV 26

c. Transmissions au sein des populations de porcs et de sangliers 27

3. Pathogenèse *28*

4. Le virus de la PPA *30*

a. Classification 30

b. Génotypage 31

c. Structure 32

d. Organisation génomique 34

e. Cycle de réplication 36

Entrée virale 36

Réplication 38

Transcription et traduction 39

Assemblage et libération 40

5. Approches vaccinales *41*

a. Vaccins inactivés 42

b. Vaccins sous-unitaires, à ADN et vectorisés 43

c. Vaccins vivants atténués 44
II. LA REPONSE ANTIVIRALE EN REPONSE A L'INFECTION PAR L'ASFV 48
1. Réponse IFN-I 48
a. La voie cGAS-STING 49
b. Autres voies induites par l'ASFV 50
c. Voie JAK-STAT & ISG 51
2. L'inflammation 53
3. Immunité adaptative 57
a. Réponse cellulaire 57
b. Réponse humorale 59
III. STRATEGIES DEVELOPPEES PAR L'ASFV POUR ECHAPPER A LA REPONSE ANTIVIRALE 61
1. Évasion des voies d'induction IFN-I 61
a. Lien entre atténuation et protéines de la famille des MGF 61
b. Inhibitions spécifiques de la voie cGAS-STING 62
c. Inhibition de la reconnaissance de l'ASFV par d'autres senseurs cellulaires 63
d. Inhibition de composants centraux communs à plusieurs voies d'induction d'IFN-I. 64
2. Évasion de la voie de réponse à l'IFN-I 67
3. Évasion de la réponse inflammatoire 69
4. Autres voies cellulaires inhibées par l'ASFV 72

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE 75

CHAPITRE 1 : RECHERCHE DES INTERACTEURS CELLULAIRES DE L'ASFV 77

I. INTRODUCTION 77
II. MATERIELS ET METHODES 78
1. Clonage par recombinaison Gateway® 78
a. Principe 78
b. Clonage des ORFs viraux 79
c. Clonage des banques d'ADNc dans le vecteur pDEST22 79
2. Le double hybride en levure 79
a. Principe 79
b. Transformation des levures avec les appâts 81
c. Transformation des levures avec la banque d'ADNc 81
d. Cribles en double hybride en levure (Y2H) 82
e. Identification des proies 83
3. Co-purification d'affinité par GST pull down 83
a. Principe 83
b. Culture cellulaire et transfection 84
c. Co-purification 85
d. Western Blot 85
4. Colocalisation par microscopie confocale 86

5. Fragmentome *87*
a. Principe 87
b. Construction des différents fragments 87
c. Transformation des levures 88
6. Tests rapporteurs luciférase *88*
7. Évaluation de la quantité d'IFNβ par RT-qPCR *90*
8. siARN *91*
III. RESULTATS 92
1. Identifications des interactions par Y2H *92*
2. Choix des interacteurs *98*
a. Carte d'interactions par appât 98
b. BANF1, un interacteur d'intérêt 100
3. Validation des interactions A151R-BANF1-MGF360-21R *104*
a. Validation par double-hybride en levure 104
b. Validation par co-purification d'affinité 105
4. Cartographie des domaines minimums d'interactions *106*
5. Colocalisations entre A151R-BANF1 & MGF360-21R *109*
6. Le silencing de BANF1 induit une diminution de la réplication de l'ASFV *114*
7. A151R et MGF360-21R : des inhibiteurs de la voie IFN-I *116*
8. L'action inhibitrice de A151R et MGF360-21R ne semble pas liée à BANF1 ..... *120*
9. Cribles avec à priori sur la voie IFN-I *121*
IV. DISCUSSION 124
1. Cribles Y2H *124*
2. Analyse des GO Terms *125*
3. Un autre crible en Y2H a récemment été publié *126*
4. Interaction A151R-BANF1-MGF360-21R *127*
5. Cribles sur la voie IFN-I *132*

CHAPITRE 2 : PROCESSUS D'ATTENUATION ET D'INHIBITION DE LA VOIE IFN-I 134

I. INTRODUCTION 134
II. RESULTATS/DISCUSSION 136
III. CONCLUSIONS 170

CONCLUSION GÉNÉRALE 172

PUBLICATIONS 173

COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES 174

ANNEXES 175

BIBLIOGRAPHIE 215

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Présence de la PPA en Afrique entre 2000 et 2023. 19
Figure 2: Introductions de la PPA hors Afrique au cours du XXème siècle. 20
Figure 3 : Évolution de l'épidémie de PPA en Europe entre 2007 et 2023. 22
Figure 4 : Pays touchés par la PPA entre 2007 et 2023. 23
Figure 5 : Les différents cycles de transmission de la PPA. 24
Figure 6 : Les différents modes de transmission au sein de la tique. 26
Figure 7: Arbre phylogénétique des *Asfarviridae*. 31
Figure 8: Arbre phylogénétique représentant les différents génotypes de l'ASFV. 32
Figure 9: Visualisation de virions d'ASFV en microscopie électronique. 33
Figure 10 : Représentation de la structure de l'ASFV. 34
Figure 11: Organisation génomique de l'ASFV. 36
Figure 12: Cycle de réplication de l'ASFV. 41
Figure 13 : Voie IFN-I en réponse à l'infection par ASFV. 53
Figure 14 : L'inflammation et l'apoptose. 56
Figure 15 : Inhibition de la voie d'induction d'IFN-I par l'ASFV. 65
Figure 16 : Inhibition de la voie JAK STAT par l'ASFV. 67
Figure 17 : Inhibition de la voie NFKB et de l'inflammasome par l'ASFV. 69
Figure 18: Mécanismes de l'inhibition de l'apoptose par l'ASFV. 73
Figure 19 : Clonage par recombinaison Gateway 78
Figure 20 : Le Double hybride en levure 80
Figure 21 : Copurification d'affinité par GST pull down 84
Figure 22 : Tests rapporteurs IFN-β et ISRE-luciférase. 89
Figure 23 : Test d'auto-activation des appâts viraux. 93
Figure 24 : Résumé des cribles en Y2H, contenant les résultats trouvés à chaque étape des cribles. 96
Figure 25 : Carte d'interaction représentant les interacteurs cellulaires trouvés lors des cribles Y2H. 97
Figure 26 : Analyse des GO terms les plus enrichis au sein de nos interacteurs. 98

Figure 27 : Cartographie des interactions trouvées pour chaque appât. 99
Figure 28 : Carte d'interaction des appâts viraux MGF369-21R et A151R..... 101
Figure 29 : Interactome des protéines virales MGF360-21R et A151R en AP-MS 103
Figure 30 : Validation de l'interaction A151R-BANF1 et MGF360-21R et BANF1 en levure . 104
Figure 31 : Validation de l'interaction A151R-BANF1 et MGF360-21R-BANF1 par GST pull-down. 106
Figure 32 : Fragmentome de A151R et de BANF1. 108
Figure 33 : Domaines de BANF1 identifiés en Y2H avec MGF360-21R 109
Figure 34 : Colocalisation des protéines A151R, MGF360-21R avec BANF1 en miscroscopie confocale..... 111
Figure 35 : Relocalisation de BANF1 endogène 113
Figure 36 : Effet du silencing de BANF1 sur la réplication de l'ASFV et sur le protéome cellulaire 115
Figure 37 : Inhibition de la voie d'induction de l'IFN-β par A151R et MGF360-21R en cellules HEK-293T..... 118
Figure 38 : Inhibition de l'induction d'IFN-β par A151R et MGF360-21R en cellules PK15... 119
Figure 39 : A151R et MGF360-21R n'ont pas d'effet sur la voie d'amplification de la réponse IFN-I..... 119
Figure 40 : Effet du silencing de BANF1 sur l'inhibition induite par A151R et MFG360-21R. 120
Figure 41 : Identification des inhibiteurs des voies d'induction et d'amplification de la réponse IFN-I..... 123

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les différents signes cliniques et lésions selon la virulence. 29
Tableau 2: Créations de souches atténuées d'ASFV afin de créer des vaccins vivants. 47
Tableau 3 : Les mécanismes d'inhibition de la voie d'induction d'IFN-I par l'ASFV. 66
Tableau 4: Les mécanismes d'inhibition de la voie JAK-STAT par l'ASFV. 68
Tableau 5: Les mécanismes d'inhibition de l'induction de l'inflammation par l'ASFV. 70
Tableau 6 : Découpage de la protéine BANF1 87
Tableau 7: Découpage de la protéine A151R. 88
Tableau 8: Nombre de clones ayant poussé lors des cribles effectués contre la banque humaine d'ADNc. 95
Tableau 9: Nombre de clones ayant poussé contre la banque porcine d'ADNc. 95

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Séquences des amorces utilisées en RT-qPCR 175
Annexe 2 : Résultats complets des cribles Y2H effectués avec la banque humaine. 175
Annexe 3 : Résultas complets des cribles Y2H effectués avec la banque porcine. 176
Annexe 4 : Liste des interacteurs trouvés pour chaque appât viral. 177
Annexe 5 : Analyse de GO terms. 179
Annexe 6 : Colocalisation A151R-BANF1 et MGF360-21R-BANF1 en cellules HeLa 180
Annexe 7 : Revue Modulation de la réponse immunitaire innée par le virus de la PPA. 181
Annexe 8 : Article en collaboration avec le FLI sur la protéine CP204L de l'ASFV. 195

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- **-L**: milieu dépourvu de leucine
- **-W**: milieu dépourvu de tryptophane
- **3-AT**: 3-amino-1,2,4-triazole

- **AbALV**: *Abalone asfar-like virus*
- **AC**: Anticorps
- **AD**: Domaine activateur de la transcription
- **ADN**: Acide désoxyribonucléique
- **ADNc**: ADN complémentaire
- **ADNdb:** ADN double brin
- **AP-MS**: *Affinity Purification Mass Spectrometry*
- **ARNdb**: ARN double brin
- **ARNm**: Acide ribonucléique messager
- **ASC**: *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*
- **ASFV:** African Swine Fever Virus
- **ATF6**: *Activating transcription factor 6*

- **B2M**: Beta-2 microglobuline
- **BANF1**: *barrier-to-autointegration factor 1*
- **Bcl-2***: B-cell lymphoma-2*
- **BLAST**: *Basic Local Alignment Search Tool*

- **CALCOCO2:** *Calcium-binding and coiled-coil domain-containing protein 2*
- **CARD**: *Caspase activation and recruitment domains*
- **CD163**: *Cluster Differentiation 163*
- **CD2v**: *Viral hemagglutinins CD2-like protein*
- **cGAMP:** *2',3'-cyclic GMP-AMP*
- **cGAS**: *Cyclic GMP-AMP synthase*

- **COPA:** *COPI coat complex subunit alpha*

- **DAI**: *DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors*
- **DB**: Domaine de liaison à l'ADN
- **DDX41**: *DEAD box protein 41*
- **DIVA:** *Differentiating infected from vaccinated animals*
- **DLC8:** *8-kDa light chain cytoplasmic dynein*
- **DO:** densité optique

- **EBV** : Virus d'Epstein-Barr

- **FLI:** Friedrich-Loeffler-Institut
- **FLNB** : *Filamin B*

- **GFP**: *Green Fluorescent protein*:
- **GO:** *Gene Ontology*
- **GSDMD** : *Gasdermin D*
- **GST***: Glutathion S-Transferase*
- **GTase:** Guanosyltransférase

- **HAD_{50}**: Hemadsorbing dose 50%
- **HBV:** Virus de l'Hépatite B
- **HEK-293T:** *Human Embryonic Kidney 293T*
- **HeLa:** *Henrietta Lacks*
- **HSV-I:** *Herpes simplex virus 1*

- **IAP:** *Inhibitor of apoptosis*
- **IBRS-2:** *Instituto Biologico-Rim Suino-2*
- **ICTV:** *International Committee on Taxonomy of Viruses*
- **IFI16**: *Interferon gamma inducible protein 16*

- **IFITM:** *Interferon-induced transmembrane*
- **IFNAR***: IFNα receptors*
- I**KK***: IκB kinase*
- **IP-10**: *IFN-γ-induced protein 10*
- **IRF3***: Interferon regulatory factor 3*
- **ISD:** *Interferon stimulatory DNA*
- **ISG:** *Interferon stimulated gene*
- **ISRE**: *IFN-stimulated response element*

- **JAK1** : *Janus kinase 2*

- **KO** : *Knock-out*
- **Kpb :** Kilo paires de bases
- **KSHV** : Virus du Sarcome de Kaposi
- **LRR:** *Leucine rich repeats*
- **LT**: Lymphocyte T

- **MAVS***: Mitochondrial antiviral signaling protein*
- **MGF**: *Multigene family*
- **MOI**: *Multiplicity of infection*
- **MoMLV**: *Moloney murine leukemia virus*
- **MTase** : Méthyltransférase
- **Mx**: *Myxovirus resistance*

- **NCDLV** : *Nucleocytoplasmic large DNA viruses*
- **NEMO:** *NF-kB Essential Modulator*
- **NGS:** *Next Generation sequencing*
- **NK** : *Natural killer*
- **NLRP3**: *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*

- **OAS1**: *2', 5'-oligoadenylate synthetase gene*

- **OMSA**: Organisation mondiale pour la santé animale
- **PAMPs:** *Pathogen associated molecular patterns*
- **PCR:** *Polymerase chain reaction*
- **PEG**: Polyéthylène glycol
- **PFA**: Paraformaldéhyde
- **PIPEC***: Plum Island porcine epithelial cells*
- **PK15:** *Porcine Kidney-15*
- **Pol III**: ARN polymérase ADN dépendante III
- **Poly(dA:dT)**: Poly(deoxyadenylic-deoxythymidylic)
- **PPA:** Peste Porcine Africaine
- **PRR**: *Pattern recognition receptors*

- **RANTES**: *Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*
- **RE:** Réticulum endoplasmique
- **RIG-I***: Retinoic acid inducible gene I*
- **ROS:** *Reactive oxygen species,* espèces réactives de l'oxygènes
- **RT-qPCR:** *Quantitative real time polymerase chain reaction*

- **siARNs:** *Short interfering RNA*
- **SLA**: Antigène leucocytaire
- **SLA-II:** *Swine leukocyte antigen,* antigène de leucocyte de porc
- **SPF**: *Specific pathogen free*
- **STAT**: *Signal transducer and activator of transcription*
- **STING:** *Stimulator of interferon genes*
- **SVF:** Sérum de veau fœtal
- **SwIFITM** : *Swine IFITM*

- **TANK***: TRAF family member-associated NF-kappa B activator*
- **TBK1***: TANK-binding kinase*
- **TBP-like**: *TATA-binding protein*

- **$TCID_{50}$** : Tissue culture infectious dose
- **TCR**: Récepteur des cellules T
- **TE/LiAC:** Tris-HCl EDTA / acétate de lithium
- **TLR3:** *Toll like receptor 3*
- **TNFα***: Tumor Necrosis Factor α*
- **TPase**: Triphosphatase
- **TRAF:** *Tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor*
- **TRAIL**: *TNF-related apoptosis-inducing ligand*
- **TRIF:** *Toll interleukin-1 receptor*
- **TRIM21**: *Tripartite motif-containing protein 21*
- **TYK2**: *Tyrosine kinase 2*

- **UBA3**: *Ubiquitin-like modifier activating enzyme 3*

- **VIH**: Virus de l'Immunodéficience humaine
- **VIM**: Vimentine
- **VRKs:** *vaccinia-related kinases*
- **VV:** Virus de la Vaccine

- **Y2H:** *yeast two-hybrid system*
- **YPD:** Yeast extract Peptone Dextrose

INTRODUCTION

I. Le Virus de la Peste Porcine Africaine

Le virus de Peste Porcine Africaine (*African Swine Fever virus*, ASFV) de la famille des *Asfarviridae* est un virus complexe avec un génome à ADN double brin (ADNdb). Il est l'agent étiologique de la Peste Porcine Africaine (PPA). Cette dernière est une maladie virale non-zoonotique touchant uniquement les suidés, se transmettant par contact entre animaux mais aussi via les tiques molles du genre *Ornithodoros.* Véritable danger sanitaire pour lequel il n'existe ni vaccin ni traitement, la PPA est une maladie à déclaration obligatoire à l'Organisation mondiale pour la santé animale (OMSA). Les souches virulentes induisent une fièvre hémorragique avec près de 100% de mortalité chez les porcs et les sangliers, tandis que les suidés sauvages africains semblent asymptomatiques. Depuis 2007, une véritable pandémie est en cours, touchant presque l'ensemble des continents et induisant des conséquences économiques et sociales dévastatrices. En effet, le porc correspondant à 35% de la consommation mondiale de viande, la PPA menace non seulement la santé animale, mais aussi la sécurité alimentaire de nombreux pays.

1. Épidémiologie

a. La PPA est endémique en Afrique

La Peste Porcine Africaine a été décrite pour la première fois au Kenya en 1910 par R. Montgomery. Ce dernier a diagnostiqué une fièvre hémorragique touchant les porcs domestiques, avec des signes cliniques relativement similaires à ceux de la Peste Porcine Classique (1). A l'origine, la PPA était endémique en Afrique de l'Est, où il existait uniquement un cycle sylvatique entre les phacochères (*Phacochoerus africanus*) et les tiques molles (*Ornithodoros moubata)* vivant au sein de leurs terriers (2). Grâce à des méthodes d'horloge moléculaire, il a été montré que les différentes souches existantes en Afrique ont évolué au

sein des tiques et des phacochères depuis plus de trois-cents ans, et possèdent un ancêtre commun datant du début du XVIIIème siècle (3). Cependant, la colonisation de nombreux pays d'Afrique de l'Est, dont le Kenya par les Britanniques à la fin du XIXème siècle, a abouti à un apport massif de porcs domestiques, ainsi que de nombreux échanges de ces animaux, permettant la circulation du virus au sein du continent (4). De nos jours, la PPA est présente dans la majeure partie des pays africains (Figure 1) (5), avec notamment une circulation des vingt-quatre génotypes (6) existant au sein de cycles sylvatiques en Afrique de l'Est et en Afrique du Sud, et plus particulièrement au sein des populations de porcs domestiques en Afrique de l'Ouest (7).

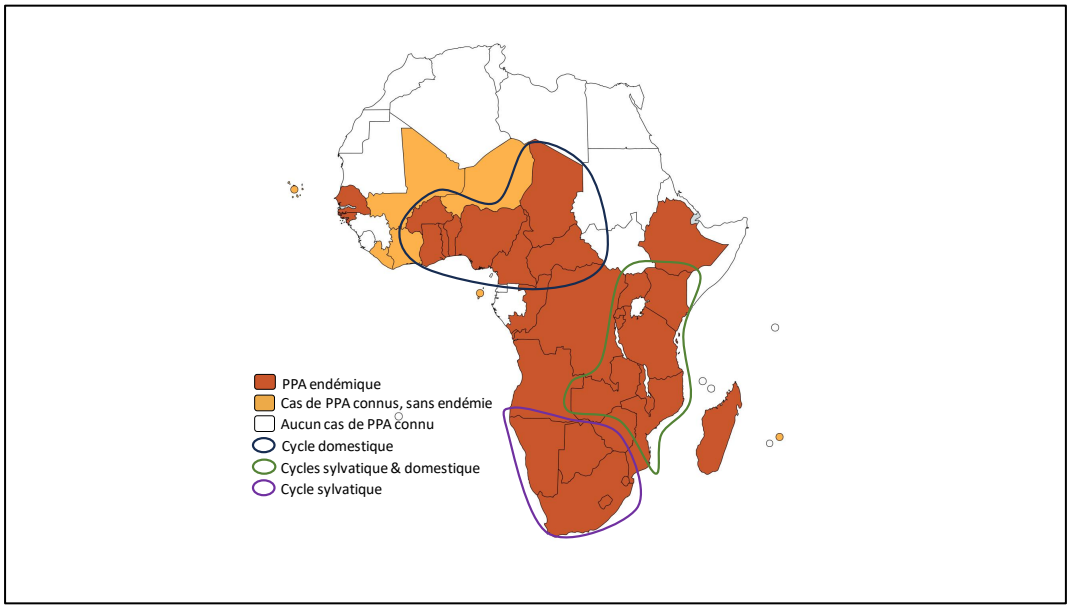


Figure 1: Présence de la PPA en Afrique entre 2000 et 2023.

Carte réalisée à partir des données issues de Penrith et al., 2022, Mulumba-Mfumu et al., 2019 et Penrith et al., 2019 (5–7).

b. Émergences hors du continent africain au 20ème siècle

La première introduction en Europe de la PPA a brièvement eu lieu en 1957 au Portugal, à partir de déchets contaminés issus d'avions en provenance d'Angola. Elle a ensuite été réintroduite au Portugal puis en Espagne en 1960. L'analyse des deux souches des émergences de 1957 et 1960, bien que toutes deux du génotype I de l'ASFV, a pu montrer

qu'elles sont bien issues de deux introductions indépendantes (8). La PPA est restée endémique dans la Péninsule Ibérique pendant plus de trente ans, notamment à cause de la présence de la tique *Ornithodoros erraticus* qui a joué un rôle de réservoir (9, 10). En 1990, la péninsule Ibérique retrouve son statut indemne grâce à des mesures sanitaires strictes : abattages systématiques des troupeaux infectés, dépeuplements de sangliers, renforcement des mesures de biosécurité des exploitations porcines, contrôles des mouvements d'animaux et sensibilisations des éleveurs.

En dehors de la Péninsule Ibérique, de nombreux foyers sporadiques sont aussi apparus en Europe : en France, en Italie, en Russie, aux Pays-Bas, à Malte et en Belgique (Figure 2) (11). Tous ces foyers ont rapidement été éradiqués, à l'exception de la Sardaigne, où la PPA est toujours endémique. En effet, la PPA y a été introduite en 1978 et circule depuis au sein des populations de sangliers et de porcs élevés traditionnellement en liberté (12). La situation est cependant en nette amélioration ces dernières années grâce à des mesures d'abattages des porcs sauvages (5 000 porcs sauvages abattus entre 2015 et 2020) ainsi que l'interdiction des élevages extensifs (13).

En 1971, la PPA émerge à Cuba, puis se propage à la fin des années 1970 en République Dominicaine puis à Haïti, ainsi qu'au Brésil en 1978 (14).

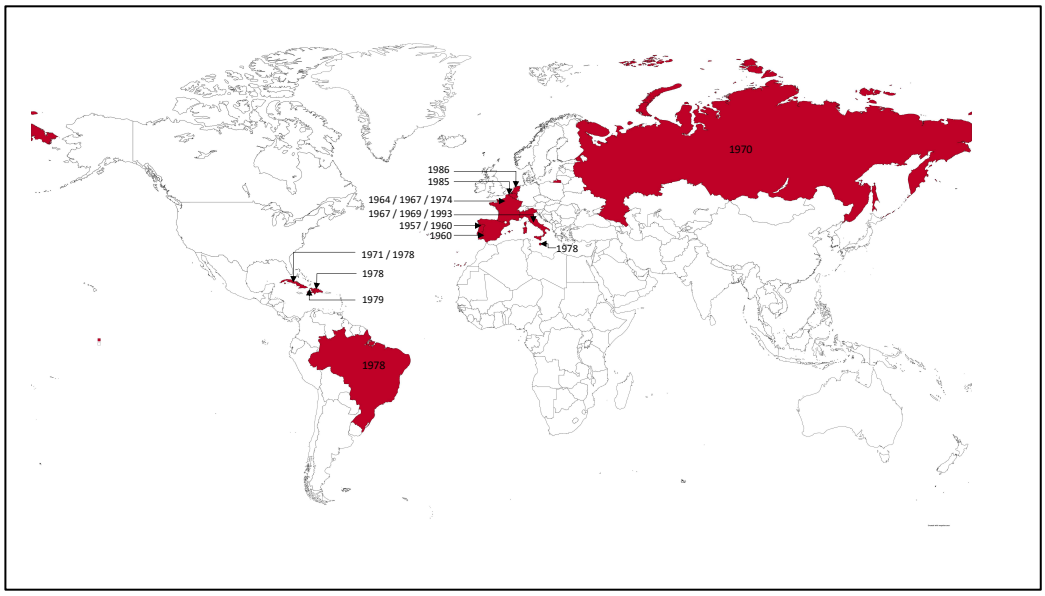


Figure 2: Introductions de la PPA hors Afrique au cours du XXème siècle.

Carte réalisée à partir des données issues de WAHIS-OMSA du 23 septembre 2023.

c. Nouvelle introduction sur le continent européen en 2007

La deuxième introduction de la PPA en Europe a eu lieu en Géorgie en juin 2007. Cette fois-ci, la souche responsable de cette nouvelle émergence est une souche très virulente du génotype II de l'ASFV (Georgia 2007/1), avec un isolat proche de ceux circulant en Zambie, à Madagascar et au Mozambique (15). En seulement deux mois, plus de 20% de la population de porcs domestiques de la Géorgie a été touchée (environ 60 000 porcs) (16). Malgré la mise en place de mesures de contrôle de la maladie (abattages de tous les porcs au sein des élevages infectés,…), la maladie s'est peu à peu propagée dans la région du Caucase et est détectée dès novembre 2007 en Russie chez des sangliers (17), mais aussi en Arménie et en Azerbaïdjan. En 2013, la PPA s'étend en Ukraine ainsi qu'en Biélorussie. Un an plus tard la PPA arrive pour la première fois au sein de l'Union Européenne en touchant la Pologne et les Pays Baltes. La maladie se répand rapidement dans les populations de sangliers, mais aussi dans les petits élevages familiaux de porcs, sans mesure de biosécurité, aboutissant à 12 500 infections chez des sangliers et 400 foyers chez des porcs domestiques en Pologne entre 2014 et 2021 (18).

En 2018, la PPA continue de s'étendre dans de nombreux pays d'Europe centrale (Figure 3). Cette même année, la PPA fait un saut de plusieurs milliers de kilomètres pour atteindre des sangliers dans les Ardennes belges. De strictes mesures de restrictions sont alors prises : construction d'un réseau de barrières limitant les zones infectées, interdiction des activités dont la chasse au sein de ces zones, prélèvements et analyses des carcasses de sangliers, etc. En 2020, après 827 cas de sangliers infectés, la Belgique devient le premier pays à avoir éradiqué la PPA grâce à des mesures de biosécurité depuis le début de l'épidémie en 2007 (19).

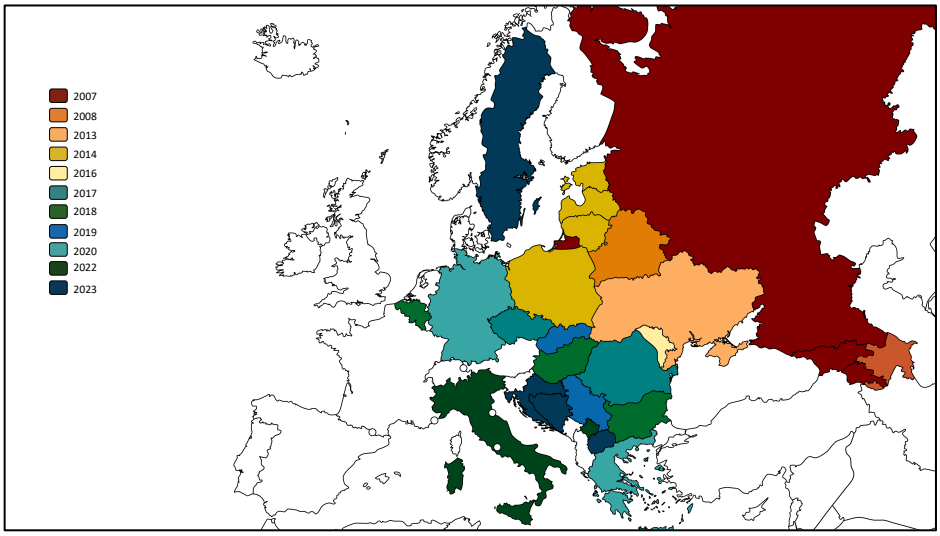


Figure 3 : Évolution de l'épidémie de PPA en Europe entre 2007 et 2023.

Les pays sont colorés en fonction de l'année de détection du premier cas dans le pays. Carte réalisée à partir des données issues de WAHIS-OMSA du 23 septembre 2023.

En 2020, des premiers cas de sangliers infectés ont été détectés en Allemagne lors d'une surveillance passive dans les forêts frontalières de la Pologne (20). Les nombreuses mesures de biosécurité dès lors mises en place se sont révélées moins efficaces qu'en Belgique, les situations épidémiologiques des deux pays étant bien différentes. En effet, l'Allemagne subit en continu des vagues d'introductions de sangliers infectés en provenance de Pologne, tandis que la Belgique ne présentait qu'un seul cluster (21). Différents foyers au sein d'élevages de porcs domestiques ont aussi été trouvés, dans l'est de l'Allemagne, ainsi qu'un foyer unique en mai 2022 à moins de dix kilomètres de la frontière française.

En 2022, de nombreux sangliers et porcs domestiques ont été infectés dans différentes régions italiennes. Ces foyers sont bien en lien avec les souches ravageant actuellement l'Europe (génotype II), et n'ont pas de lien avec l'endémie en Sardaigne (génotype I). Plus récemment, en septembre 2023, un cas de sanglier contaminé a été retrouvé en Suède, correspondant au premier cas scandinave à ce jour.

Enfin, en 2021 la PPA est de nouveau apparue aux Caraïbes (Haïti et République Dominicaine), faisant craindre une introduction sur le continent nord-américain (22).

d. Situation asiatique

En 2018, la PPA a fait un bond géographique de l'Europe vers la Chine, avec un isolat très proche des souches circulant en Géorgie, Estonie, Russie (23) et Pologne (24). L'épizootie s'est peu à peu propagée dans les différentes provinces chinoises. Ce scénario, tant redouté, a eu des conséquences socio-économiques tout à fait dévastatrices, la Chine étant le premier producteur mais aussi consommateur de viande de porc au monde (25). En seulement un an, le cheptel de porcs chinois aurait été réduit de 40%, avec la mort de plus de cinq millions de porcs (26). Ces pertes comprennent les animaux morts directement de la maladie, ainsi que ceux abattus pour limiter la propagation. Ces mesures, ainsi que les restrictions de commerce international, auraient ainsi couté 111 milliards de dollars à la Chine en 2019, touchant plus frontalement les petites exploitations rurales (< 500 porcs) composant pourtant 95% des exploitations chinoises (27).

Inévitablement, la PPA s'est peu à peu répandue dans la majeure partie des pays asiatiques, touchant en 2019 le Vietnam, le Cambodge, Hong-Kong, les Corées du Nord et du Sud, le Laos, les Philippines, l'Indonésie, la Birmanie, le Timor-Leste (28). S'en est suivi de l'Inde et de la Papouasie-Nouvelle-Guinée en 2020, ainsi que de la Malaisie, du Bhoutan, et de la Thaïlande en 2021. Enfin, le Népal et Singapour ont respectivement été touchés en 2022 et en 2023 (Figure 4).

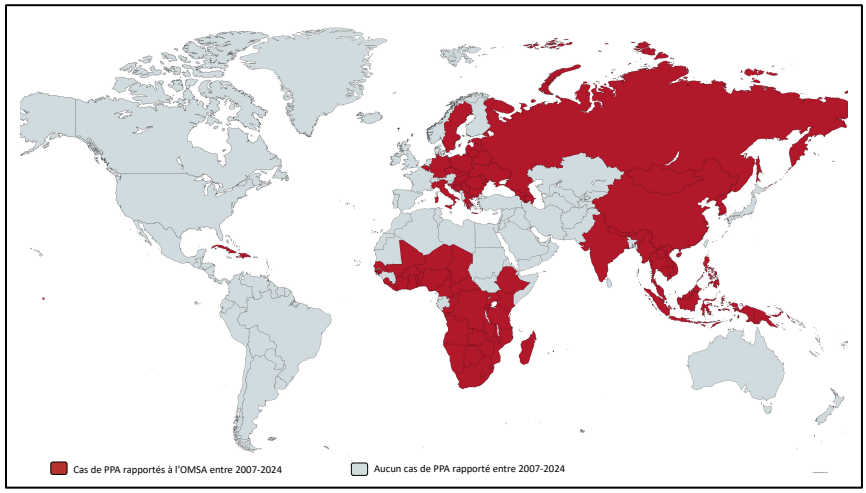


Figure 4 : Pays touchés par la PPA entre 2007 et 2023.

En rouge sont représentés les pays ayant déclaré un cas de PPA entre juin 2007 et octobre 2023, et en gris les pays n'en ayant pas déclaré. Carte réalisée à partir des données issues de WAHIS-OMSA du 23 septembre 2023.

2. Hôtes et transmissions

La PPA est une maladie touchant uniquement les membres de la famille des *Suidés.* Les suidés sauvages africains comme les phacochères (*Phacochoerus spp*) et les potamochères (*Potamochoerus spp*) semblent ne pas y être sensibles ; tandis que les sangliers (*Sus scrofa*) et les porcs domestiques (*Sus scrofa domesticus*) peuvent développer une fièvre hémorragique. Cette maladie se transmet par contact direct entre animaux, par l'intermédiaire de matériels, viandes et déchets contaminés, mais aussi via les tiques molles du genre *Ornithodoros* (29).

Il existe plusieurs cycles épidémiologiques de transmission de la PPA (Figure 5) : le cycle sylvatique entre les tiques et les phacochères, le cycle tiques-porcs domestiques, le cycle au sein des populations de porcs domestiques et enfin celui impliquant les sangliers et l'environnement (30). Tous ces cycles ne sont pas indépendants, ils sont bien souvent en relation, suivant les facteurs épidémiologiques et écologiques inhérents à la localisation des animaux infectés. Les situations épidémiologiques sont alors bien différentes en Afrique, en Europe et en Asie (31).

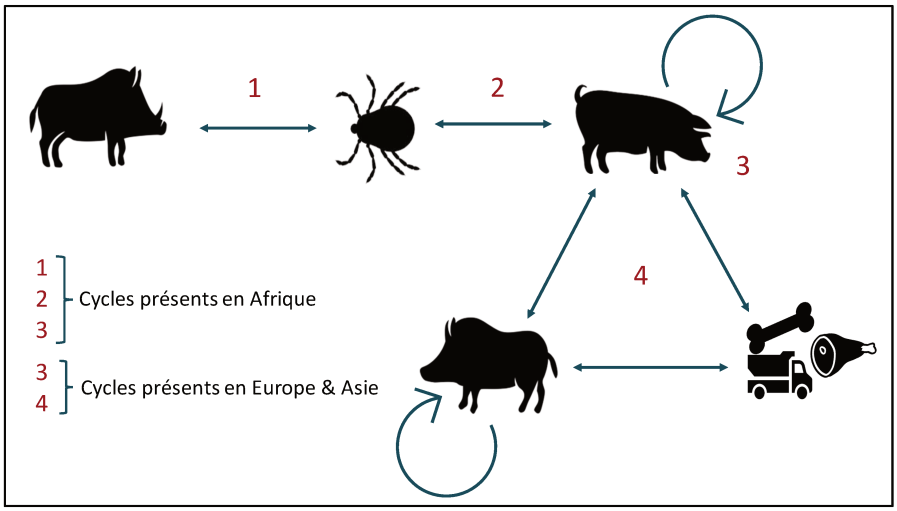


Figure 5 : Les différents cycles de transmission de la PPA.

1) *Cycle sylvatique entre les phacochères et les tiques. 2) Cycle tiques-porcs domestiques. 3) Cycle au sein des porcs domestiques. 4) Cycle sangliers-environnement.*

a. Cycles impliquant la tique

L'ASFV est un arbovirus. Il peut en effet être transmis par un vecteur de la famille des *Argasidae* : les tiques molles du genre *Ornithodoros*. Au sein du berceau de la PPA en Afrique de l'Est, il existe un cycle sylvatique entre les tiques, principalement de l'espèce *Ornithodoros moubata*, et les phacochères (7). En effet, cette espèce de tique étant endophile, elle vit au sein même de leurs terriers, les infectant dès leur plus jeune âge. Les jeunes phacochères vont alors développer une virémie transitoire, sans pour autant développer de signe clinique. Les tiques saines peuvent à leur tour être infectées en se nourrissant sur ces phacochères virémiques (32). Il ne semble pas pouvoir y avoir de transmission directe entre phacochères, ou entre phacochères et porcs domestiques (33). Les tiques et les phacochères semblent donc être les véritables réservoirs du virus. Ainsi la présence du cycle sylvatique rend complexe voire impossible l'éradication de la PPA dans certaines régions d'Afrique de l'Est et du Sud (34).

D'autres suidés sauvages africains comme les potamochères peuvent être expérimentalement infectés via les tiques sans pour autant développer de symptôme (35). Leur rôle dans le maintien ou la propagation de la maladie semble négligeable. En effet, les potamochères sont des animaux nocturnes, avec une faible densité de population et ne vivant pas dans des terriers, ce qui limite leurs contacts avec les porcs domestiques ou les tiques (36).

Les tiques *Ornithodoros* sont aussi tout à fait capables d'infecter les porcs domestiques, au sein d'un cycle tiques-porcs. Des tiques infectées ont été retrouvées dans des porcheries, que ce soit en Afrique ou lors de l'épidémie touchant la Péninsule Ibérique à la fin du XXème siècle (36). Des cas de réémergence de l'ASFV dus à la présence de la tique ont été identifiés dans des fermes précédemment infectées (10). Des mesures de contrôle au sein des porcheries dans les zones où sont présentes les tiques compétentes, impliquant notamment l'application de traitements acaricides, pourraient permettre d'éviter certaines réémergences (36).

La présence de tiques du genre *Ornithodoros* a été rapportée dans certaines régions d'Ukraine avec la présence de l'espèce *O. verrucosus* (37), cependant cette espèce ne semble

pas être capable de transmettre les souches d'ASFV circulant actuellement en Europe (38). En Chine la présence de tiques *O. tartakovsky* et *O. tholozani* a été rapportée (39), cependant leur capacité vectorielle à transmettre l'ASFV n'a pas encore été étudiée. A ce jour, aucun lien n'a été fait entre la présence de tique et la panzootie en cours en Europe et en Asie.

b. La tique molle, un vecteur compétent pour l'ASFV

Les tiques molles du genre *Ornithodoros* sont impliquées dans le maintien et la transmission de la maladie. L'ASFV est capable de se répliquer chez la tique (40), et semble donc être à ce jour le seul arbovirus avec un génome à ADNdb capable de se répliquer à la fois chez ses hôtes mammifères et arthropodes. L'ASFV se transmet de tiques en tiques par voies trans-ovarienne et sexuelle et se maintient de façon transstadiale au cours de sa vie (Figure 6) (41–43). Cependant, toutes les souches de l'ASFV ne se répliquent pas avec la même efficacité suivant les différentes espèces du genre *Ornithodoros*. La réplication et la dissémination du virus au sein de la tique sont des facteurs permettant une transmission horizontale (tiques-suidés) ou verticale (tique-tique) de l'ASFV (44).

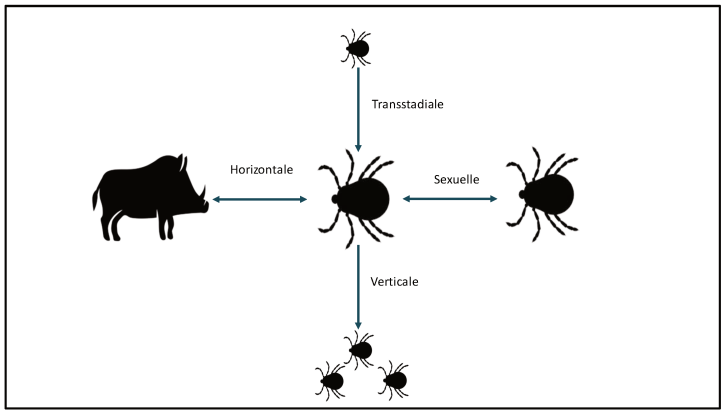


Figure 6 : Les différents modes de transmission au sein de la tique.

Les tiques *Ornithodoros* présentent une infection persistante. Il a été montré que les tiques *O. porcinus* maintiennent un titre de 10^6 HAD_{50} (*hemadsorbing dose 50%*) par tique plus d'un an après leur infection par l'ASFV, et que ce titre ne décline que de 10^2 plus de trois ans

après le repas sanguin (40, 45). Une souche d'ASFV a pu être isolée à partir de tiques *O. erraticus* plus de cinq ans après leur infection (46). La persistance du virus chez la tique ainsi que leur longue durée de vie sont des facteurs expliquant la difficulté de l'éradication de la PPA dans la Péninsule Ibérique entre 1970 et 1990.

Il y a eu une véritable coévolution entre les tiques du complexe *Ornithodoros moubata* et l'ASFV. L'analyse du génome des tiques *Ornithodoros moubata* montre ainsi des traces d'intégration du génome de l'ASFV datant d'il y a 1,47 million d'années (47). Une grande diversité des souches sont présentes au sein du cycle sylvatique, puisque les vingt-quatre génotypes de l'ASFV décrits à ce jour ont été retrouvés au sein des terriers de phacochères en Afrique de l'Est et du sud, tandis que seuls les génotypes I et II ont été retrouvés dans les autres régions d'Afrique, mais aussi en Europe et Asie (31, 48, 49). Certains gènes viraux comme les gènes MGF360-3HL, MGF360-3IL et MGF360-3LL ainsi que le gène EP402R codant pour la protéine virale CD2v facilitent l'adsorption et la réplication du virus chez la tique (50, 51).

c. Transmissions au sein des populations de porcs et de sangliers

L'ASFV peut être transmis par contact direct entre porcs domestiques, via la voie oro-nasale ou via des abrasions cutanées (52), puisque le virus est présent dans le sang (haute virémie), mais aussi dans les diverses sécrétions telles que les urines, la salive ou les fèces (53). Une transmission par aérosols à une faible distance semble aussi possible (54).

L'ASFV étant très résistant au sein d'un environnement protéique, il est capable de persister pendant plusieurs mois dans la viande, la graisse, les carcasses et dans de nombreux produits dérivés du porc. De la viande de porc est d'ailleurs régulièrement testée positive à l'ASFV, notamment en Russie et en Lettonie (55). Par conséquent, l'alimentation à base d'eaux grasses et de déchets de cuisine, pratique courante dans de nombreux élevages traditionnels (porcs en liberté et dans les élevages familiaux au sein des basse-cours), joue un rôle important dans la transmission du virus. Cependant, l'infection semble moins permissive par ingestion que par inhalation (56). La transmission indirecte, par les objets contaminés (véhicules, vêtements, matériel, …) semble être la première voie d'introduction du virus au

sein des élevages (57). Ces facteurs liés à l'homme pourraient expliquer les contaminations sur de très longues distances (Belgique, Chine, Haïti, …).

Au début de l'épidémie actuelle, de 2007 à 2014, les principaux cas d'infection avaient lieu au sein de petits élevages de porcs domestiques, avec de temps en temps des débordements accidentels dans les populations de sangliers (58). Cependant, à partir de 2014 et après l'émergence de la PPA en Pologne et dans les Pays Baltes, la situation épidémiologique de la PPA a changé et l'écrasante majorité des cas d'infection en Europe sont maintenant liés aux sangliers. L'interface de transmission porcs-sangliers a lieu au sein de petits élevages sans règle de biosécurité ou dans des élevages traditionnels avec des porcs en liberté. Chez les sangliers, la transmission peut avoir lieu par contact direct entre congénères sains et infectés, mais aussi via leur environnement (carcasses, …) (59).

3. Pathogenèse

Il existe plusieurs formes de la maladie avec des signes cliniques très divers qui dépendent notamment de différents facteurs : souches virales, hôtes infectés, terrain ou infections expérimentales, doses et voies d'inoculation (60). Les souches les plus virulentes induisent une forme aigüe (fièvre hémorragique) avec près de 100% de mortalité chez les porcs et les sangliers. Les souches modérément virulentes et non virulentes quant à elles, provoquent respectivement des formes subaigües avec une mortalité plus faible (30-70%) et des formes chroniques (61).

Chez le porc domestique, les premiers signes cliniques sont observés 4 à 5 jours post-infection. Les formes virulentes entrainent tout d'abord une forte fièvre (40-42°C), une anorexie et une léthargie. Au fil de l'infection, les porcs dépérissent, deviennent apathiques et de nombreuses lésions associées à des hémorragies apparaissent : érythème dermique, œdème pulmonaire, splénomégalie, ganglions lymphatiques congestionnés et hémorragiques, et divers autres signes, tous résumés dans le Tableau 1 (11).

Chez ses hôtes vertébrés, le virus se réplique dans les cellules du système phagocytaire mononucléé, principalement les macrophages et les monocytes. Une virémie est détectée dès 8h post-infection, avec un titre viral allant jusqu'à 10^9 $TCID_{50}$/mL (*tissue culture infectious dose*)

dans le sang, la rate et dans les organes lymphoïdes, tandis le virus est retrouvé dans une grande partie des organes (60) à partir de 30h post-infection. Les isolats hemadsorbants sont associés aux érythrocytes dans le sang (62), ainsi qu'aux lymphocytes et aux neutrophiles. L'infection entraine une destruction des cellules endothéliales vasculaires, une thrombopénie ainsi qu'une lymphopénie. Ces derniers signes cliniques sont notamment induits par l'induction d'une apoptose massive des lymphocytes et des cellules du système phagocytaire mononucléé dans le sang et dans les organes lymphoïdes, aboutissant à une immunodéficience (63, 64). La destruction des macrophages a un rôle clé dans la pathogenèse, et induit notamment la libération de cytokines pro-inflammatoires et des facteurs du complément, aboutissant à une tempête cytokinique responsable de nombreux symptômes de cette fièvre hémorragique. La mort survient généralement une semaine après l'apparition des premiers symptômes. Les sangliers ont la même sensibilité à l'infection que les porcs, avec des signes cliniques tout à fait semblables lors d'infections expérimentales (60).

Les souches peu virulentes peuvent induire une forme chronique de la PPA, caractérisée par l'absence de lésion vasculaire mais avec une inflammation des articulations, des signes respiratoires et des avortements (65).

Tableau 1 : Les différents signes cliniques et lésions selon la virulence.

	PPA AIGÜE	PPA SUBAIGÜE	PPA CHRONIQUE
Fièvre	Haute	Modérée	Absente/irrégulière
Thrombopénie	Absente/faible	Transitoire	Absente
Peau	Érythème	Érythème	Nécrose
Nœuds lymphatiques	Gastro-hépatique + rénal + mésentériques, aspect marbré	La plupart des ganglions ressemblent à un caillot de sang	Inflammés
Rate	Splénomégalie	Splénomégalie partielle	
Reins	Hémorragies pétéchiales	Hémorragies pétéchiales	
Poumons	Œdème alvéolaire		Pleurésie et pneumonie
Vésicule biliaire	Hémorragies pétéchiales	Œdème dans la paroi	
Cœur	Hémorragies	Hémorragies	Péricardite
Reproduction		Avortements	Avortements

Modifié à partir de Sánchez-Vizcaíno et al., 2015 (61).

4. Le virus de la PPA

a. Classification

L'ASFV est un large virus avec un génome à ADNdb. Il appartient à l'ordre des *Megavirales*, à la famille des *Asfarviridae* (*African swine fever and related viruses)* et au genre *Asfivirus.* Selon la classification de l'ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses)*, il est à ce jour le seul représentant de sa famille (66). L'ASFV fait partie de la « super famille » des NCDLV (*nucleocytoplasmic large DNA viruses*), un groupe de virus se caractérisant par un grand génome à ADNdb et une réplication nucléocytoplasmique. Il est composé de différentes familles telles que les *Poxviridae*, les *Iridoviridae*, les *Phycodnaviridae* et les *Mimiviridae* (67).

Le génome de l'ASFV semble partager certaines ressemblances avec des virus géants infectant les amibes, comme les *Pacmanvirus* (68), les *Faustovirus* (69) ou les *Kaumoebavirus* (70). En effet, trente-cinq gènes sont conservés entre les *Pacmanvirus*, les *Faustovirus* et les *Asfavirus*, suggérant ainsi qu'ils partagent un ancêtre commun (Figure 7). En 2020, un nouveau virus décimant les ormeaux (des mollusques gastropodes) a été identifié (71). Provisoirement appelé *Abalone asfar-like virus* (AbALV), ce virus semble partager des similitudes avec l'ASFV. En effet, sur les trois-cent-neuf cadres ouverts de lecture prédits, quarante-huit sont homologues à ceux de l'ASFV. De plus, ces deux virus partagent 33,97% d'identité entre leurs séquences en acides aminés et des ressemblances structurales (72). Ces virus nouvellement identifiés n'ont pas encore été classés dans des familles virales par l'ICTV.

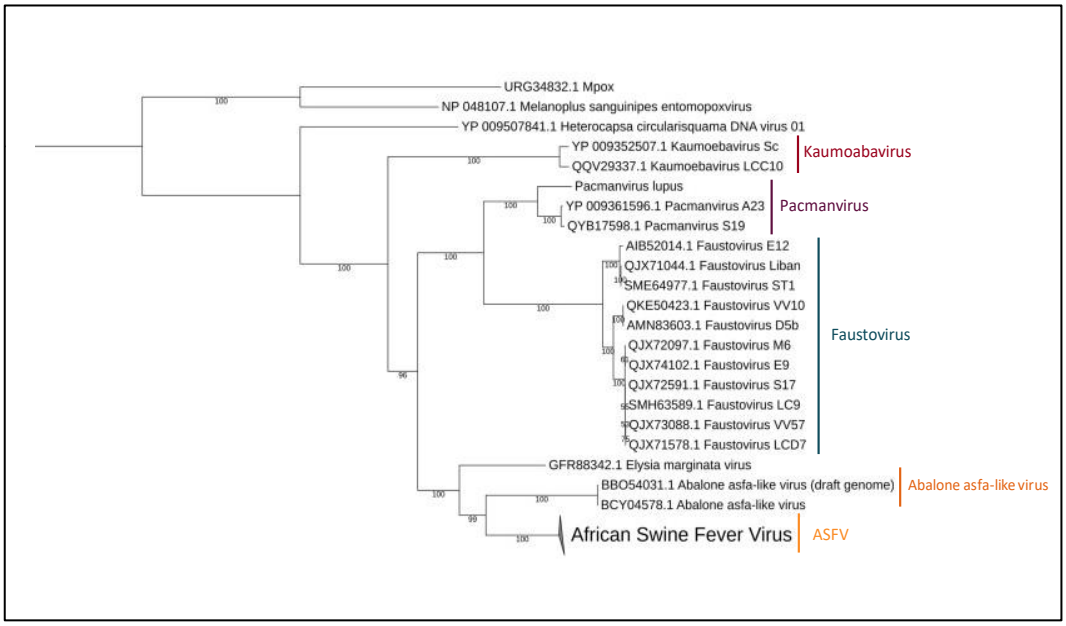


Figure 7: Arbre phylogénétique des *Asfarviridae*.

Figure adaptée à partir de Hannat et al., 2023 (73).

b. Génotypage

Il existe vingt-quatre génotypes décrits pour l'ASFV (Figure 8). Tous les génotypes sont présents en Afrique (6). En Europe, le génotype I est présent uniquement en Sardaigne, tandis que les souches responsables de la panzootie actuelle appartiennent au génotype II. Ce dernier est donc particulièrement présent en Europe et en Asie. Les différents génotypes se distinguent par la séquence primaire de leur protéine majeure de capside p72, codée par le gène B646L (49). Bien que simple et rapide, ce génotypage des isolats a été remis en question, car il ne permet pas de distinguer des souches de différentes virulences ou des souches possédant des délétions. De plus, le nombre de différences de nucléotides entre des génotypes étroitement apparentés peut être faible (74). Cependant, une analyse de certaines régions du génome a permis d'identifier différents variants génétiques dans des isolats apparentés au sein du génotype II. Ainsi, la résolution génotypique pourrait être améliorée par l'évaluation combinée des gènes p54 (E183L), p30 (CP204L) et B602L (75). Pour l'instant, dix-sept souches de génotype II ont été entièrement séquencées. La comparaison de ces isolats a montré que tous ces génomes avaient 99,9 % d'identité au sein du génotype II. Quant

aux sérotypes, huit ont été décrits à ce jour, en se basant sur la séquence de la protéine virale CD2v (*viral hemagglutinins CD2-like protein*), une des protéines d'enveloppe.



Figure 8: Arbre phylogénétique représentant les différents génotypes de l'ASFV.

Analyse phylogénétique en fonction de la séquence du gène codant la protéine p72. Issue de Li et al., 2022 (75).

c. Structure

La particule virale mature de l'ASFV mesure en moyenne 200 nm de diamètre (Figure 9) (76), bien que des techniques de cryo-microscopie électroniques aient permis de mesurer des particules virales de la souche chinoise de 260 à 300nm de diamètre (77). Le virion est constitué de quatre couches concentriques : un core interne contenant le nucléoïde, une membrane interne, une capside à symétrie icosaédrique et une enveloppe lipidique externe (Figure 10). Le virion contient plus de soixante-huit protéines : des protéines de structure, des enzymes et facteurs nécessaires notamment à la transcription des ARN, des protéines impliquées dans les voies de réparation de l'ADN, dans les modifications post-traductionnelles, ainsi que dans l'échappement à la réponse immune de l'hôte. Un certain nombre de protéines de la cellule hôte liées au cytosquelette (béta-actine et béta-tubuline)

mais aussi à la membrane plasmique ont aussi été identifiées. Ces dernières seraient probablement recrutées lors du bourgeonnement du virus à la membrane plasmique de la cellule (78).

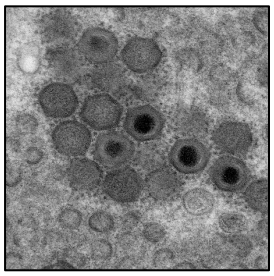


Figure 9: Visualisation de virions d'ASFV en microscopie électronique

Issue de Dixon et al., 2019 (29).

L'enveloppe lipidique externe est présente dans la forme extra-cellulaire du virion et n'est pas nécessaire à l'infection. Elle s'acquiert lors du bourgeonnement du virion à la membrane plasmique de la cellule, avec laquelle elle partage des similarités (79). Les protéines p24 (pkP177R), CD2v (pE404R), et p12 (p061R) sont localisées dans cette enveloppe. La protéine virale p12 est localisée au niveau de la face externe de cette membrane, cependant elle a aussi été décrite comme étant présente dans la membrane interne (76). Elle participe à l'attachement du virus à ses cellules hôtes en se liant avec ses récepteurs (80). La protéine CD2v (pE404R) est un homologue viral de la protéine d'adhésion cellulaire CD2 (81), elle a un rôle dans l'hémagglutination et permet de différencier les huit sérotypes du virus.

La capside présente une symétrie icosaédrique. Elle est composée d'environ deux mille capsomères, avec une forme de prisme hexagonal percé (82). La protéine p72, codée par le gène B646L, est la protéine majeure de capside et correspond à un tiers de la masse totale du virion (83). Les vingt-quatre génotypes de l'ASFV sont distingués sur son gène. La capside est aussi composée des protéines M1249L, p17, p49 (B438L), p120R et H240R (77).

La membrane interne est une membrane lipidique dérivée de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) (84). Cette membrane contient les protéines p54 (pE183L), p17 (D117L), and pE248R, ainsi que la protéine p12 initialement présumée localisée exclusivement dans la membrane externe. p17 est notamment une protéine essentielle et nécessaire à la morphogenèse dont l'assemblage de la capside (85).

Le core est composé de deux polyprotéines, ainsi que de l'enzyme pS273R. La première polyprotéine, la p220 (pCP2475L), est clivée en quatre protéines structurales : p150, p37, p14 et p34 (86). La seconde, p62 (pCP530R), est découpée en deux protéines : p35 et p15 (87). Ces polyprotéines sont clivées par la protéase pS273R (88).

Enfin, le nucléoïde est une structure dense, contenant le génome viral associé à des protéines. Le nucléoïde contient les protéines et les enzymes nécessaires à la transcription précoce, dont les sous-unités de l'ARN polymérase, l'ADN polymérase, les enzymes de coiffe et les facteurs de la transcription précoce. La protéine p10 (pA78R) et l'histone-like pA104R (pE120R) sont notamment liées à l'ADN viral (76).

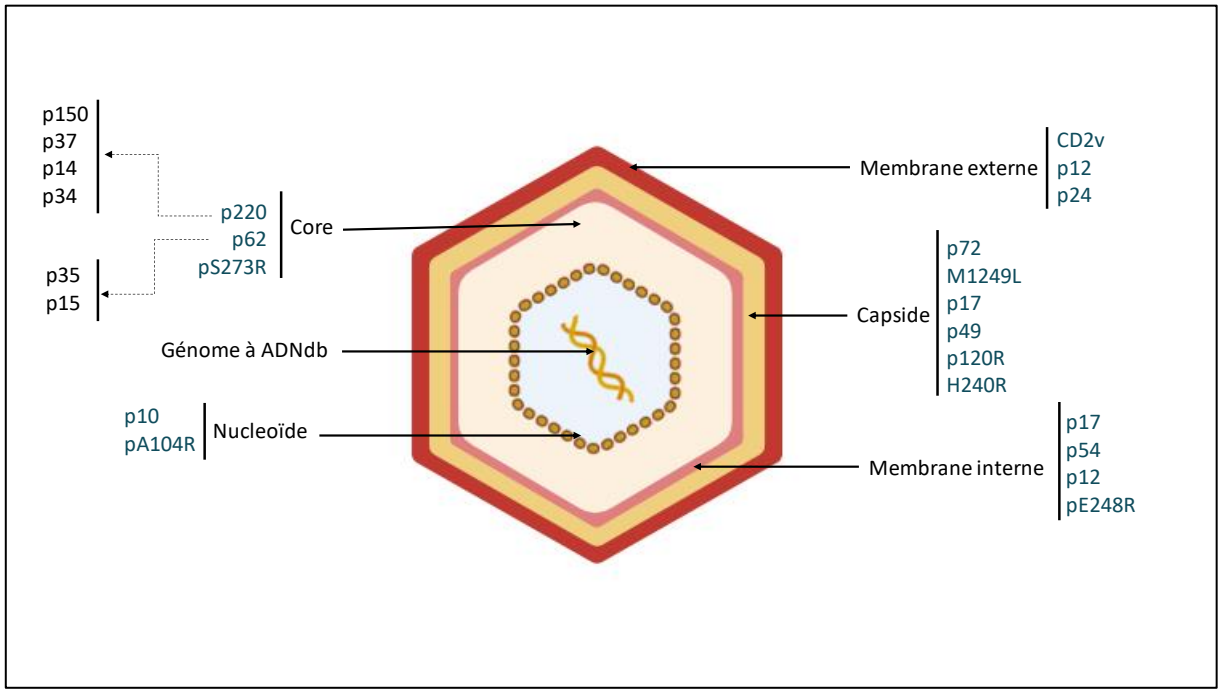


Figure 10 : Représentation de la structure de l'ASFV.

Inspirée de Salas et al., 2013 (76).

d. Organisation génomique

Le génome de l'ASFV a une taille comprise entre 170 et 193 kpb (kilo paires de bases) suivant les différents isolats et code environ 150 à 170 protéines (89). Cette variation de taille est principalement due à la perte ou au gain de gènes au sein de la famille des MGF (*Multigene*

families, famille des mutligènes) (Figure 11). D'autres légères différences de longueur sont dues au nombre de petites répétitions en tandem, présentes notamment dans les régions intergéniques (90). Par exemple, le nombre de copies des gènes de la famille des MGF360 peut ainsi varier entre onze et dix-huit suivant les différentes souches (89). Il existe cinq familles MGF différentes (MGF-100, -110, -300, -360 et -505/530), qui ont évolué par duplications de gènes par recombinaisons homologues (91). Les paralogues au sein d'une même famille de MGF peuvent avoir des séquences divergentes, indiquant une évolution de ces gènes sur une longue période. Ainsi, les recombinaisons homologues ont particulièrement contribué à la diversité génétique de l'ASFV (92).

Les extrémités du génome sont liées de façon covalente et forment une structure en épingle à cheveux. A chaque extrémité sont présentes des séquences répétées inversées. Des erreurs lors de la réplication peuvent par exemple résulter en une transposition de séquences d'une extrémité du génome à une autre. En effet, une souche estonienne présente une délétion de 14kpb (correspondant à vingt-six gènes) en 5'. Cette séquence délétée a été transposée vers l'extrémité 3' lors de l'une des étapes de la réplication du génome aboutissant à une atténuation de cette souche (93).

Le génome des ASFV est relativement compact, avec de courts espaces intergéniques. La transcription ayant lieu dans le cytoplasme, les gènes ne contiennent pas d'introns et il n'y donc pas d'étape d'épissage. Les cadres ouverts de lecture sont transcrits de manière séquentielle (transcriptions immédiate, précoce, intermédiaire et tardive) et sont sous le contrôle de promoteurs spécifiques correspondants.

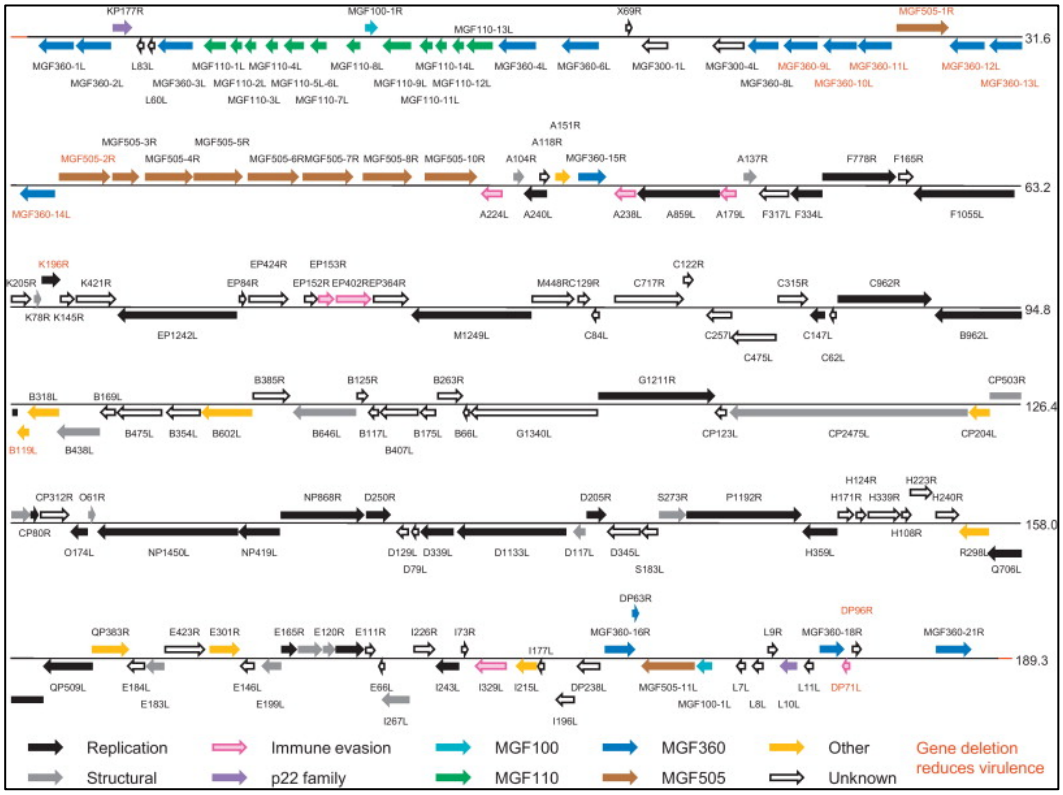


Figure 11: Organisation génomique de l'ASFV.

Issue de Dixon et al., 2013 (94). Représentation de la souche virulente Georgia 2007/1. Les différentes couleurs indiquent la fonction des différents ORFs (Open reading frame, cadres ouverts de lecture). En noir : ORFs codant pour des enzymes et facteurs impliqués dans la réplication, la réparation ou la transcription du génome. En gris : ORFs codant pour des protéines structurales. En rose : ORFs codant pour des protéines impliquées dans l'échappement à la réponse de l'hôte. En jaune : ORFs ayant diverses autres fonctions. En blanc : fonction inconnue. Les MGF sont en turquoise, bleu, vert, marron et violet. Écriture en orange : ORF dont la suppression induit une atténuation de la virulence du virus.

e. Cycle de réplication

Entrée virale

Les cellules cibles de l'ASFV chez les vertébrés sont principalement les macrophages et les monocytes, bien qu'il semblerait que d'autres types cellulaires puissent être infectés durant les stades plus avancés de la maladie (95). Des souches d'ASFV, comme la BA71v ou la Georgia 2007/1 (ASFV-G), ont pu être adaptées aux cellules Vero, permettant enfin d'avoir un modèle d'infection dans une lignée cellulaire, limitant notamment l'utilisation de macrophages primaires en contexte infectieux. Cependant, cette adaptation a causé de

nombreuses modifications génétiques de ces souches, ainsi que l'atténuation de leur virulence (96, 97).

Le récepteur d'entrée du virus reste à ce jour inconnu bien que le tropisme cellulaire semble suggérer un récepteur spécifique des macrophages. L'infection de macrophages de porcs par l'ASFV induit notamment l'expression du récepteur CD163 (*Cluster Differentiation 163*), un marqueur de la maturation des macrophages. L'utilisation d'anticorps dirigés contre celui-ci semble bloquer l'infection dans les macrophages alvéolaires (98). Cependant, il a été montré par la suite que des porcs n'exprimant pas CD163 (CD163-KO par CRISPR/CAS9) n'étaient pas forcément résistants face à l'ASFV (99). CD163 pourrait donc participer à l'infection sans pour autant être indispensable (91).

Différentes protéines virales sont impliquées dans l'attachement, dont la protéine p12, présente à la fois dans les membranes externe et interne du virion. En effet, l'utilisation de protéines p12 recombinantes permet d'inhiber la liaison du virion à sa cellule cible et d'inhiber l'infection *in vitro* (100). Les protéines virales p54 et p72 semblent aussi impliquées dans l'adsorption puisque l'utilisation d'anticorps neutralisants dirigés contre celles-ci bloque l'adsorption dans des macrophages (101).

L'entrée virale s'effectue par un mécanisme de macropinocytose (102) (Figure 12) et d'endocytose médiée par la clathrine et dépendante de la dynamine (103). L'endocytose correspond à une voie d'internalisation via les endosomes et est notamment dépendante de la température, et d'un pH bas. Le virus progresse ensuite au sein de la cellule en utilisant la voie endosomale. Au niveau des compartiments endosomaux matures, l'acidification (pH = 5) induit le désassemblage de la capside, ainsi que la fusion entre l'enveloppe virale interne et la membrane endosomale conduisant à la libération du core dans le cytoplasme (104). Cette fusion est dépendante des protéines virales pE199L et pE248R, localisées dans la membrane interne du virion (104, 105). Enfin, la voie ubiquitine-protéasome est impliquée dans la dégradation finale du core, permettant de libérer l'ADN viral dans le cytoplasme (106).

Réplication

Le cycle de réplication de l'ASFV semble principalement cytoplasmique bien que la présence d'ADN viral puisse être détectée dans le noyau à des temps très précoces post-infection (107). L'expression des gènes viraux a lieu en plusieurs étapes : transcriptions immédiate et précoce (avant le début de la réplication de l'ADN viral), puis intermédiaire et tardive (dépendant de la synthèse précoce des protéines virales). La réplication du génome, la morphogenèse, ainsi que probablement la transcription tardive et la traduction ont lieu au sein d'usines virales (108). Ces structures, sans organelles et entourées de membranes dérivées du réticulum endoplasmique, sont présentes en périphérie du noyau près du centre d'organisation des microtubules. Les virions y sont transportés grâce à leur protéine p54 qui se lie à la chaine légère de la dynéine, un moteur microtubulaire (109).

La réplication du génome viral commence entre 6 et 8 heures post-infection. Il a longtemps été convenu que la réplication de l'ASFV était uniquement cytoplasmique. Cependant, il a été montré qu'à des temps précoces d'infection, de l'ADN viral se retrouve dans le noyau (110). La protéine virale p37 semblerait être impliquée dans ce transport de l'ADN viral du cytoplasme vers le noyau tandis que sa localisation à proximité de la membrane nucléaire pourrait suggérer que celui-ci bourgeonne ensuite à travers la membrane nucléaire vers le cytoplasme. L'ASFV perturbe l'organisation nucléaire aboutissant à une présence de marqueurs de l'enveloppe nucléaire au sein du cytoplasme et une redistribution de certaines protéines nucléaires, avec notamment une dégradation de l'ARN polymérase II (111). Il semblerait alors que les génomes complets de l'ASFV soient formés dans les usines virales, en utilisant notamment des fragments synthétisés par le noyau (112).

La réplication cytoplasmique ressemble à celle des *Poxvirus*. Elle serait initiée par l'introduction d'une coupure simple brin à l'une des extrémités du génome viral. Le groupement OH en 3' servirait d'amorce pour l'ADN polymérase virale (G1211R) (94). Les protéines C962R et F1055L sont des primases et ont un rôle dans l'initiation de la réplication. La synthèse de l'ADN se poursuit vers les extrémités du génome grâce à la protéine E301R correspondant au clamp permettant la liaison entre la polymérase virale et le brin d'ADN en cours de transcription (113). Cela génère des concatémères correspondant à des

intermédiaires de réplication dans lequel les terminaisons du brin naissant et du brin modèle sont complémentaires et se replient pour former une structure en épingle à cheveux (110). La résolution de ces concatémères, permettant d'avoir un génome linéaire, serait permise par l'action de différentes protéines virales : une nucléase (EP364R), une exonucléase (D345L), une ligase (114) et une ADN topoisomérase de type II (P1192R), bien que le mécanisme exact ne soit pas encore décrit (94). Le génome nouvellement formé est encapsidé et emballé au sein d'un nouveau virion.

La réplication virale au sein des macrophages constitue un défi pour l'ASFV. En effet, ces cellules produisent différents facteurs de la famille des ROS (*reactive oxygen species,* espèces réactives de l'oxygènes) lorsqu'elles sont infectées (115). Ces ROS impliquées dans le déclenchement du stress oxydatif, induisent un environnement très oxydant et défavorable à la réplication (116). Ces facteurs peuvent induire des dommages à l'ADN, des mutations et ainsi altérer la réplication virale (117). Pour maintenir l'intégrité de son génome, l'ASFV utilise notamment la voie de réparation par excision de base de l'ADN. Pour cela, il code pour des enzymes nécessaires comme une ADN polymérase X (O174L), une ADN ligase (NP419L), ainsi qu'une endonucléase (E296R) (118). Enfin, la protéine A238L est par ailleurs capable d'inhiber la génération de ROS lors de l'infection virale (119).

Transcription et traduction

La transcription précoce a lieu entre 4 et 6h post-infection, avant la réplication du génome. Elle utilise des enzymes directement présentes au sein du core, indépendamment des enzymes cellulaires. Les promoteurs sont localisés juste en amont des cadres ouverts de lectures. Les séquences promotrices sont courtes et riches en AT (120). Elles sont reconnues par des facteurs de transcription spécifiques des différents stades (précoces, intermédiaires, tardifs) (94) comme la protéine TBP-like (*TATA-binding protein*) B263R.

L'ASFV code plusieurs sous-unités d'ARN polymérase virale (EP1242L, C147L, NP1450L, H359L, D205R, CP80R, D339L), mais aussi des facteurs de transcription (C315R, G1340L, I243L, B175L, B385R) et d'élongation (I243L) (67). La transcription ayant lieu dans le cytoplasme, les gènes ne contiennent pas d'introns et il n'y a donc pas d'étape d'épissage. Les ARNm sont

modifiés par l'ajout d'une coiffe en 5' et d'une queue polyadénylée en 3'. Pour coiffer les ARNm, l'ASFV code une guanylate transférase (pNP868R) comprenant trois domaines fonctionnels : triphosphatase (TPase), guanosyltransférase (GTase) et méthyltransférase (MTase) (121). L'ASFV est aussi capable d'induire la dégradation des ARNm cellulaires et de réguler les transcrits viraux, grâce à l'action de sa protéine g5R (D250R) exprimée précocement lors de l'infection et qui agit en hydrolysant les coiffes des ARNm (122). Quant à la polyadénylation, elle est catalysée par l'enzyme C475L (67). Les transcriptions intermédiaires et tardives commencent entre 8 à 16h post-infection. Elles permettent notamment la synthèse des protéines structurales nécessaires à la formation de nouveaux virions.

L'ASFV détourne la machinerie traductionnelle de la cellule pour synthétiser ses propres protéines. Au cours de l'infection, la synthèse des protéines cellulaires est inhibée afin que les protéines virales soient exprimées (121). L'ASFV détourne des facteurs d'initiation cellulaires comme eIF2, eIF4F, eIF4G et eIF4E. Par exemple, la protéine virale DP71L est capable de se lier au facteur eIF2α de l'hôte, aboutissant à sa déphosphorylation restaurant ainsi la synthèse protéique (123).

Assemblage et libération

La morphogenèse du virion a lieu au sein des usines virales avec l'accumulation d'intermédiaires d'assemblage de membranes qui proviendraient du réticulum endoplasmique (124, 125). Le dépôt des protéines de capside et du core sur les faces de ces membranes, permet aux intermédiaires d'assemblage de prendre une forme icosaédrique (108). L'usine virale est entourée d'une « cage » constituée de filaments intermédiaires de vimentine. Cela permet d'empêcher la détection des composants viraux par les senseurs cytoplasmiques et de concentrer les protéines structurales sur les sites d'assemblage (126). Après le clivage des polyprotéines pp220 et pp62, la dernière étape consiste en l'encapsidation de l'ADN viral. Les virions nouvellement formés quittent l'usine virale et sont transportés en direction de la membrane plasmique par la kinésine (127) grâce à la protéine virale E120R (128). Au niveau de la membrane plasmique, les virions bourgeonnent et se

recouvrent ainsi de l'enveloppe externe (129). Le cycle complet de réplication de l'entrée du virion jusqu'au bourgeonnement des particules virales matures dure 24 heures (130).

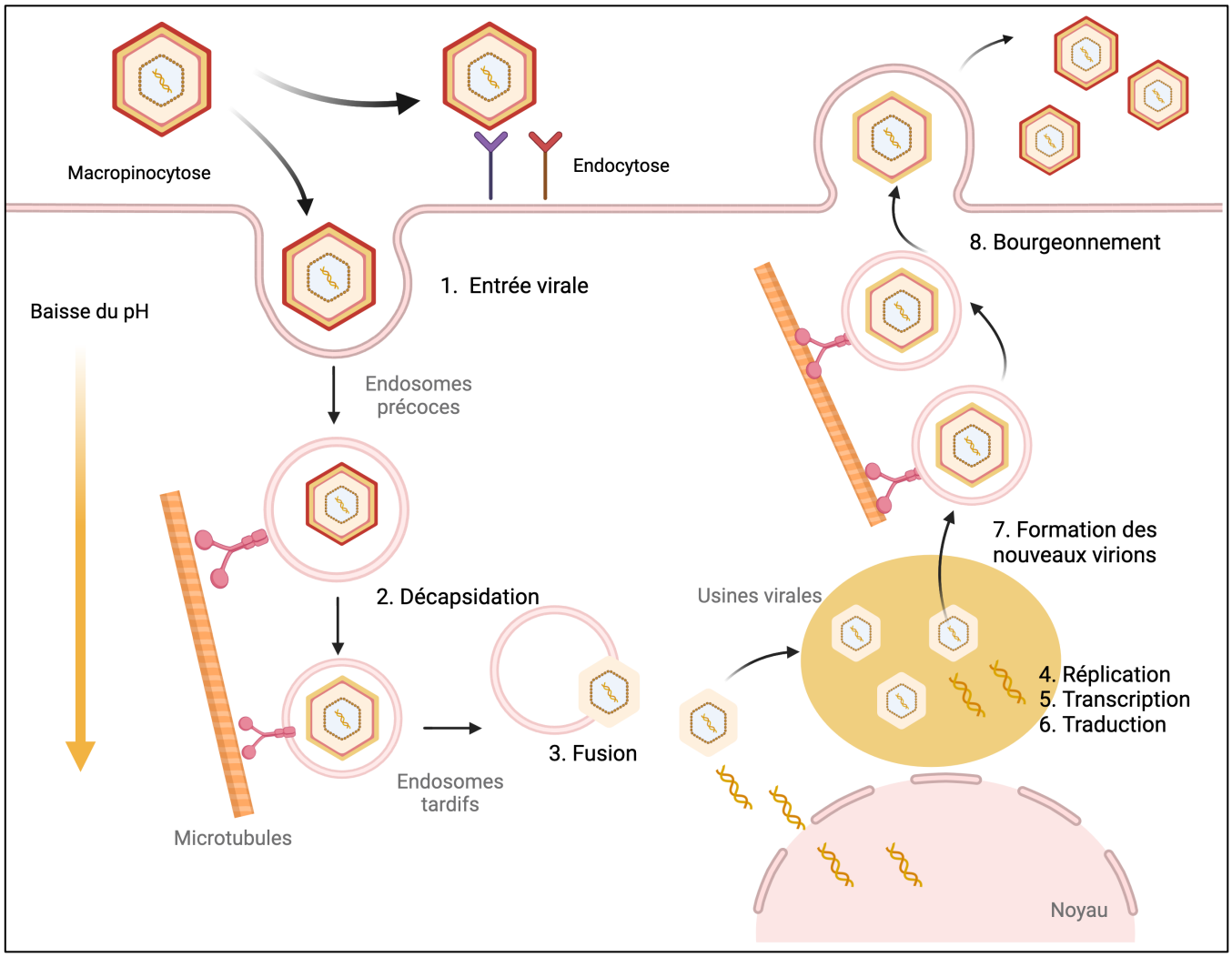


Figure 12: Cycle de réplication de l'ASFV.

Figure inspirée de Duan et al., 2022 (121) et créée avec Biorender.

5. Approches vaccinales

Il n'existe à ce jour ni vaccin ni traitement efficace pour lutter contre la PPA. Les mesures sanitaires sont les seuls moyens de contrôler la propagation de l'épidémie. La conception d'un vaccin est donc un enjeu crucial et de nombreuses équipes de recherche s'attèlent à mettre au point des approches vaccinales contre l'ASFV. Cependant, de nombreuses contraintes se

dressent face à la commercialisation d'un vaccin PPA : sécurité du vaccin, induction d'une protection croisée, absence de modèles animaux appropriés (autres que les porcs), vaccination de la faune sauvage et manque de lignées cellulaires permissives pour sa production.

Une particularité particulièrement importante pour un vaccin PPA serait qu'il soit DIVA (*Differentiating infected from vaccinated animals*), permettant ainsi la distinction entre animaux vaccinés et infectés. Cette stratégie DIVA est particulièrement intéressante pour le contrôle réglementé de cette maladie déjà présente dans de nombreux pays.

a. Vaccins inactivés

Les vaccins faits à partir de virus inactivés sont particulièrement reconnus pour leur sûreté. En effet, le processus d'inactivation du virus ne permet pas la réversion vers un phénotype virulent et les souches vaccinales inactivées ne peuvent être à leur tour transmises. Le principal problème est que les vaccins inactivés sont peu immunogènes et n'induisent donc pas forcément une bonne immunité protectrice. Les différents essais de vaccins inactivés contre l'ASFV se sont heurtés à ces écueils, n'induisant pas une immunogénicité suffisante malgré l'utilisation de nombreux adjuvants (131), ni une protection contre les challenges (132). Les vaccins inactivés sont censés induire des anticorps inhibant l'infection des cellules. Or, les anticorps neutralisants produits en réponse à l'infection par l'ASFV ne sont pas capables d'inhiber complètement cette infection. Cela pourrait être dû au fait que la particule virale existe sous deux formes infectieuses (extracellulaire et intracellulaire). Une autre raison pourrait être la présence de très nombreuses protéines de surface au sein de la particule virale, qui implique que les anticorps neutralisant devraient être dirigés contre toutes ces nombreuses protéines pour être efficaces (29).

b. Vaccins sous-unitaires, à ADN et vectorisés

Les vaccins sous-unitaires, à ADN et vectorisés utilisent des protéines recombinantes ou des peptides codant pour certains épitopes du virus capables d'induire une réponse immunitaire protectrice. Ils ont l'avantage d'être facilement DIVA (133). L'ASFV possédant de très nombreuses protéines, la difficulté réside en la sélection des antigènes capables d'induire une protection afin de les incorporer au sein de ce type de vaccins. Les protéines structurales p30, p54, p72, pp62 et CD2v ont été les principales cibles des stratégies de ces types de vaccination, individuellement ou sous forme de cocktails avec de multiples cibles antigéniques (134).

L'utilisation des protéines p54 et p30 recombinantes exprimées dans un système baculovirus confère une certaine protection contre un challenge avec la souche E75 (135), tandis que la combinaison de p54 / p30 / p72 exprimées de la même façon ne protège pas contre la souche Pr4 (136). Les anticorps neutralisants induits par ces protéines ne semblent ainsi pas suffisants pour induire une protection. Pourtant, la protéine CD2v exprimée aussi en système baculovirus induit une protection contre un challenge, en l'absence d'anticorps neutralisants (137), montrant ainsi l'importance d'autres facteurs comme l'immunité cellulaire.

Les vaccins à ADN pourraient être intéressants puisqu'ils peuvent induire une immunité cellulaire via les lymphocytes T (LT) cytotoxiques. Cette réponse semble particulièrement importante, puisque des porcs déplétés en LT CD8+ et immunisés avec une souche atténuée ne sont pas protégés contre un challenge avec une souche virulente, tandis que des porcs non déplétés en LT CD8+ sont protégés (138). Cependant les différents essais de vaccins à ADN ne semblent pas concluants. L'utilisation de plasmides codant les protéines p54 et p30 n'induit ni anticorps neutralisants ni réponse cellulaire (139), tandis que les porcs immunisés avec un vaccin à ADN codant pour une protéine chimérique entre le SLA-II (*swine leukocyte antigen,* antigène de leucocyte de porc) et p54/p30 produisent des anticorps mais aussi une réponse T, sans pour autant être protégés contre un challenge (140).

L'utilisation de vecteurs viraux est une autre stratégie pour induire des réponses humorales et cellulaires. Différents vecteurs ont été évalués chez le porc. Par exemple, deux

vaccins composés d'un cocktail d'adénovirus contenant les gènes p30 + p54 + p72 + pp62 pour l'un (141) et A151R + B119L + B602L + EP402R + B438L + K205R + A104R pour l'autre (142) induisent une bonne réponse humorale et cellulaire, sans qu'un challenge n'ait été testé. D'autres vecteurs ont été expérimentés, en utilisant par exemple des Poxvirus (143), sans succès à ce jour.

c. Vaccins vivants atténués

Les vaccins vivants atténués peuvent mimer l'infection naturelle en se répliquant dans la cellule hôte, induisant des immunités humorales et cellulaires sans avoir à utiliser de quelconques adjuvants. Des précautions doivent cependant être prises en utilisant ces vaccins, car ils sont moins sûrs que les vaccins inactivés ou sous-unitaires. En effet, les vaccins vivants ont un risque de retour à la virulence et sont plus difficiles à rendre DIVA. Ils pourraient aussi se transmettre entre animaux, ou avoir des effets secondaires. Les vaccins vivants peuvent être obtenus de différentes façons : à partir de souches naturellement atténuées, de souches virulentes atténuées via de nombreux passages de cellules en cellules, ou atténuées directement via la délétion de gènes de virulence.

Plusieurs souches naturellement atténuées ont été isolées chez des animaux infectés. La souche OURT88/3 isolée chez une tique *Ornithodoros erraticus* au Portugal et la souche NH/P68 isolée à partir d'un porc chroniquement infecté sont du génotype I. Tandis que la souche Lv17/WB/Rie1, isolée en Lettonie (144) et dérivée d'une souche virulente d'origine géorgienne appartient au génotype II. L'utilisation de ces diverses souches en tant que vaccin est relativement efficace, mais il ne semble pas y avoir de protection croisée entre ces souches. Certains animaux semblent aussi développer une forme chronique de la maladie (145, 146). Enfin, quelques souches trop atténuées ne sont plus immunogènes et d'autres retrouvent leur virulence (147, 148).

Une souche vaccinale vivante doit être sûre, c'est-à-dire suffisamment atténuée pour ne pas induire de symptômes ni de retour à la virulence, tout en gardant une certaine aptitude à se répliquer pour être immunogène. Or, l'une des difficultés rencontrées avec l'ASFV est que la délétion d'un même gène ne conduit pas toujours au même niveau d'atténuation et n'induit

pas forcément la même protection en fonction des souches utilisées (149). Par exemple, la délétion du gène DP148R atténue la souche Benin 97/1 du génotype I (150) alors que cette même délétion n'impact pas la virulence de la souche Georgia 2007 du génotype II (151).

L'un des principaux problèmes concernant la production de souches vaccinales est le manque de lignées cellulaires essentielles à la production à grande échelle du vaccin, car ce virus se réplique essentiellement en cellules primaires telles que les macrophages alvéolaires porcins. Il est pourtant impossible d'utiliser ce type cellulaire en raison de la grande variabilité des lots, de la difficulté à les extraire et bien sûr du bien-être animal car ce sont des cellules qui sont récupérées directement au sein de poumons de porcs (152). Afin de palier à ce problème, des souches d'ASFV ont été adaptées à des lignées cellulaires telles que les Vero ou les HEK-293T. Malheureusement, ces souches adaptées se sont révélées trop atténuées et peu immunogènes pour induire une quelconque protection chez les porcs (96, 153). Cependant, plusieurs souches à potentiel vaccinal ont récemment été montrées comme capables de se répliquer dans de nouvelles lignées cellulaires. Par exemple, la souche Georgia 2010 délétée du gène I177L (ASFV-G-ΔI177L/ΔLVR) se réplique efficacement dans une nouvelle lignée cellulaire porcine appelée PIPEC *(Plum Island porcine epithelial cells)* (154).

Il existe des dizaines de souches délétées artificiellement de certains gènes de virulence, induisant l'atténuation de la souche (Tableau 2). Ces délétions peuvent être acquises de façon empirique par de nombreux passages sur cellules ou être induites par génie génétique. Il peut y avoir des délétions d'un unique gène, comme la délétion du gène A137R au sein de la souche Georgia 2007/1 (155) ou de plusieurs gènes comme la souche chinoise SY18 délétées des gènes L7L, L8L, L9R, L10L et L11L (156). Ces délétions induisent bien souvent des atténuations des souches initialement virulentes sans pour autant induire une protection chez les porcs après un challenge avec la souche parentale. Par exemple, la souche Georgia 2010 délétée du gène TK induit une bonne atténuation de la souche *in vitro*, avec notamment une diminution de la réplication, et ne suscite aucun symptôme lors de la primo infection *in vivo*. Pourtant, cette souche n'entraine pas de protection des porcs face un challenge avec la souche parentale (157).

De façon contrintuitive, accumuler les délétions de ces gènes de virulence n'induit pas forcément une meilleure atténuation de la souche ou plus de protection chez les porcs. Par

exemple, la délétion du gène 9GL entraine une bonne atténuation au sein des souches Malawi Lil-20/1 (158) et Pretoriuskop/96/4 (159), tandis que la même délétion au sein de la souche Georgia 2010 n'induit qu'une atténuation partielle (160). Afin d'essayer d'augmenter cette atténuation, la délétion du gène 9GL a été jumelée avec la délétion de plusieurs gènes issus des MGF. Cela a abouti à une diminution de la réplication de la souche tout en perdant tout effet protecteur chez les porcs (161). Pourtant, la délétion des MGF a déjà été décrite comme pertinente puisqu'elle permet une bonne protection des porcs face à un challenge avec la souche parentale (162). Cela pourrait s'expliquer par une trop grande atténuation de la souche, faisant qu'elle ne soit plus suffisamment immunogène. Au contraire, la délétion de ce même gène 9GL cumulée avec la délétion du gène DP96R (=UK) induit une meilleure atténuation ainsi qu'une protection des porcs (163), tandis que la délétion de DP96R seul n'entraine pas d'atténuation de la souche Georgia 2007/1 (164).

Jusqu'à très récemment, il existait de nombreux candidats vaccins sans qu'aucun ne soit commercialisé. Pourtant, en juin 2022 les autorités vietnamiennes ont annoncé avoir autorisé la mise sur le marché d'un premier vaccin contre la PPA. Cependant, l'expérimentation sur le terrain de ce vaccin a rapidement été suspendue à cause d'un problème de sureté. Il semblait en effet y avoir une surmortalité des porcs lors de la vaccination sur le terrain, probablement en raison de la présence de porcs déjà malades de PPA avant la vaccination. Ce potentiel vaccin vivant atténué correspond à la souche Georgia 2007 délétée du gène I177L (ASFV-G-ΔI177L). Il semble pourtant induire une protection efficace chez les porcs challengés avec la souche parentale (165) mais aussi avec plusieurs souches du génotype II circulant à la fois en Europe et au Vietnam (166). Il est aussi efficace après une administration par voie intramusculaire ou oro-nasale, ce qui est particulièrement important dans les stratégies de vaccination de la faune sauvage (sangliers) (167). Il serait stable génétiquement (168) et sûr sur le long terme (169).

Une autre souche délétée de ce même gène ainsi que des gènes EP402R, CD2v, MGF360-12L, MGF360-14L au sein de la souche chinoise GZ201801 induit une bonne atténuation ainsi qu'une protection chez les porcs (170). Cependant, la fonction du gène I177L reste à ce jour inconnue, il serait donc particulièrement intéressant de l'étudier afin de comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de cette atténuation.

Tableau 2: Créations de souches atténuées d'ASFV afin de créer des vaccins vivants.

Nom du gène délété au sein de la souche parentale, nom de la souche du challenge, ainsi que potentielle protection chez le porc.

Gène délété	Fonction	Souche parentale	Souche du challenge	Protection ?	Référence
I177L	Inconnue	Georgia 2007/1	Georgia 2007/1	Oui	(165, 167)
9GL = B119L	Inconnue	Georgia 2007/1	Georgia 2007/1	Partielle	(171)
	Inconnue	Malawi Lil-20/1	Malawi Lil-20/1	Oui	(172)
A137R	Inhibition voie IFN	Georgia 2007/1	Georgia 2007/1	Oui	(155)
DP71L	Phosphatase	Malawi Lil-20/1 Pr/96/4	/	Non	(173)
MGF505-1R-2R-3R / MGF360-12L-13L-14L	Inhibition voie IFN	Georgia 2007/1	Georgia 2007/1	Oui	(171)
I226R	Inhibition voie IFN	SY18	SY18	Oui	(174)
L7L-L8L-L10L-L11L	Inconnue	SY18	SY18	Oui	(156)
MGF505-1R/2R/3R-MGF360-12L/13/14L-EP402R	Inhibition voie IFN / Hemadsorption	HLJ/18	HLJ/18	Oui	(175)
DP96R / DP71L / 9GL	Inhibition voie IFN / Inconnue	Georgia 2007/1	/	Non	(164)
EP402R (=Cd2v)	Hemadsorption	Ba71V	Ba71V/E75/Georgia2007	Oui	(176)
		Georgia2010	Georgia 2010	Non	(177)
DP148R	Inconnue	Benin 97/1	Benin 97/1	Oui	(150)
9GL / DP96R	Inconnue / Inhibition voie IFN	Georgia 2007/1	Georgia 2007/1	Oui	(163)
MGF505-1R-2R-3R / MGF360-10L-11L-12L-13L-14L	Inhibition voie IFN	Benin 97/1	Benin 97/1	Oui	(178)
A238L	Régulateur NFAT	NH/P68	L60	Oui	(147)
		NH/P68	Armenia07	Non	(147)
EP153R	Inhibe apoptose	NH/P68	L60	Oui	(147)
		NH/P68	Armenia07	Non	(147)
A276R	Inhibition voie IFN	NH/P68	Armenia07	Non	(147)
E184L	Inhibition voie IFN	Georgia 2010	Georgia 2010	Oui	(179)
TK	Thymidine kinase	Georgia2007 adaptée aux Vero	Georgia 2007/1 adaptée aux Vero	Non	(157)
I177L, EP402R, CD2v, MGF360-12L, MGF360-14L	Inconnue / inhibition voie IFN	GZ201801	GZ201801	Oui	(170)
9GL, MGF360-12L, -13L, -14L, MGF505-1R, -2R, -3R	Inconnue / Inhibition voie IFN	Georgia 2007/1	Georgia 2007/1	Non	(161)
9GL, EP153R, EP402R		Georgia 2007/1	Georgia 2007/1	Non	(180)
A224L	Inhibition apoptose	NH/P68	L60	Oui	(147)
		NH/P68	Armenia07	Partielle	(147)

II. La réponse antivirale en réponse à l'infection par l'ASFV

1. Réponse IFN-I

L'immunité innée est la première ligne de défense contre une infection virale. Elle permet la mise en place d'un état antiviral dans les phases précoces de l'infection mais aussi de préparer une réponse immune adaptative efficace. Elle est basée sur plusieurs mécanismes constitutifs ou inductibles. L'immunité innée repose sur la reconnaissance de motifs moléculaires spécifiques, les PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*), par des récepteurs membranaires ou des senseurs cytoplasmiques, les PRRs (*pattern recognition receptors*). Cette reconnaissance aboutit notamment à une synthèse de glycoprotéines immunomodulatrices : les IFN-I (IFN-α/β), qui vont eux même permettre d'amplifier cette réponse et d'induire la production d'ISG (*Interferon stimulated genes*) permettant d'établir un véritable état antiviral dans la cellule.

Il existe plusieurs types de PRRs capables de reconnaitre des motifs peptidiques et nucléiques particuliers. Cependant, les PRRs impliqués dans la détection de l'ASFV ne sont que partiellement caractérisés à ce jour. Parmi eux, cGAS *(Cyclic GMP-AMP synthase)* semble être le principal senseur permettant de détecter l'infection par l'ASFV, ou du moins le plus étudié (181).

La réponse à l'infection par l'ASFV décrite ici correspond à l'immunité antivirale mise en place chez le porc. La réponse immunitaire chez le sanglier semble tout à fait semblable (182). Cependant très peu de données existent sur la réponse immunitaire induite en réponse à l'infection par l'ASFV chez les suidés sauvages africains. De même, la réponse immunitaire induite spécifiquement à l'infection par l'ASFV chez la tique *Ornithodoros* n'a pas encore été étudiée.

a. La voie cGAS-STING

La voie cGAS-STING permet notamment la production d'IFN-I et de cytokines pro-inflammatoires. cGAS est un senseur capable de détecter les ADNdb de plus de 40pb, qu'ils soient d'origines pathogènes, génomiques ou mitochondriales. Classiquement décrit comme reconnaissant uniquement l'ADN au sein du cytoplasme, il a récemment été montré que cGAS est finalement particulièrement exprimé dans le noyau où il réside constitutivement, séquestré au sein de la chromatine (183). Il n'est pas encore connu si cGAS reconnait le génome de l'ASFV au sein des usines virales ou dans le noyau où les premières étapes de réplication semblent avoir lieu (184). Il a d'ailleurs déjà été décrit que cGAS est capable de détecter certains virus comme le VIH-2 dans le noyau (185). De nombreuses protéines virales ont été montrées comme étant des inhibiteurs de la voie cGAS-STING, ciblant tous les différents composants de cette voie (cf partie III).

Une fois lié à l'ADN, cGAS s'active en subissant un changement conformationnel puis catalyse la production de cGAMP *(2',3'-cyclic GMP-AMP),* lui-même reconnu par le récepteur transmembranaire STING (*stimulator of interferon genes)* enchâssé à la membrane du RE (Figure 13). Le cGAMP peut aussi être transféré de cellules en cellules afin d'induire un signal paracrine (186). La liaison de cGAMP à STING entraine son changement conformationnel aboutissant à son oligomérisation et à la translocation de STING du RE vers le Golgi. STING recrute alors la kinase TBK1 *(TANK-binding kinase 1)* pour former le signalosome. TBK1 peut ainsi phosphoryler STING, permettant la liaison d'IRF3 *(Interferon regulatory factor 3*), lui-même alors phosphorylé par TBK1. Cela aboutit à la dimérisation d'IRF3 puis à sa translocation nucléaire, permettant ainsi la transcription d'IFN-I (186). STING est aussi capable de recruter les kinases IKK *(IκB kinase*). Le complexe IKK composé d'IKKα, IKKβ et NEMO (*NF-kB Essential Modulator)*, phosphoryle alors IκBα pour induire sa dégradation, ce qui permet la libération et la translocation nucléaire subséquente du facteur de transcription NF-κB, permettant l'expression de cytokines pro-inflammatoires.

b. Autres voies induites par l'ASFV

L'axe RIG-I-TBK1 semble aussi activé en réponse à l'infection par l'ASFV. RIG-I *(retinoic acid inducible gene I)* est un senseur cytosolique reconnaissant les ARNs viraux grâce à son domaine ARN hélicase. Il est capable de distinguer les ARNs simples brins et doubles brins exogènes via son domaine C-terminal reconnaissant les extrémités 5'-triphosphates libres des ARNs, se distinguant des ARNs cellulaires généralement coiffés. Le domaine N-terminal de RIG-I contient des domaines CARD *(caspase activation and recruitment domains)* capables d'interagir avec celui de la protéine MAVS *(mitochondrial antiviral signaling protein*) elle-même localisée au niveau de la membrane externe mitochondriale. Cela aboutit à la dimérisation de MAVS qui s'associe alors avec des protéines adaptatrices TRAF (*tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor)* qui vont alors recruter TRAF3 et TANK *(TRAF family member-associated NF-kappa B activator).* Ces dernières peuvent alors recruter les kinases IKK (dont IKKε) et TBK1, induisant à l'activation des facteurs de transcription IRF3, IRF7 et NF-κB et *in fine* à la transcription d'IFN-I et III et de cytokines pro-inflammatoires (187). Bien que l'ASFV possède un génome à ADNdb, il semble pouvoir activer indirectement la voie RIG-I-TBK1 (188). En effet, l'ARN polymérase ADN dépendante III (Pol III) est capable de transcrire les ADNs cytosoliques riches en AT en ARNs, qui seront eux même reconnus par RIG-I (189). Le génome de l'ASFV est lui-même particulièrement enrichi en AT, ces zones sont donc reconnues par la Pol III et les transcrits ainsi formés détectés par RIG-I (188).

TLR3 *(Toll-like receptor 3)* semble aussi activé en présence de l'ASFV. Les macrophages, cellules cibles de l'ASFV, expriment TLR3 à leur surface cellulaire ainsi qu'au sein de leurs endosomes (190). TLR3 est capable de reconnaitre les ARNs double brins (ARNdb). Une fois lié à l'ARNdb, TLR3 recrute TRIF (*Toll interleukin-1 receptor*) qui relocalise avec des molécules comme TRAF2 et TRAF6, recrutant ainsi TRAF3 et activant l'axe TBK1/IRF3 et IKK/NF-κB (191). L'ASFV code d'ailleurs un homologue du TRL3, appelé I329L, capable de bloquer cette voie au niveau de TRIF (192). Bien que l'expression de TLR3 soit augmentée en réponse à l'infection par l'ASFV (193), il n'est pas encore connu comment TRL3 peut détecter les ARNs transcrits de l'ASFV.

Différents autres senseurs sont capables de reconnaitre les ADNdb, comme le TLR9, DAI (*DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors*), IFI16 (*interferon gamma inducible protein 16*) et DDX41 (*DEAD box protein 41*) induisant la transcription d'IFN-I via l'axe TBK1-IRF3 ou AIM2 activant l'inflammasome. Pourtant, il n'y a à ce jour aucune preuve quant à leur implication dans la détection de l'infection par l'ASFV.

c. Voie JAK-STAT & ISG

Une fois les IFN-I produits, ils diffusent dans le milieu extracellulaire et vont à leur tour se lier à leur récepteur IFNAR alors à l'état monomérique. La liaison des IFN-α/β entraine la dimérisation du récepteur en hétérodimères IFNAR-1 et IFNAR-2 *(IFN alpha and beta receptors)*, ainsi qu'un changement conformationnel aboutissant à l'activation des protéines kinases TYK2 (*tyrosine kinase 2*) et JAK1 (*janus kinase 2*). Ces dernières phosphorylent alors STAT-1 et STAT-2 (*signal transducer and activator of transcription*) provoquant leur dimérisation. Cela induit la translocation nucléaire des STAT associées à la protéine IRF9, qui se fixe sur le promoteur ISRE (*IFN-stimulated response element*) pour induire l'expression de nombreux ISGs (194). Ces ISGs permettent d'établir un état antiviral dans la cellule. Ils codent de nombreux effecteurs antiviraux, des cytokines immunomodulatrices, mais aussi des composants directs de cette voie de l'IFN-I, ce qui permet alors une amplification de cette réponse (Figure 13).

L'ASFV est sensible à différents ISGs. Les IFITM (*Interferon-induced transmembrane*) sont regroupés en une famille de protéines largement décrites pour être capables d'inhiber l'entrée virale de nombreux virus (195). Elles sont exprimées en réponse à l'infection par l'ASFV en cellules Vero (196). Les IFITM1, 2 et 3 réduisent l'infection et provoquent un effondrement de la voie endosomale pourtant nécessaire à l'entrée virale (196). Plus particulièrement, le rôle de l'IFITM2 semble être lié à l'inhibition de l'entrée virale par endocytose grâce à des modifications de l'efflux de cholestérol. Cela suggère ainsi que l'IFITM2 agit au niveau de l'endosome tardif, empêchant l'étape de décapsidation de l'ASFV (196). Ces travaux liés aux IFITMs ont été faits en cellules simiennes Vero, qui ne sont pas de l'espèce cible de l'ASFV. Chez le porc, cinq IFITM ont été décrites comme capables d'avoir une action

antivirale contre l'infection par l'ASFV: les SwIFITM1a, 1b, 2, 3 et 5 (*Swine IFITM*) (197). Le *KO* de ces gènes augmente la réplication de l'ASFV dans des macrophages alvéolaires porcins, tandis que leur surexpression inhibe sa réplication dans des cellules Vero (197).

La protéine MxA (*Myxovirus resistance*) inhibe la réplication de l'ASFV dans des cellules Vero (198). Cette inhibition est liée au recrutement de la protéine MxA dans les sites d'assemblage viral périnucléaires où la protéine entoure les usines virales. MxA induit une forte réduction de la synthèse des protéines tardives du virus (198).

La protéine OAS1 (*2', 5'-oligoadenylate synthetase gene 1*) est surexprimée chez des porcs décédés après une PPA aigüe, tandis que son expression est diminuée chez des porcs asymptomatiques (199). OAS1 est aussi surexprimée *in vitro* dans des macrophages alvéolaires porcins infectés et inhibe la réplication de l'ASFV (200). OAS1 est activée en détectant les ARNdb transcrits par la Pol III à partir des zones riches en AT du génome de l'ASFV (200). OAS1 produit alors de l'OAS permettant d'activer la fonction antivirale de la RNase L capable de dégrader les ARNm viraux (201). Enfin, OAS1 interagit avec la protéine de capside p72. Elle recrute TRIM21 (*Tripartite motif-containing protein 21*) qui ubiquitine p72 induisant ainsi sa dégradation, ce qui impacte l'assemblage du virion (200).

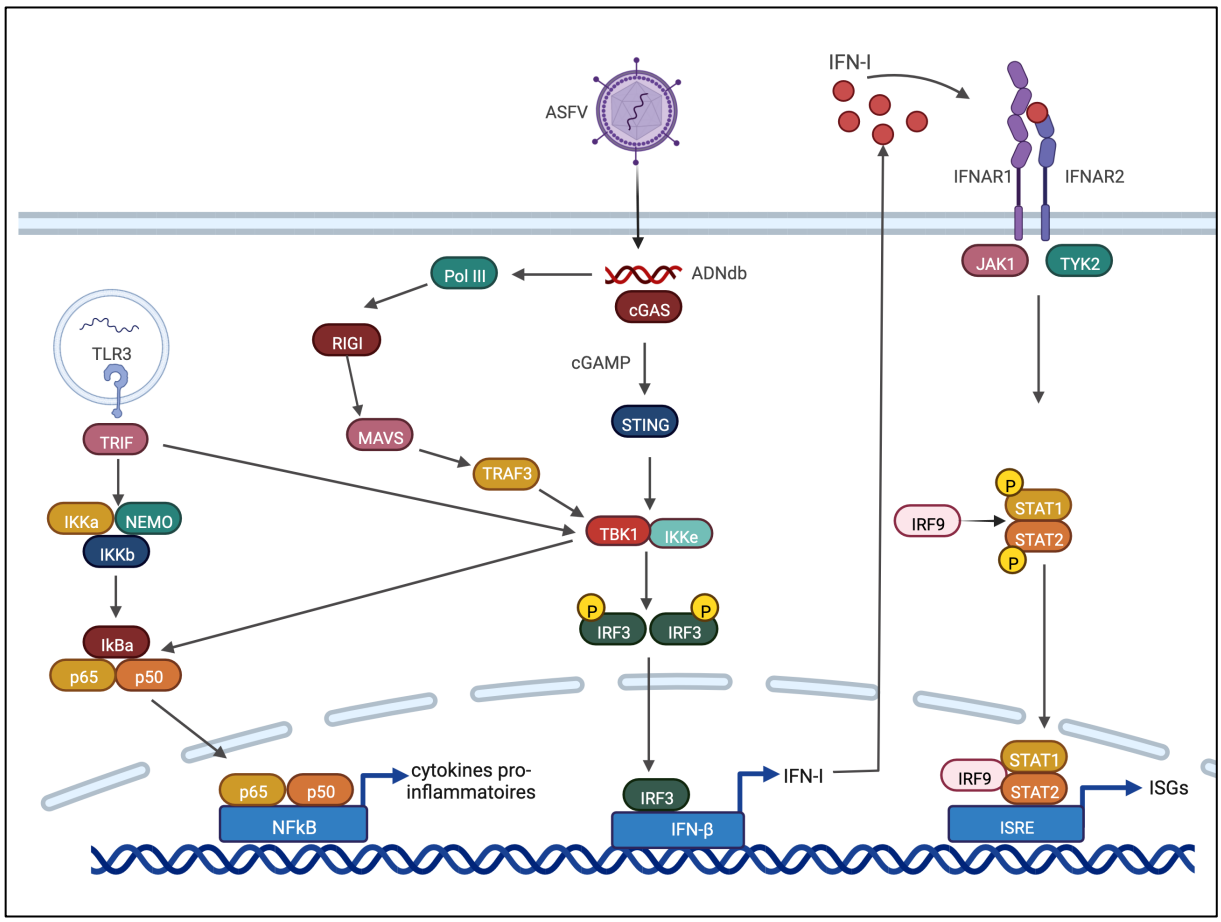


Figure 13 : Voie IFN-I en réponse à l'infection par ASFV.

Figure créée avec Biorender.

2. L'inflammation

L'inflammation fait partie de l'immmunité innée. C'est une réponse immédiatement mise en place en cas d'infection. Elle permet la migration de différentes cellules du système immunitaire vers la zone infectée et l'induction de molécules permettant notamment l'élargissement et la perméabilisation des vaisseaux sanguins. Ainsi, la zone infectée gonfle, s'échauffe et rougit, ce qui correspond aux marqueurs de l'inflammation.

Les cytokines sont les effecteurs de l'inflammation. Ce sont des petites protéines pléiotropiques influençant la plupart des processus biologiques. Elles orchestrent notamment les réponses immunitaires innée et adaptative et comprennent les interleukines (IL), les interférons, les TNF, les chimiokines et des facteurs de croissance. Ces facteurs solubles

peuvent être pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires. Pourtant, en cas de suractivation du système immunitaire, ils peuvent être induits de façon tout à fait excessive, menant à une tempête cytokinique délétère pour l'hôte infecté. Une grande partie des symptômes de la fièvre hémorragique sont liés à cet excès de cytokines causant une sur-inflammation (202, 203).

L'inflammation est notamment induite par la voie NF-κB (Figure 14). NF-κB est constitué de cinq monomères : p50 (NF-κB1), p52 (NF-κB2), p65 (RelA), RelB, et c-Rel. Il est activé en aval de PRR comme des TLR ou des NLR, ainsi que via des récepteurs cytokiniques (TNFR, IL1R, …). Une fois qu'un PRR est activé, un signal de transduction active le complexe IKK (IKKα, β, et γ = NEMO), qui va lui-même phosphoryler IκB. Cette phosphorylation d'IκB aboutit à sa polyubiquitination et sa dégradation subsidiaire via le protéasome. Cela induit la libération du facteur de transcription NF-κB qui est transloqué dans le noyau et peut donc se fixer sur son promoteur, induisant la transcription de nombreux gènes pro-inflammatoires comme la pro-IL-1β, la pro-IL-18, le TNFα ou le NLRP3 (*NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*). Les cytokines ainsi produites peuvent se fixer sur des récepteurs cytokiniques, induisant de nouveau la voie NF-κB, permettant ainsi d'amplifier le signal (204). Une fois synthétisé, le senseur NLRP3 va recruter la protéine ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) et la pro-caspase 1 pour former un complexe multimérique essentiel à l'inflammation appelé le NLRP3 inflammasome. Il va permettre l'activation de la caspase 1 et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1β et l'IL-18 (205). La caspase 1 activée peut alors cliver la GSDMD (*Gasdermin D*), permettant le relargage de son fragment N-terminal (GSDMD-NT). Ce dernier va induire des pores dans la membrane plasmique, aboutissant à la mort cellulaire par pyroptose (206). Cette pyroptose est un mécanisme de défense de l'hôte, permettant d'éliminer les cellules infectées. Cette mort est pro-inflammatoire, puisque la rupture de la membrane plasmique induit le relargage du contenu du cytoplasme, incluant les cytokines.

L'infection avec l'ASFV peut entrainer une réponse inflammatoire particulièrement exacerbée avec des hauts niveaux d'interleukines pro-inflammatoires (IL-1α, IL-1β, IL-6), de TNF et de chimiokines (CCL2, CCL5, CXCL10) (207). En effet, les porcs infectés avec la souche SY18 ont un haut pic de sécrétion dans leur sérum de TNF-α, IFN-α, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, RANTES (*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*), et d'IP-10 (*IFN-*

γ-induced protein 10) à trois jours post-infection. Au moment de la phase terminale de l'infection et peu avant leur mort, ils ont un nouvelle augmentation de la sécrétion de TNF-α, d'IL-1β, d'IL-6 et d'IL-8 pro-inflammatoires, mais aussi de l'IL-10 anti-inflammatoire, marqueurs de l'issue fatale en fin d'infection (208). Ce schéma de sécrétion est typique d'une tempête cytokinique qui se caractérise par une initiation retardée et dérégulée de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et par des réponse pro- et anti-inflammatoires déséquilibrées (208).

Un des signes de la PPA aigüe est la destruction des tissus lymphoïdes due à une apoptose massive des lymphocytes et induisant une lymphopénie et une immunosuppression (63, 209, 210). L'apoptose massive des lymphocytes B et T, notamment au sein des tissus lymphoïdes, n'est pas liée à l'infection de ces cellules par le virus (64). Cependant, l'augmentation du nombre de macrophages infectés dans les organes lymphoïdes précédant l'apoptose massive des lymphocytes suggère une responsabilité des médiateurs de l'inflammation relargués par les macrophages dans ce phénomène (211). En outre, le niveau d'apoptose dans les organes lymphoïdes serait lié à la quantité de cytokines sécrétées (207, 210, 212). L'activation des macrophages est notamment associée à la libération de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNFα *(Tumor Necrosis Factor α)*. Or, le TNFα issu de surnageants de macrophages infectés par l'ASFV est capable d'induire l'apoptose de lymphocytes non infectés. Le début de l'apparition des symptômes chez le porc est d'ailleurs corrélé avec des concentrations élevées en TNF-α (213). Ainsi, l'infection des macrophages semble induire une augmentation de la sécrétion de cytokines, dont le TNFα, aboutissant à l'apoptose des cellules avoisinantes (macrophages et lymphocytes).

L'apoptose est induite via l'activation de la caspase 3 dans les stades précoces de l'infection, avant même la synthèse des protéines virales ou la réplication du génome (214). Les mécanismes de déclenchement de l'apoptose sont dépendants à la fois de la voie mitochondriale mais aussi de celle liée au stress du réticulum endoplasmique (215). En effet, les protéines virales sont traduites et acquièrent leurs modifications post-traductionnelles au sein du RE. Ainsi, la quantité de protéines virales synthétisées pourrait surcharger la capacité

de repliement des protéines du RE, expliquant l'augmentation de l'expression de protéines chaperonnes au cours de l'infection. Cela induit la voie de réponse au stress du RE et active l'apoptose par l'intermédiaire de la caspase 12 et d'ATF6 (*Activating transcription factor 6*) (215). De plus, les mitochondries sont recrutées vers les usines virales via les microtubules, permettant de fournir l'énergie nécessaire à la réplication (216), mais induisant aussi l'apoptose par la voie mitochondriale avec l'activation de la caspase 9. La protéine virale p54, codée par le gène E183L, est aussi capable d'induire l'apoptose par la voie mitochondriale, en interagissant avec la DLC8 (*8-kDa light chain cytoplasmic dynein*), induisant ainsi l'activation de la caspase 9 puis de la caspase 3 (217).

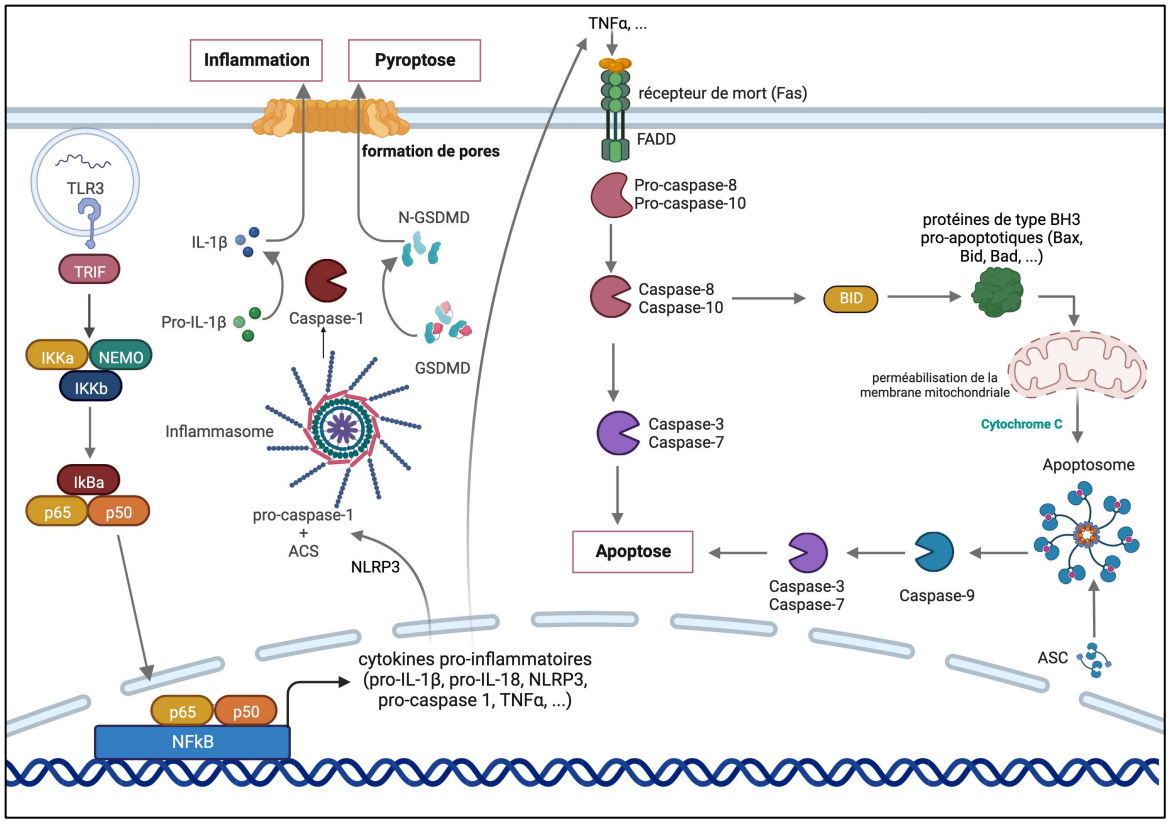


Figure 14 : L'inflammation et l'apoptose.

Figure crée sur Biorender.

3. Immunité adaptative

Contrairement à l'immunité innée, la réponse immunitaire adaptative est spécifique à l'agent pathogène qui l'a induite. Elle permet d'induire une protection de longue durée et a l'avantage d'être une réponse « mémoire », permettant de répondre plus vite en cas de réinfection. Les lymphocytes sont les effecteurs principaux de l'immunité adaptative. De façon simplifiée, cette dernière peut être scindée en deux grandes catégories : l'immunité à médiation cellulaire et l'immunité humorale médiée par les anticorps.

Dans le cadre de l'infection par l'ASFV, certains animaux survivants peuvent être protégés contre une réinfection par les mêmes souches (218). Pourtant, la capacité de neutralisation des anticorps contre la PPA est controversée (219) et les anticorps seuls ne protègent pas les porcs contre l'infection (136). L'immunité cellulaire semble donc jouer un rôle important (138).

a. Réponse cellulaire

Les macrophages et les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes. Elles permettent de faire le lien entre immunité innée et immunité adaptative. Après détection d'un signal de danger via leurs PRRs, elles phagocytent le peptide reconnu, le digèrent puis le présentent aux lymphocyte T (LT) CD4+ et CD8+ (220). Pour que ces lymphocytes T soient activés, plusieurs signaux d'activation sont nécessaires. Il faut tout d'abord l'interaction du récepteur des cellules T (TCR) avec l'antigène leucocytaire (SLA, équivalent porcin du CMH), puis l'activation par les molécules de costimulation puis par des cytokines (218). Les SLA de classe I et II permettent de présenter le peptide respectivement aux LT CD8+ et CD4+. Leur expression peut varier au cours de l'infection par l'ASFV, avec des différences selon les souches et leur virulence, affectant le développement d'une réponse adaptative efficace (221, 222). Par exemple, la souche virulente Malawi Lil/20 augmente l'expression du gène SLA I, sans pour autant que ce soit corrélé à une augmentation de l'acheminement du SLA I à la membrane plasmique du macrophage, car l'ASFV perturbe son transport vésiculaire (223). De plus, plusieurs souches atténuées du génotype I (BA71V,

NH/P68) induisent une diminution de l'expression du SLA I au sein de macrophages dérivés de monocytes infectés, contrairement aux souches virulentes du même génotype (22653/14, 26544/OG10) (222, 224). Les molécules SLA de classe I entrainent un signal inhibiteur pour les cellules NK (*Natural killer*) (225). En augmentant l'expression du SLA I, les isolats virulents pourraient échapper à la reconnaissance des NK, entrainant ainsi une réponse immunitaire protective plus faible. *In vivo*, il existe une corrélation entre l'activation des NK à la suite d'une infection avec la souche atténuée NH/P68 et une protection face à un challenge avec une souche du même génotype (146).

Les lymphocytes T CD8+/CD4- correspondent aux cellules T cytotoxiques. Ils reconnaissent les antigènes présentés via le SLA I et tuent les cellules infectées, permettant ainsi de limiter la propagation de l'infection. Les leucocytes de porcs infectés par une souche atténuée de l'ASFV présentent une cytotoxicité spécifique contre les cellules infectées, montrant ainsi l'implication des cellules T cytotoxiques (226). De plus, les porcs infectés par la souche atténuée OUR/T88/3 sont normalement protégés face à un challenge avec la souche virulente homologue OUR/T88/1. En revanche, la déplétion en LT CD8+ après une infection avec cette souche atténuée entraine la perte de la protection après un challenge avec la souche virulente (138). En résumé, la persistance des réponses cytotoxiques après une réinfection indique une mémoire des cellules T chez des porcs infectés par des souches atténuées jusqu'à deux ans après une première infection, tandis que ceux infectés par des souches virulentes meurent trop rapidement pour qu'une réponse mémoire se mette en place (227). Enfin, la réponse cytotoxique est semblable entre les porcs et les sangliers, puisque l'infection avec la souche peu virulente Estonia2014 entraine une augmentation semblable des LT CD8+ cinq à dix jours post-infection dans différents organes (dont la rate, les poumons, le foie) (228). Étonnement, la perforine, qui est l'une des principales protéines permettant l'action lytique des LT CD8+, a une expression presque totalement éteinte lors de l'infection que ce soit par des souches atténuées ou virulentes (218, 228, 229). Les LT CD8+ pourraient alors tuer les cellules infectées en induisant leur apoptose via les récepteurs de mort comme le Fas/FasL ou le TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) (218). Ainsi, bien que le mécanisme d'action lytique ne soit pas encore bien compris, la réponse cytotoxique semble particulièrement importante, en particulier en réponse à l'infection par des souches peu virulentes.

Les cellules Th CD4+ sont essentielles à de nombreuses réponses et aident notamment à la production d'anticorps et à leur maturation d'affinité. Des cellules mononucléaires périphériques de porcs infectés par la souche atténuée BA71 ont été prélevées et réinfectées *in vitro*. Une déplétion de tous les LT ou spécifique des LT CD4+ induit une absence d'anticorps, pouvant ainsi montrer que la production d'anticorps en réponse à l'infection par l'ASFV est dépendante des CD4+ (230). L'action de ces cellules a été tout de même moins étudiée que la réponse cytotoxique.

b. Réponse humorale

La réponse immunitaire humorale aboutit *in fine* à la production d'anticorps (AC). L'une des fonctions des AC est la neutralisation. Un anticorps, via sa région variable, peut se lier à un virus et interrompre ainsi son cycle de réplication. Pourtant, il existe une certaine controverse quant à l'efficacité des AC neutralisants produits en réponse à l'infection par l'ASFV.

Des anticorps sont produits entre sept à quatorze jours post-infection chez des porcs survivants à l'infection (231) et généralement, les porcs exposés à une souche atténuée sont immunisés contre une réinfection par une souche homologue (159). Bien évidemment, la plupart des porcs infectés par des souches virulentes décèdent avant même que leurs AC ne puissent être détectés (232). De plus, le transfert d'immunoglobulines (issues de porcs infectés avec une souche atténuée puis challengés avec la souche virulente homologue) à des porcs naïfs entraine une protection contre une infection avec la même souche virulente, montrant ainsi l'importance des anticorps dans l'immunité protectrice anti-ASFV (233). Enfin, des AC anti-ASFV semblent être transférés via le colostrum, puisque des porcelets allaités par des truies guéries sont protégés contre l'infection (234, 235). Plusieurs souches du virus semblent être neutralisées *in vitro* par des sérums issus de porcs guéris (236, 237) ou par des anticorps monoclonaux (101, 238), avec toujours une fraction du virus ne semblant pas être neutralisée. Les AC neutralisants bloquent l'attachement et l'internalisation du virion (101) en cellules Vero même si ces essais de neutralisation ont été effectués sur des lignées cellulaires avec des souches adaptées, bien loin des cellules cibles du virus. Il semble y avoir aussi des

différences de neutralisation en fonction de la souche utilisée. Les souches atténuées par de très nombreux passages sur cellules semblent avoir perdu la capacité de neutralisation (239). Ainsi, la production d'AC neutralisants efficaces contre des souches non adaptées n'est pas encore bien connue. D'autres fonctions effectrices des AC peuvent aussi avoir un rôle dans la protection, telles que la lyse cellulaire médiée par le complément et la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des AC (240, 241).

Pour éviter la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative efficace, l'ASFV code pour plusieurs protéines capables de bloquer la production les différentes voies de signalisation en lien avec l'immunité innée.

III. Stratégies développées par l'ASFV pour échapper à la réponse antivirale

1. Évasion des voies d'induction IFN-I

Afin d'effectuer son cycle de réplication au sein de la cellule hôte, l'ASFV, comme de nombreux virus, a développé de multiples stratégies pour échapper à la réponse immunitaire innée, notamment en inhibant la voie de l'IFN-I. Il a évolué pour résister à la réponse IFN-I mise en place par l'hôte en codant de multiples facteurs de virulence. Tous les mécanismes d'inhibition sont résumés dans le Tableau 3 et illustrés dans la Figure 15.

a. Lien entre atténuation et protéines de la famille des MGF

L'ASFV possède de nombreux facteurs de virulence capables de détourner la voie IFN-I. Il existe notamment un lien entre l'atténuation des souches et la production d'IFN-I. En effet, les macrophages infectés par des souches atténuées induisent une expression plus importante d'IFN-I comparée aux souches virulentes (242). De plus, ces macrophages préalablement traitées à l'IFNα deviennent moins permissifs à l'infection par des souches atténuées mais restent tout à fait sensibles à l'infection par des souches virulentes (243). Ces dernières semblent donc posséder des facteurs de virulence capables de subvertir la voie IFN-I. En particulier, les protéines codées par les gènes de la famille des MGFs semblent jouer un rôle majeur dans l'inhibition de cette voie.

Des souches pas ou peu virulentes chez le porc (171, 178) se caractérisent par des délétions de gènes au niveau des MGF360 et MGF505 et leur réplication dans les macrophages est également associée à une grande production d'IFN-I (244, 245). La souche naturellement atténuée OURT88/3, isolée chez une tique lors de l'épidémie touchant le Portugal à la fin du XXème siècle (145), se distingue notamment des souches virulentes par l'absence de huit gènes (MGF360-10L, 11L, 12L, 13L, 14L, MGF505-1R, 2R, 3R) (94, 246). Par ailleurs, la délétion des gènes de la famille des MGF360 semble induire une diminution de la réplication de l'ASFV

chez la tique *Ornithodoros* (50). Les gènes MGF codent ainsi pour des protéines aux multiples fonctions, inhibant la réponse IFN-I chez ses hôtes mammifères tout en étant essentielles à la réplication virale chez la tique, faisant d'eux des déterminants viraux importants du spectre d'hôtes. Cependant, la fonction de la majeure partie de ces gènes est à ce jour inconnue.

b. Inhibitions spécifiques de la voie cGAS-STING

L'ASFV possédant un génome à ADNdb, il est particulièrement reconnu par des senseurs spécifiques des ADNdb cytoplasmiques, comme cGAS. Cependant, peu de protéines de l'ASFV ont été montrées comme capables d'inhiber directement cGAS. Pourtant, la voie en aval de cGAS a été décrite dans la littérature comme particulièrement activée en réponse à l'infection par l'ASFV (181), mais aussi la plus ciblée par les protéines inhibitrices de l'ASFV. La protéine L83L inhibe cGAS et STING. La surexpression de L83L inhibe la voie de signalisation de l'IFN-I. En revanche, le KO (*knock-out*) de L83L augmente la production d'IFN-I dans les macrophages alvéolaires. Pour ce faire, L83L interagit avec cGAS et STING et induit leur dégradation via les voies de l'autophagie et du protéasome en recrutant un récepteur de l'autophagie appelé TOLLIP (247). Une autre protéine d'ASFV, QP383R interagit avec cGAS et favorise sa palmitoylation, une modification post-traductionnelle inhibant son activité enzymatique. QP383R bloque aussi la liaison à l'ADN et la dimérisation de cGAS, l'empêchant ainsi de fonctionner (248).

Différentes protéines de l'ASFV sont capables d'inhiber des composants spécifiques de la voie cGAS-STING. Deux protéines virales, EP364R et C129R interagissent avec le 2',3'-cGAMP induisant son clivage et son inhibition subsidiaire (249). Cela est notamment dû à une homologie de séquence entre EP364R et STING correspondant à son motif de liaison au 2',3'-cGAMP. EP364R est donc capable de rentrer en compétition avec STING pour la liaison au 2',3'-cGAMP (250).

La protéine MGF505-7R (A528R) est capable d'interagir avec STING et ULK1, une protéine de l'autophagie. MGF505-7R induit la phosphorylation de STING conduisant *in fine* à sa dégradation (251). La protéine virale p17 interagit aussi avec STING, pouvant empêcher ainsi son recrutement par IKKε et TBK1 (250), tandis que la protéine E184L interagit avec STING

altérant la dimérisation et son oligomérisation et entraînant l'inhibition de sa phosphorylation (252).

c. Inhibition de la reconnaissance de l'ASFV par d'autres senseurs cellulaires

On pourrait intuitivement penser que l'ASFV n'est reconnu que par des senseurs spécifiques des ADNdb cytoplasmiques. Cependant l'ASFV est aussi capable d'être détecté par RIG-I, reconnaissant pourtant des ARNs double brin. Afin d'empêcher cette reconnaissance, l'ASFV code pour la protéine I267L. Cette dernière interagit avec l'E3-ubiquitine ligase Riplet, empêchant son interaction avec RIG-I. Riplet n'est ainsi plus capable d'induire la polyubiquitination de RIG-I en K63 pourtant nécessaire à son activation (188). De plus, la délétion d'I267L au sein d'une souche virulente induit plus d'IFN-β par rapport à la souche parentale que ce soit *in vitro* dans des macrophages alvéolaires, mais aussi *in vivo* dans le sérum de porcs infectés. Cette délétion aboutit à une atténuation de la virulence et de la pathogénicité *in vivo* (188).

La protéine d'ASFV I329L est un homologue viral du TLR3, un récepteur cellulaire reconnaissant les ARNdb au sein des endosomes. I329L est une protéine transmembranaire très glycosylée, composée notamment d'un domaine extracellulaire contenant plusieurs répétitions riches en leucine (LRR, *leucine rich repeats*) caractéristiques des TLRs (253). L'analyse structurale d'I329L semble prédire qu'elle est capable de cibler la protéine IRF3 aboutissant *in fine* à une inhibition de l'activation d'IFNβ, tandis que la surexpression de TRIF réverte l'effet inhibiteur (192). De plus, la délétion d'I329L au sein de la souche naturellement atténuée OURT88/3 conduit à une augmentation *in vitro* de l'expression d'IFN-I par rapport à la souche parentale. Cependant, cette délétion réduit également la protection des porcs infectés par la souche virulente OURT88/1 (254) et n'induit même pas l'atténuation de la souche virulente Georgia 2007/1 (254).

d. Inhibition de composants centraux communs à plusieurs voies d'induction d'IFN-I.

TBK1, IKKε et IRF3 sont des composants majeurs de la voie IFN-I et sont donc particulièrement ciblés par de nombreuses protéines de l'ASFV. Ils sont notamment activés en aval des PRRs comme cGAS, TLR3 et RIG-I.

La protéine S273R a été décrite pour inhiber IKKε. Cette protéine inhibe la voie cGAS-STING en interagissant avec IKKε et l'empêchant ainsi d'interagir avec STING. L'activité enzymatique de S273R semble ainsi altérer la sumoylation d'IKKε, une modification post-traductionnelle nécessaire à son interaction avec STING (255). S273R est d'ailleurs capable d'interagir aussi avec IRF3 et d'empêcher son activation par TBK1 (255).

De multiples protéines inhibent TBK1, comme A137R, MGF360-11L, DP96R, I215L, M1249L, MGF110-9L et MGF505-7R par différents mécanismes d'action. Par exemple, la délétion d'I215L au sein de la souche virulente HLJ/18 induit une augmentation de la production d'IFN-β et une diminution de la réplication virale (256). I215L interagit avec l'ubiquitine ligase RNF138 et la recrute pour dégrader RNF128. Cela bloque la polyubiquitination de TBK1 médiée par RN128 sur sa lysine 63 nécessaire à son activation (256). Quant à la protéine MGF110-9L, elle induit la dégradation de TBK1 en augmentant l'expression de PIK3C2B, une molécule permettant l'induction de l'autophagie (257). Ces deux mécanismes, l'un bloquant l'autophagie pour inhiber TBK1 et l'autre l'utilisant pour induire sa dégradation, sont représentatifs de la finesse de sa régulation. En effet, suivant la lysine sur laquelle TBK1 est ubiquitinylée, cela peut aboutir à son activation (en K63) (258) ou à sa dégradation (en K48) (259).

IRF3 est un facteur de transcription nécessaire à l'expression du gène codant l'IFN-β. Son rôle absolument central dans la voie IFN-I fait de lui une cible de prédilection pour les protéines de l'ASFV. À ce jour, huit protéines (MGF505-7R, MGF360-14L, M1249L, E120R, MGF505-15R, D129L, E301R et S273R) sont capables de cibler IRF3, inhibant son action grâce à multiples stratégies. Par exemple, MGF360-14L interagit avec IRF3 et induit son ubiquitination sur sa lysine 63 en recrutant l'E3 ubiquitine ligase TRIM21 (260). IRF3 est aussi ciblé par E120R, une protéine de capside se liant à elle via ses résidus 72 et 73, bloquant ainsi son recrutement par TBK1. La délétion de ces résidus au sein de la souche CN/GS/2018 induit

une augmentation de l'induction d'IFN-β dans des macrophages alvéolaires porcins (261). MGF505-7R est une protéine multifonctionnelle ciblant de nombreux composants de la voie IFN-I (STING, TBK1, IRF7, IRF3). Elle interagit avec IRF3 et bloque ainsi sa translocation nucléaire (262). Enfin, la protéine D119L a récemment été décrite comme capable de se lier dans le noyau aux activateurs de la transcription CBP et p300. Cela perturbe leur interaction avec IRF3 inhibant ainsi l'activation du promoteur de l'IFN-β.

L'ASFV a ainsi développé de nombreuses stratégies, souvent redondantes, permettant de pirater la voie d'induction de l'IFN-I et d'inhiber la mise en place de cette réponse antivirale.

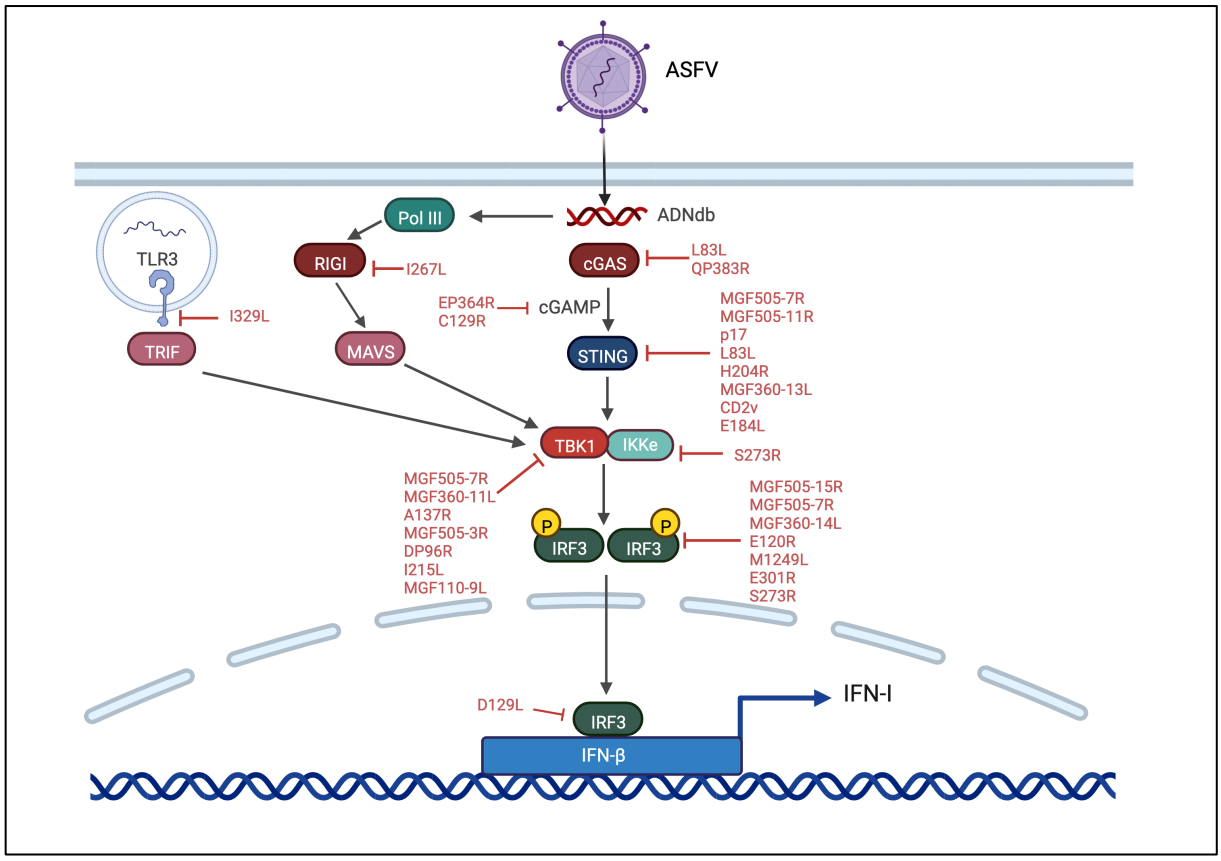


Figure 15 : Inhibition de la voie d'induction d'IFN-I par l'ASFV.

Les protéines virales inhibitrices sont représentées en rouge. Figure crée avec Biorender.

Tableau 3 : Les mécanismes d'inhibition de la voie d'induction d'IFN-I par l'ASFV.

Protéine virale	Mécanisme d'inhibition	Référence
I267L	Interagit avec l'E3 ubiquitine ligase Riplet, ce qui empêche l'activation de RIG-I.	(188)
QP383R	Interagit avec cGAS, induit sa palmitoylation et aboutit à une inhibition de sa dimérisation et de sa liaison à l'ADN.	(248)
L83L	L83L interagit avec cGAS et STING et induit la dégradation de STING via les voies de l'autophagie et des lysosomes en recrutant Tollip.	(247)
EP364R	Interagit avec 2', 3'-cGAMP et le clive.	(249)
C129R	Interagit avec 2', 3'-cGAMP et le clive.	(249)
MGF505-11R	Interagit avec STING et induit sa dégradation via les voies de l'autophagie, du protéasome, et des lysosomes.	(263)
H240R	Interagit avec STING et inhibe son oligomérisation et sa translocation du RE au golgi.	(264)
CD2v = EP402R	Interagit avec STING et empêche sa translocation du RE au golgi.	(265)
E184L	Interagit avec STING, altère sa dimérisation et son oligomérisation.	(252)
p17 (=D117L)	Interagit avec STING et empêche le recrutement de TBK1 et IKKε.	(250)
MGF360-13L	Induit la dégradation de STING via l'autophagie.	(266)
MGF505-7R = A528R	Interagit avec STING et ULK1. ULK1 qui phosphoryle STING et induit sa dégradation via l'autophagie.	(251)
	Interagit avec IRF7 et TBK1. Dégrade IRF7 via l'autophagie et TBK1 par voie du protéasome.	(267)
	Interagit avec IRF3 et inhibe sa translocation nucléaire.	(262)
MGF360-11L	Interagit avec TBK1 et IRF7 et induit leur dégradation via les voies de l'autophagie, du protéasome et des lysosomes.	(268)
MGF505-3R	Interagit avec cGAS, TBK1 et IRF3. Induit la dégradation de TBK1 via l'autophagie.	(269)
I329L	Homologue TLR3, inhibe l'activation d'IRF3.	(192, 270)
DP96R	Diminue l'expression de TBK1.	(271)
I215L	Interagit avec l'ubiquitine ligase RNF138 ce qui inhibe la polyubiquitination de TBK1 en K63.	(272)
A137R	Interagit avec TBK1 et induit sa dégradation via la voie de l'autophagie.	(273)
MGF110-9L	Induit la dégradation de TBK1.	(257)
M1249L	Supprime la phosphorylation de TBK1. Interagit avec IRF3 et induit sa dégradation via la voie des lysosomes.	(274)
S273R	Interagit avec IKKε et altère sa sumoylation nécessaire à son interaction avec STING.	(255)
	Interagit avec IRF3 et perturbe son interaction avec TBK1.	(275)
E120R	Interagit avec IRF3 et bloque son recrutement par TBK1.	(261)
MGF360-14L	Interagit avec IRF3 et induit son ubiquitination via l'E2 ubiquitine ligase TRIM21.	(260)
E301R	Interagit avec IRF3 et inhibe sa translocation nucléaire.	(276)
MGF360-15R	Cible IRF3.	(270)
D129L	Se lie aux coactivateurs transcriptionnels CBP/p300 et inhibe leur interaction avec IRF3, induisant l'inhibition de l'activation du promoteur de l'IFN-β.	(277)

2. Évasion de la voie de réponse à l'IFN-I

La voie de réponse à l'IFN-I, en aval des récepteurs IFNAR-1 et IFNAR-2 semble un peu moins ciblée par l'ASFV, ou peut-être tout simplement moins étudiée que la voie d'induction de l'IFN-I. Pourtant, l'ASFV est sensible à plusieurs ISGs, comme MxA (198), OAS1 (200) ou les IFTM-2 et 3 (196). Différentes protéines de l'ASFV sont capables d'éviter l'induction de ces ISGs, qu'ils soient responsables de l'amplification de la réponse IFN-I ou impliqués directement dans la réponse antivirale. Les protéines virales inhibitrices sont illustrées dans la Figure 16 et leurs mécanismes d'inhibition résumés dans le Tableau 4.

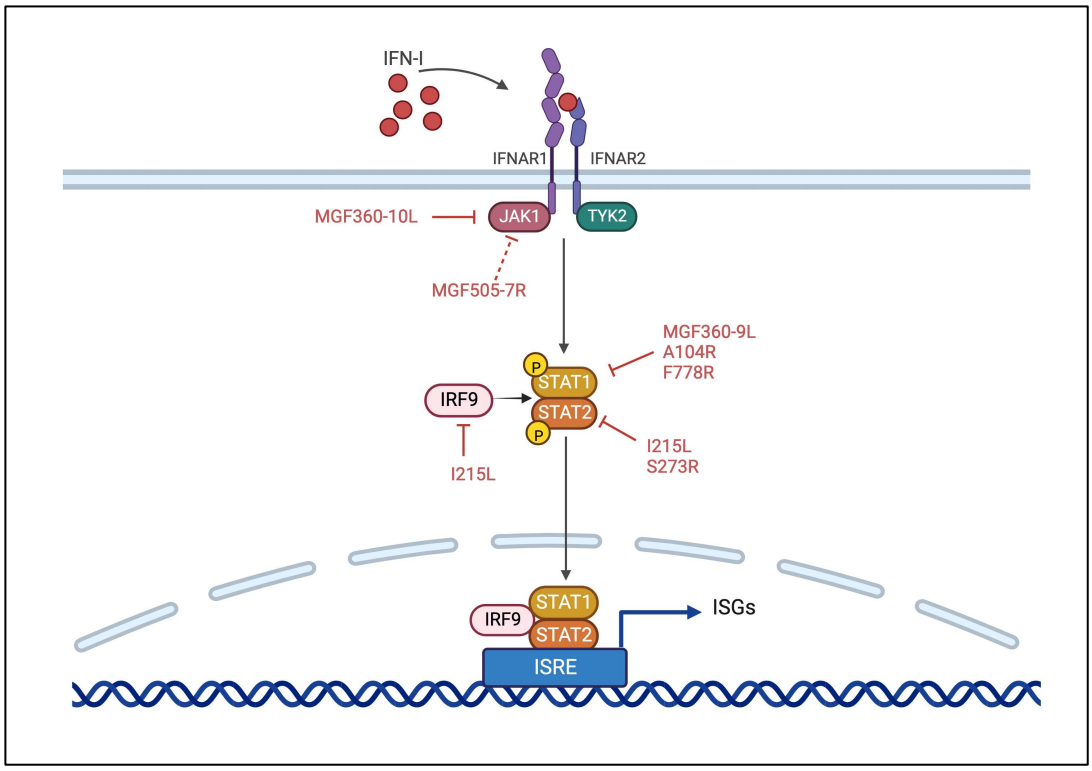


Figure 16 : Inhibition de la voie JAK STAT par l'ASFV.

Les protéines virales inhibitrices sont représentées en rouge. Figure crée avec Biorender.

La protéine MGF360-9L est par exemple capable d'interagir à la fois avec STAT1 et STAT2 et d'induire leur dégradation par la voie de l'ubiquitine-protéasome, sans que le mécanisme sous-jacent ne soit pour le moment décrit (278). F778R inhibe la voie JAK/STAT en diminuant la translocation nucléaire de STAT1 et donc son accumulation au sein du noyau. Pourtant,

F778R ne semble pas interagir avec STAT1, le mécanisme d'inhibition de la translocation n'est d'ailleurs pas encore connu (279).

En plus d'inhiber IRF3, la protéine MGF505-7R inhibe la voie de réponse à l'IFNγ (IFN-II) en interagissant avec JAK1 et JAK2. Elle se lie aussi avec RNF125, une E3 ubiquitine ligase, induisant la dégradation de JAK1 ; ainsi qu'avec le facteur de transcription Hes5 aboutissant à la diminution de l'expression de JAK2 (280). Ces interactions en lien avec JAK1 inhibent la voie de l'IFN de type II, sans qu'il soit encore montré un effet sur la voie de réponse à l'IFN-I.

L'ASFV possède ainsi différents facteurs d'échappement à l'immunité innée, capables de réduire la réponse immunitaire de l'hôte, créant ainsi des conditions favorables à la réplication et à la diffusion du virus dans l'organisme avant même l'établissement d'un état antiviral dans la cellule hôte.

Tableau 4: Les mécanismes d'inhibition de la voie JAK-STAT par l'ASFV.

Protéine virale	Voie	Mécanisme d'inhibition	Référence
A104R	Réponse à IFN-I	Diminue la phosphorylation de STAT1.	(281)
MGF360-9L	Réponse à IFN-I	Interagit avec STAT1 et STAT2 et induit leur dégradation via voie ubiquitine-protéasome.	(278)
F778R	Réponse à IFN-I	Empêche la translocation nucléaire de STAT1.	(279)
S273R	Réponse à IFN-I	Interagit avec STAT2 et induit sa dégradation via la voie du protéasome.	(282)
MGF360-10L	Réponse à IFN-I	Induit la dégradation de JAK1 en recrutant l'E3 ubiquitine ligase HERC5.	(283)
I215L	Réponse à IFN-I	Interagit avec IRF9 et induit sa dégradation via la voie de l'autophagie.	(284)
	Réponse à IFN-I	Interaction avec STAT2 et induit sa dégradation par la voie de l'ubiquitine protéasome.	(285)
MGF505-7R	Réponse à IFN-II	Interagit avec JAK1 et JAK2 et avec l'E3 ubiquitine ligase RNF125 induisant dégradation de JAK1, ainsi qu'avec le facteur de transcription Hes5 ce qui diminue l'expression de JAK2.	(280)

3. Évasion de la réponse inflammatoire

Les souches virulentes d'ASFV provoquent une fièvre hémorragique, notamment à cause d'une hyperactivation du système immunitaire aboutissant à une tempête cytokinique. Les macrophages infectés induisent en effet de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, comme le TNFα, IL-1β, IL-6, IL-8 (286), tandis que le sérum issu de porcs infectés se caractérise par de fortes quantités de TNFα, IL-12, IL-23, IL-17 (287, 288). De façon contrintuitive, il semblerait que certaines souches naturellement atténuées induisent plus de facteurs pro-inflammatoires que les souches virulentes (289). Par exemple, l'infection avec la souche OURT88/3 aboutit à une surexpression d'IL-1α, IL-1β, IL-18, CCL4, CXCL10 comparée à la souche virulente Benin 97/1 (290, 291). Cela peut s'expliquer par le fait que les souches virulentes possèdent des facteurs de virulence capables de détourner les différentes voies de la réponse inflammatoire. Les différents protéines et mécanismes d'inhibition sont répertoriés dans la Figure 17 et dans le Tableau 5.

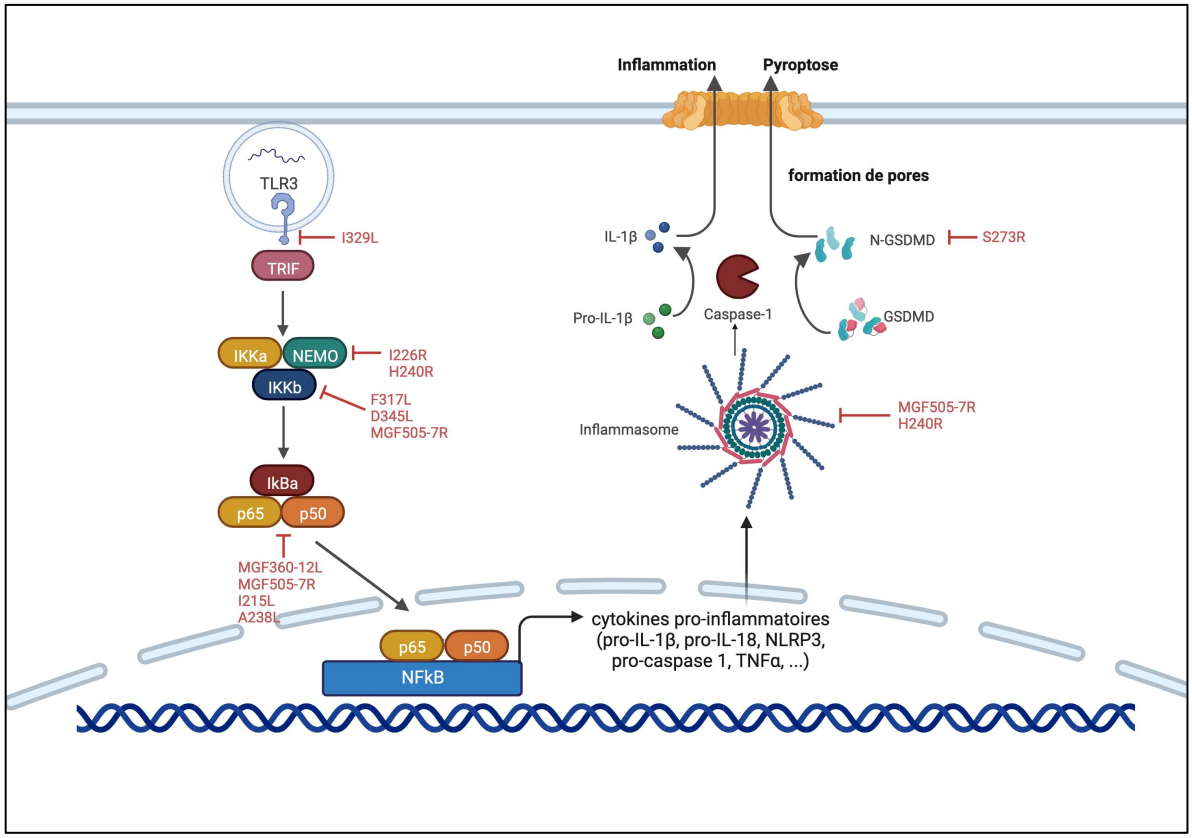


Figure 17 : Inhibition de la voie NFKB et de l'inflammasome par l'ASFV.

Les protéines virales inhibitrices sont représentées en rouge. Figure créée avec Biorender.

Tableau 5: Les mécanismes d'inhibition de l'induction de l'inflammation par l'ASFV.

Protéine virale	Mécanisme d'inhibition	Référence
MGF360-12L	Inhibe translocation nucléaire de NF-κB en bloquant son interaction avec l'importine α.	(292)
MGF505-7R = A528R	Interagit avec IKKα et inhibe la formation de NF-κB.	(293)
	Cible l'activation et la translocation nucléaire de p65.	
F317L	Interagit avec IKKβ, ce qui empêche sa phosphorylation et induit une accumulation d'IKBα aboutissant et à l'inhibition de la translocation nucléaire de NF-κB.	(294)
I226R	Induit la dégradation de NEMO par la voie du protéasome.	(295)
UBCv1	Bloque la translocation nucléaire de p65.	(296)
CD2v	Interagit avec la protéine cellulaire CSF2RA et régule la voie JAK2-STAT3.	(297)
D345L	Interagit avec IKKα et IKKβ ce qui inhibe l'activation d'IκBα.	(298)
I329L	Homologue TLR3, inhibe l'activation de NF-kB.	(192, 270)
S273R	Interagit avec la protéine GSDMD et la clive inhibant ainsi la pyroptose.	(299)
I10L	Diminue l'ubiquitination de NEMO nécessaire à l'activation d'IKKβ et interagit avec IKKβ et bloque sa liaison avec les substrats IκBα et p65.	(300)
L83L	Interagit avec l'IL-1β.	(301)
A238L	Interagit avec p65, empêchant ainsi la liaison de p65 et p50 à leur promoteur.	(302)
	Interagit avec le complexe CPB/p300, empêchant le recrutement de p300 au sein du complexe de transcription.	(303)
	Interagit avec la calcineurine, aboutissant à l'inhibition de l'activation des NFAT.	(304)
MGF300-2R	Interagit et dégrade IKKα et IKKβ. Induit leur polyubiquination aboutissant à leur dégradation via l'autophagie.	(305)
H240R	Interagit avec NEMO et induit sa dégradation via la voie des lysosomes.	(306)
	Interagit avec NLRP3 et inhibe son oligomérisation aboutissant à une diminution de la production d'IL-1β.	(307)

Le facteur de transcription NF-κB, impliqué dans de nombreuses régulations dont celle de l'expression du gène codant l'IFN-β mais aussi de plusieurs cytokines pro-inflammatoires, est de ce fait particulièrement ciblé. La protéine F317L est par exemple capable d'interagir avec IKKβ empêchant ainsi son activation via sa phosphorylation. Ce blocage induit la stabilisation et l'accumulation d'IκBα au niveau de NF-kB, empêchant ainsi sa translocation nucléaire (294). La protéine I226R provoque la dégradation de NEMO via le protéasome (295). Quant à la protéine MGF360-12L, elle inhibe la translocation nucléaire de p65 en rentrant en compétition avec cette dernière pour la liaison aux importines α2 (KPNA2), α4 (KPNA3) et α3 (KPNA4) (292).

La protéine A238L est un homologue viral de la protéine IkB porcine. Elle est particulièrement importante pour l'inhibition de la synthèse cytokinique et agit à différents niveaux (308). En tant qu'homologue d'IkB, A238L interagit avec p65, empêchant ainsi la liaison de p65-p50 à son promoteur (302, 309). A238L se lie aussi avec le complexe CPB/p300, empêchant le recrutement de p300 au sein du complexe de transcription. A238L induit aussi le déplacement des coactivateurs CBP/p300 du promoteur du gène *TNF-α*, aboutissant à une inhibition de son expression (303). Enfin, A238L est capable d'interagir avec la calcineurine inhibant ainsi son activité phosphatase permettant l'activation des NFAT, qui sont des facteurs de transcription induisant différentes cytokines pro-inflammatoires (304, 310).

L'inflammasome est un composant indispensable à l'induction de la réponse inflammatoire. Son activation est initiée en réponse aux signaux de dangers reconnus par les PRR cytosoliques comme NLRP3 et AIM2. Lors de ce processus, les PRR s'assemblent avec la protéine adaptatrice ASC et la caspase-1. Une fois activée, cette dernière induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1β et l'IL-18. Le clivage de la caspase 1 engendre aussi l'association de GSDMD à la membrane plasmique, entrainant la création de pores. Cela aboutit à la mort de la cellule par pyroptose, permettant ainsi d'amplifier la réponse inflammatoire (311). Il est donc particulièrement important pour l'ASFV d'inhiber cette réponse. La protéine de capside H240R est capable d'interagir avec le NLRP3, bloquant ainsi l'activation du NLRP3 inflammasome. Elle est aussi capable d'interagir et d'induire la dégradation de NEMO (306). Sans surprise, la souche virale HLJ/18 délétée du gène codant pour H240R induit plus de cytokines pro-inflammatoires *in vitro* et *in vivo* par rapport à sa

souche parentale (307). La protéine S273R quant à elle, interagit avec la protéine GSDMD pour la cliver, l'empêchant ainsi d'induire la pyroptose (299).

4. Autres voies cellulaires inhibées par l'ASFV

De nombreux virus sont capables de moduler les différentes voies cellulaires responsables de la mort cellulaire programmée, comme l'apoptose, la pyroptose et la nécrose. L'apoptose peut être subvertie de différentes façons. La destruction des cellules infectées est l'une des voies majeures de lutte contre les infections, puisque les virus ont alors leur cycle de réplication stoppé, diminuant de fait le nombre de virions produits. L'inhibition de l'apoptose est donc une étape primordiale pour de nombreux virus. Cependant, certains virus détournent aussi l'apoptose pour détruire les cellules du système immunitaire ou pour favoriser la lyse des cellules infectées, favorisant ainsi la dissémination virale (312). Dans le cas de l'ASFV, le virus semble en général pirater l'apoptose pour augmenter la survie cellulaire favorisant ainsi la réplication du virus dans la cellule infectée. Plusieurs protéines de l'ASFV comme A179L, A224L, DP71L, E199L, EP153R, et E152R ont ainsi été décrites comme étant anti-apoptotiques (211, 313) (Figure 18). A l'inverse, une fois la réplication effectuée, l'apoptose est induite par l'ASFV pour permettre notamment le recrutement des phagocytes, qui sont des cellules cibles du virus (314).

La protéine A179L partage des homologies structurales avec les protéines cellulaires de la famille des Bcl-2 *(B-cell lymphoma-2)* (315). Comme toute protéine de cette famille, A179L possèdent différents domaines BH1, BH2, BH3 et BH4. A179L est localisée dans les mitochondries et dans le RE (316). Elle est capable d'inhiber l'apoptose en se liant à des protéines pro-apoptotiques cellulaires telles que Bid ou Bax grâce à son domaine BH3 (317, 318).

La protéine A224L est un analogue de la famille des inhibiteurs de l'apoptose (IAP, *inhibitor of apoptosis*). La surexpression de A224L diminue l'apoptose induite par le TNFα, tandis que sa délétion l'accroit. A224L interagit avec le fragment protéolytique de la caspase 3 et inhibe sa fonction (319).

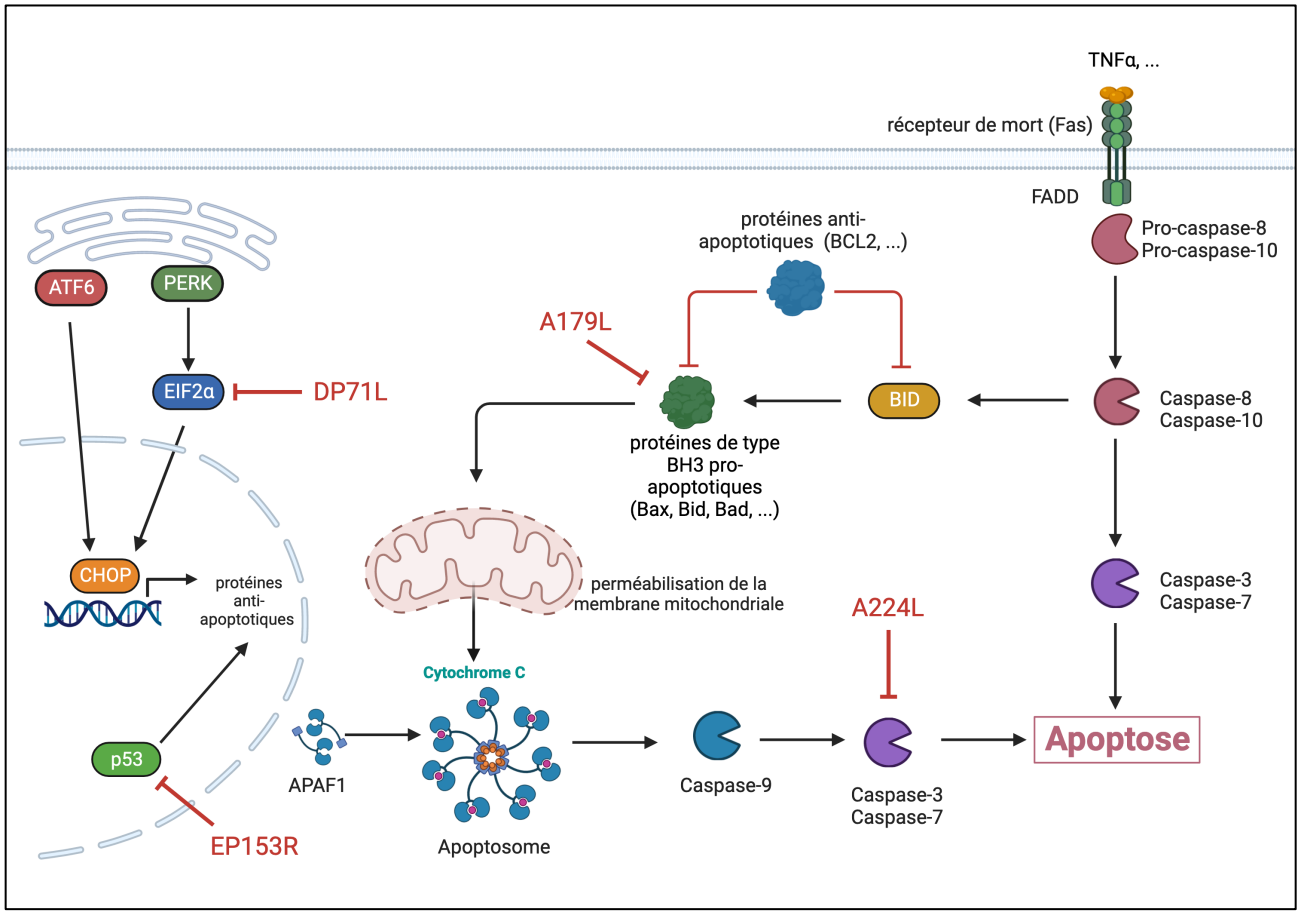


Figure 18: Mécanismes de l'inhibition de l'apoptose par l'ASFV.

Inspirée de Dixon et al., 2017 et Nogal et al., 2001 (211, 319). Les protéines virales inhibitrices sont représentées en rouge. Figure créée avec Biorender.

De plus, le stress cellulaire induit par une infection virale peut aboutir à la phosphorylation d'eIF2α, aboutissant ainsi à une diminution de la synthèse globale des protéines cellulaires. Son inactivation provoque également l'induction de l'apoptose et constitue ainsi une forme de défense antivirale contre les infections, puisque cela permet d'éviter que trop de particules virales ne soient produites. Or, la protéine DP71L recrute une phosphatase (PP1), permettant de déphosphoryler le facteur d'initiation de la traduction eIF2α, ce qui restaure la synthèse protéique globale de la cellule (123).

L'autophagie est une autre voie cellulaire impliquée dans l'homéostasie cellulaire et participe également à l'immunité antivirale. Par conséquent, il existe des protéines d'ASFV, comme A179L et E199L, capables de moduler l'autophagie. A179L interagit avec la Beclin 1 au niveau de son domaine BH3, empêchant ainsi la formation de l'autophagosome (316). A179L

et la Beclin 1 sont co-localisées au niveau de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique (320). L'ASFV est aussi capable d'inhiber l'autophagie en activant mTORC1, un inhibiteur de l'autophagie (321). Au contraire, la protéine virale E199L permet quant à elle l'activation de l'autophagie. Il semble donc exister une balance entre activation et inhibition de l'autophagie au cours de l'infection, dont les mécanismes ne sont pas encore très clairs.

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires, ils ont besoin de détourner la machinerie cellulaire à leur profit pour pouvoir effectuer leur cycle de réplication et échapper à la réponse de l'hôte. Cela se traduit par de nombreuses interactions entre les protéines virales et cellulaires qui peuvent être cartographiées afin de montrer quelles sont les voies cellulaires piratées et nécessaires à la survie du virus, à sa réplication et propagation, ainsi que les différentes fonctions de ses protéines virales.

L'ASFV code pour plus de 170 ORFs, dont une grande partie n'a pas encore été caractérisée. Pourtant, durant la dernière décennie, les connaissances sur l'ASFV se sont développées de façon tout à fait exponentielle. Jusqu'en 2013, seules 32 interactions étaient décrites pour l'ASFV, contre plus d'une centaine entre 2013 et 2023 (322), dont la grande majorité a été découverte au cours de ces deux dernières années. Il reste pourtant de nombreuses lacunes dans notre compréhension de la pathogenèse, du mode de réplication du virus et des mécanismes d'échappement à l'immunité. La connaissance des mécanismes explicatifs et interactions sous-jacentes au détournement des voies représente une ressource précieuse pour le développement de stratégies antivirales dont notamment les vaccins vivants atténués.

L'objectif de mon travail de thèse est d'identifier certains mécanismes moléculaires à l'origine du détournement de la machinerie cellulaire et pouvant expliquer l'échappement à la réponse immunitaire innée.

Pour atteindre cet objectif, nous avons effectué dans un premier temps un crible sans *a priori* pour rechercher les partenaires cellulaires des protéines virales de l'ASFV. Pour atteindre cet objectif, des cribles en double-hybride en levure (Y2H) ont tout d'abord été réalisés en utilisant cent protéines de la souche Georgia 2007/1, comme appâts contre une banque d'ADNc issus de macrophages alvéolaires de porc, les cellules cibles de l'ASFV. Une interaction a été ensuite étudiée plus en détail sur les plans biochimiques et fonctionnels. Puis

nous avons étudié la capacité de ces mêmes cent protéines de l'ASFV à inhiber individuellement la voie IFN-I, en utilisant des tests rapporteurs luciférase.

Parallèlement à ce travail de protéomique, nous nous sommes intéressés dans un deuxième temps au lien entre l'atténuation des souches de l'ASFV et la réponse IFN-I. En effet, différents travaux ont montré qu'il existe une étroite relation entre la capacité de certaines protéines virales à inhiber la réponse IFN-I et les processus d'atténuation et de virulence de l'ASFV, mais peu de mécanismes explicatifs ont été décrits, notamment sur le plan moléculaire. Nous avons ainsi caractérisé les réponses IFN-I à la suite d'infections parallèles réalisées *in vitro* entre une nouvelle souche atténuée (souche ASFV-989) et sa souche parentale très virulente Georgia 2007/1. Cette comparaison nous a conduit à identifier un nouveau facteur de virulence illustrant l'échappement de la réponse IFN-I par l'ASFV.

CHAPITRE 1 : Recherche des interacteurs cellulaires de l'ASFV

I. Introduction

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet européen « *ASFVint, Decoding a virus Achilles heel : the African swine fever virus interactome* ». Comme son nom l'indique, ce projet vise à dévoiler une partie de l'interactome de l'ASFV à l'aide de différentes techniques d'interactions protéines-protéines. En effet, l'ASFV code pour plus de 170 ORFs, dont la grande majorité n'est pas encore caractérisé. Parmi eux, cent ORFs ont été sélectionnés. Ce choix s'est porté sur les ORFs mal ou non caractérisés ainsi que des déterminants de la virulence, notamment ceux impliqués dans les voies de contrôle de la réponse IFN.

Pour commencer, une approche sans *a priori* à haut débit par double hybride en levure (Y2H) a été employée et les différents protéines sélectionnées ont été utilisés comme appâts pour cribler deux banques d'ADNc, l'une issue de macrophages alvéolaires porcins (les cellules cibles de l'ASFV), et l'autre issue d'une lignée cellulaire pulmonaire A549 (riche en facteurs de l'immunité innée). A l'issue de ces cribles, nous nous sommes particulièrement intéressés à un interacteur nommé BANF1, dont nous avons essayé de caractériser l'interaction. Dans une deuxième partie, un crible avec priori, ciblant la voie IFN-I, a été effectué.

Remarque : Dans le cadre d'une collaboration avec le Friedrich Loeffler Institut (FLI), certaines expériences (notamment de spectrométrie de masse) présentées dans ce chapitre ont été effectuées par le Dr. Katerzina Dolata. Cependant, tous les plasmides nécessaires à leurs essais ont été clonés puis partagés par notre équipe.

II. Matériels et méthodes

1. Clonage par recombinaison Gateway®

a. Principe

Le clonage Gateway® (Invitrogen) catalyse l'intégration de l'ADN d'intérêt par recombinaison homologue dans un vecteur en remplaçant un gène toxique pour *Escherichia coli*. Cette méthode est basée sur la capacité des bactériophages à intégrer du matériel génétique dans le génome des bactéries. Une PCR permet d'amplifier l'ORF souhaité et d'y flanquer aux extrémités 5' et 3' les sites de clonages attB1 et attB2 nécessaires pour la recombinaison. Puis, une première réaction homologue appelée « BP » permet de cloner les ORFs d'intérêt dans un vecteur « entrée ». Enfin, une seconde réaction de recombinaison appelé « LR » permet de transférer ces ORFs du vecteur « entrée » vers des vecteurs dits de « destination », compatibles avec le système Gateway® (Figure 19).

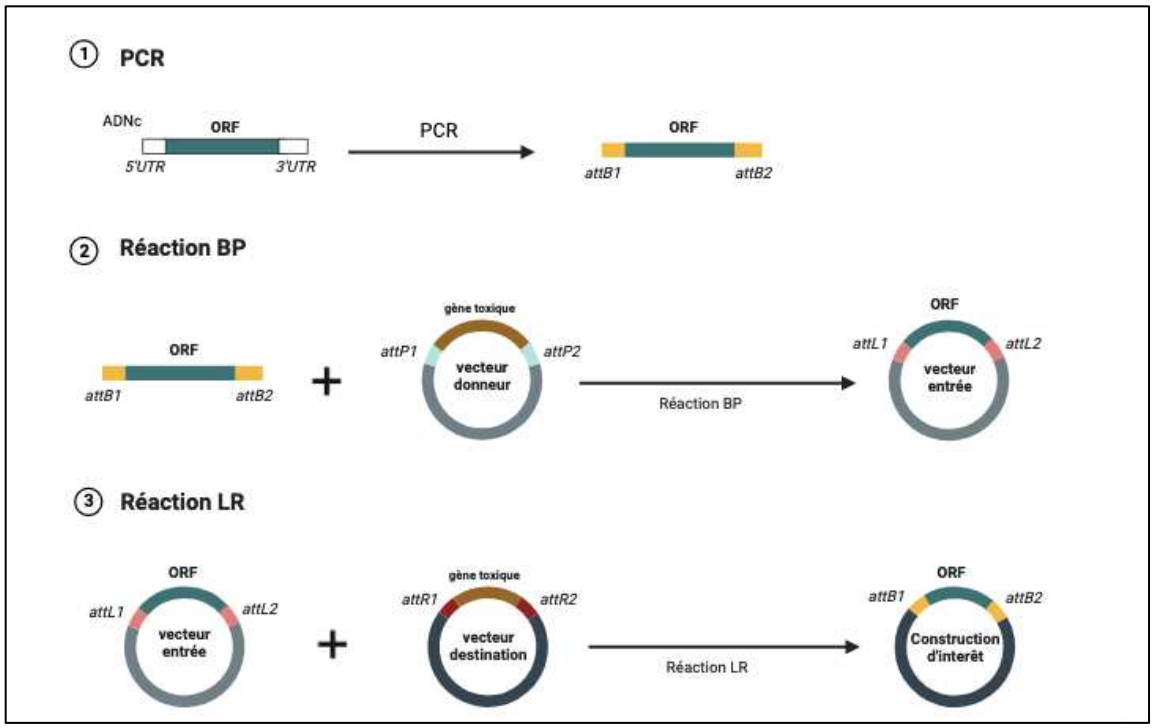


Figure 19 : Clonage par recombinaison Gateway

b. Clonage des ORFs viraux

Les 91 ORFs viraux ont été commandés directement dans des vecteurs « entrée » Twist (Twist Bioscience) compatibles avec le système Gateway. Une réaction de recombinaison en utilisant la LR clonase (Invitrogen) a été effectuée afin de transférer ces gènes dans le vecteur destination pPC97 (Invitrogen) contenant le domaine Gal4-DB. Puis, des bactéries compétentes NEB5α (New England Biolabs) ont été transformées avec le produit de recombinaison. Enfin, les constructions plasmidiques ont été purifiées en suivant les recommandations du kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) et les constructions ont été séquencées (Eurofins).

Tous les ORFs d'intérêt utilisés ont été clonés de la même façon dans différents vecteurs d'intérêt (3x-flag, GST, GFP, cherry, …).

c. Clonage des banques d'ADNc dans le vecteur pDEST22

Les clonages des banques d'ADNc dans un vecteur pDEST22 ont été réalisés en prestation de service par Life technologies pour la banque humaine et par Creative Biogene pour la banque porcine. Ces banques d'ADNc ont été faites à partir d'ARN issus de cellules pulmonaires A549 pour la banque humaine et d'ARN issus de macrophages alvéolaires de porc pour la banque porcine.

2. Le double hybride en levure

a. Principe

Le double-hybride (Y2H*, yeast two-hybrid system*) en levure est une technique mise au point à la fin des années 80 permettant d'identifier des interactions protéines-protéines (323). Le principe repose sur le fait que le domaine de liaison à l'ADN (DB) et le domaine activateur

de la transcription (AD) des facteurs de transcription (ici Gal4) sont physiquement séparés (324) et peuvent être réunis quand ils sont fusionnés à des protéines interagissant.

Une première souche de levure (Y2H *gold*) a été transformée avec un plasmide contenant l'ORF codant la protéine d'intérêt de l'ASFV fusionnée au domaine de liaison à l'ADN (DB) de Gal4 (= les appâts). Le plasmide porte également le gène *LEU2* permettant à la levure de pousser sur un milieu sélectif en absence de leucine (-L). Une deuxième souche de levure (Y187) a été transformée avec un plasmide contenant une banque d'ADNc ainsi que le domaine activateur de la transcription (AD) de Gal4 (= les proies). Ce plasmide contient aussi le gène *TRP1* nécessaire à la croissance de la levure sur un milieu dépourvu de tryptophane (-W). Les deux souches de levure chacune haploïde et de sexe opposé peuvent se conjuguer, permettant alors la réunification des deux plasmides au sein d'une même levure diploïde. En cas d'interaction entre les deux protéines (l'appât et la proie), les domaines AD et DB sont physiquement rapprochés. Cela permet de reconstituer le facteur de transcription Gal4, permettant ainsi la transcription du gène rapporteur, ici *HIS3*. Les levures peuvent alors pousser sur un milieu sélectif dépourvu d'histidine (-H). Cette sélection est optimisée par l'ajout d'un composé, le 3-AT (3-amino-1,2,4-triazole), toxique pour la levure et dégradé lorsque le gène *HIS3* est transcrit (325). Le principe du Y2H est illustré dans la Figure 20.

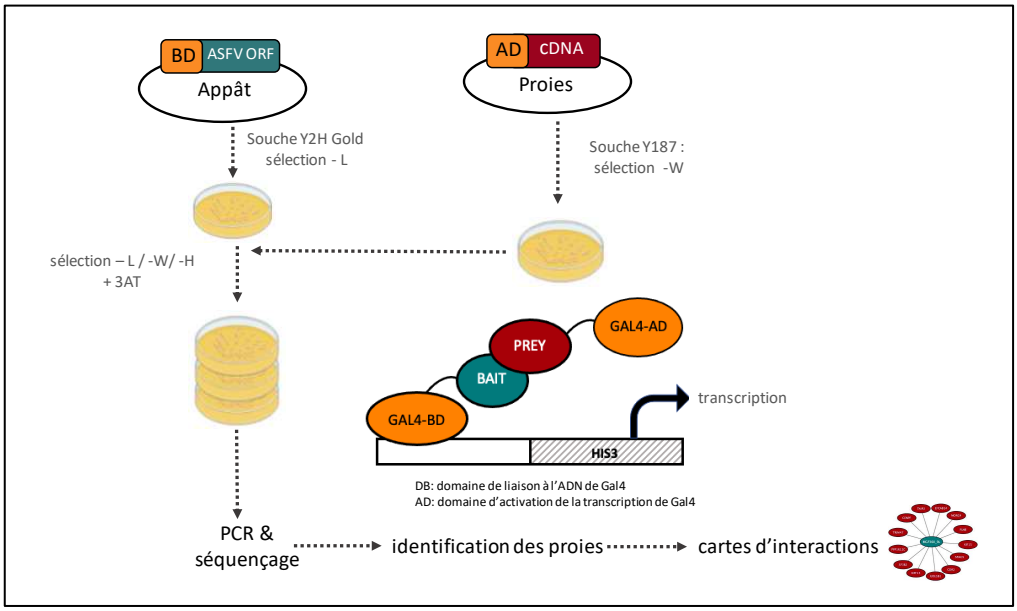


Figure 20 : Le Double hybride en levure

Inspirée de Vidalain et al., 2015 (325).

b. Transformation des levures avec les appâts

La souche de levure Y2H *Gold* a été transformée avec les appâts. En suivant les recommandations de (325), la transformation des levures commence par la mise en culture des levures Y2H Gold à 30°C sur la nuit dans du milieu YPD (Yeast extract Peptone Dextrose). Le lendemain, la densité optique (DO) à 600 nm des levures a été mesurée et ces dernières ont été diluées pour être à une DO de 0,4. Plusieurs étapes de lavage ont été effectuées, avec de l'eau puis avec une solution de TE/LiAC (Tris-HCl EDTA 1X pH 8, acétate de lithium 100 mM). Les levures ont ensuite été suspendues dans du TE/LiAC en présence de 2 µl d'ADN de sperme de saumon (préalablement dénaturé pendant 10 min à 100°C), de 250 ng de plasmide pPC97 (contenant un ORF viral + le domaine Gal4-DB) et de PEG (polyéthylène glycol 35 %, acétate de lithium 100 mM, Tris-HCl EDTA 1X pH 8) par transformation. Après une incubation de 45min à 30°C, un choc thermique de 15 min pour les appâts à 42°C a permis de perméabiliser les membranes des levures, permettant ainsi l'entrée des plasmides. Enfin, les levures ont été centrifugées éliminant ainsi le PEG et diluées dans de l'eau, pour être étalées sur un milieu dépourvu de leucine (-L). Les levures ont poussé dans un incubateur à 30°C pendant cinq jours.

Après la pousse des levures, un test d'auto-activation a été effectué, pour savoir si l'appât seul est capable de pousser dans un milieu sélectif en absence de proie. Cela permet de connaitre la quantité de 3-AT nécessaire pour chaque appât lors des cribles. Ainsi, chaque colonie de levure contenant les appâts a été resuspendue dans de l'eau, puis déposée sur un milieu sélectif (sans leucine et sans histidine) contenant des quantités croissantes de 3-AT (5 mM, 10 mM, 20 mM ou 50 mM), pour enfin être incubée à 30°C pendant plusieurs jours.

c. Transformation des levures avec la banque d'ADNc

Deux banques d'ADNc différentes ont été utilisées lors de nos cribles : une humaine issue de cellules épithéliales pulmonaires A549 et l'une porcine issue de macrophages alvéolaires de porcs (préparés par l'unité Virologie Immunologie Porcine, ANSES). La transformation en levure de la banque humaine a été faite préalablement à mon arrivée dans l'équipe.

Une souche Y187 a été utilisée pour transformer la banque d'ADNc porcine. La souche de levure Y187 a été mise en culture à 30°C sur la nuit dans du milieu YPD. La DO à 600 nm a été mesurée et différents lavages à l'eau puis au Te/LiAc ont été effectués. Les levures ont été resuspendues dans ce même milieu, en ajoutant 150 µg de banque d'ADNc-Gal4-AD, 500 µL d'ADN de sperme de saumon préalablement dénaturé ainsi qu'une solution de PEG. Les levures ont été incubées pendant 45 min à 30°C, puis un choc thermique de 20 min à 42°C a été effectué. Différentes étapes de lavages et de centrifugation ont permis d'éliminer le PEG. Puis, les levures ont été resuspendues et étalées sur 148 boîtes d'un milieu dépourvu de tryptophane (-W).

d. Cribles en double hybride en levure (Y2H)

Le protocole décrit dans (325) a été suivi pour la réalisation de ces cribles Y2H. La souche de levure YH2 *Gold* préalablement transformée avec un appât (= un ORF viral) a été mise en culture dans 25 mL de milieu YPD liquide, toute la nuit, sous agitation à 30°C. Le lendemain, la DO à 600 nm a été mesurée et le volume nécessaire a été prélevé (V= 72/DO). La souche Y187 contenant la banque d'ADNc a été décongelée, diluée dans 10 mL de milieu YPD et incubée pendant 10 min à 30°C. Puis, les deux souches ont été mélangées et centrifugées. Le culot de levure a été repris dans 1,5 mL de milieu YPD puis étalé sur trois boites de gélose contenant un milieu YPD solide. Enfin, ces boites ont été mises à incuber pendant 4h30 à 30°C, permettant la conjugaison des deux souches. Après cette incubation, les levures ont été récoltées avec de l'eau puis étalées sur dix boîtes de milieu sélectif (-L, -W, -H, + 3-AT) permettant de sélectionner les interactions. Les levures ont aussi été étalées sur une boîte contenant un milieu dépourvu de leucine et de tryptophane mais possédant de l'histidine, permettant ainsi d'évaluer le nombre de diploïdes générés pendant le crible. Particulièrement cruciale, cette étape permet de savoir si chaque proie potentielle est testée pour interagir avec notre appât, donc de connaitre la couverture de la complexité de la banque d'ADNc. Les boites de gélose ont été incubées pendant cinq jours à 30°C. Enfin, les clones ayant poussé sur nos dix boîtes ont été repiqués en série sur un milieu sélectif -L, -W, -H, + 3-AT (pendant trois

semaines à raison de deux fois par semaine), permettant ainsi l'élimination des proies satellites pouvant contaminer les colonies de levure et mener ainsi à des faux positifs.

e. Identification des proies

Afin d'identifier quelle proie participe à l'interaction, une PCR sur levure a été effectuée. Une première étape consiste à utiliser une enzyme, appelée zymolyase, permettant de lyser la membrane des levures. Pour ce faire, chaque clone de levure a été resuspendu dans une solution de zymolyase à 2,5 mg/mL pendant 5 min à 37 °C puis 5 min à 95 °C. Puis une PCR a été effectuée, permettant d'amplifier n'importe quel ADNc participant à l'interaction grâce à des amorces correspondant au plasmide pDEST22. La polymérase Terra PCR direct (Takara) et le programme 2 min à 98°C puis 35 cycles contenant 10 s à 98°C, 15 s à 62°C et 5 min à 68°C ont été utilisés. La présence des produits de PCR a ensuite été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose (1%), puis ces derniers ont été séquencés (Eurofins).

Afin d'identifier le nom de la proie correspondant à la séquence trouvée, un BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) automatique a été mis en place par l'unité Génétique Virale et Biosécurité de l'ANSES. Ce BLAST est dirigé contre différentes banques (ENSEMBL, GenBank, Uniprot) en sélectionnant l'espèce (porc ou humain) selon la banque d'ADNc initialement utilisée. Puis le logiciel Cytoscape a permis de créer les cartes d'interactions.

3. Co-purification d'affinité par GST pull down

a. Principe

Afin de valider les interactions identifiées à l'issue des crible Y2H, une méthode de co-purification d'affinité par GST pull-down a été utilisée. Pour cela, les protéines d'intérêt (virales ou cellulaires) ont été clonées à l'aide de la méthode de clonage Gateway dans un vecteur destination contenant soit une étiquette GST *(Glutathion S-Transferase)* ou 3x-flag. Les deux plasmides codant pour les deux protéines ont été coexprimés dans des cellules HEK-

293T (*Human Embryonic Kidney*). Puis, la protéine appât fusionnée à l'étiquette GST a été purifiée à l'aide de billes de glutathion-sépharose. En cas d'interaction, la proie précipite aussi et peut être révélée par *Western-blot* utilisant un anticorps dirigé contre son étiquette 3x-flag.

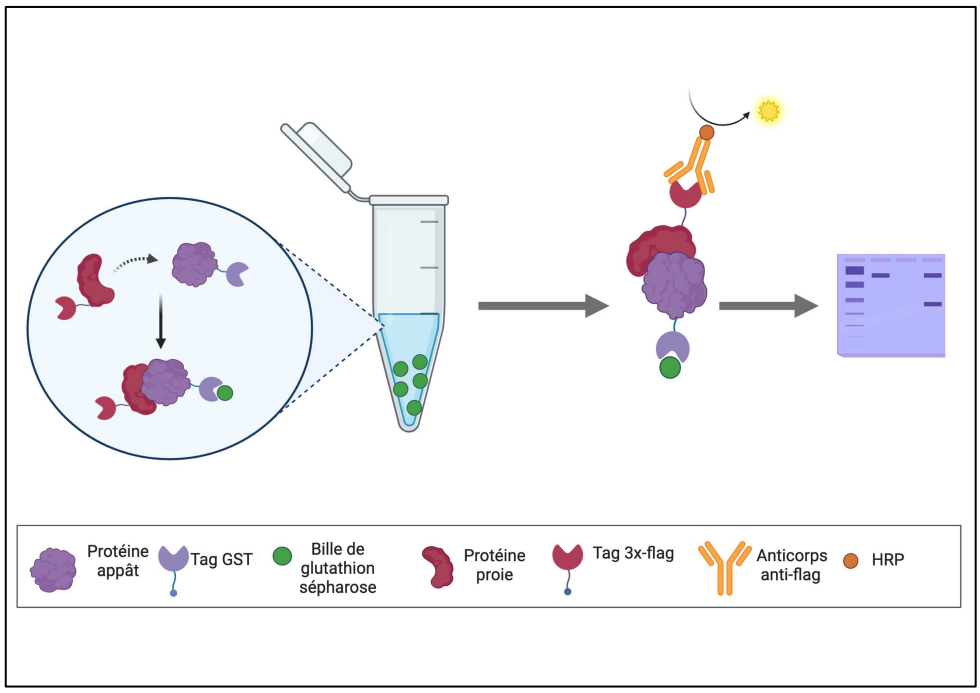


Figure 21 : Copurification d'affinité par GST pull down

b. Culture cellulaire et transfection

Les cellules HEK-293T ont été maintenues dans un milieu DMEM + Glutamax (Fisher) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Eurobio), 1 mM de pyruvate de sodium (Fisher) et 1 % de pénicilline-streptomycine (Fisher). Elles ont été cultivées à 37 °C dans un incubateur à 5 % de CO_2. Ces cellules ont été ensemencées en plaques de culture six puits à raison de deux millions de cellules par puits. Vingt-quatre heures après, les cellules ont été transfectées avec 500 ng de chaque plasmide contenant les protéines d'intérêt fusionnées avec le tag GST ou 3x-flag, en utilisant le jetPRIME (Polyplus transfection, Ozyme) comme agent transfectant, puis mises à incubation pendant 36h.

c. Co-purification

Les cellules ont été récupérées à l'aide de PBS 36h après la transfection. Après une centrifugation, le culot cellulaire a été repris dans un tampon de lyse (20 mM MOPS, 120 mM KCl, 2 mM β-mercaptoéthanol, 0,5% NP40, pH 7,4) complémenté en anti-protéases (Merck). Après 20 min de lyse à 4°C, une centrifugation a permis de séparer les débris cellulaires (culot) du lysat (surnageant). Une partie du lysat a été conservée, afin de contrôler la présence des protéines dans les lysats totaux lors de la révélation. Les billes de glutathion sépharose ont ensuite été lavées trois fois à l'aide du tampon de lyse puis mises en solution avec le reste du lysat pendant deux heures sur roue à 4°C. Enfin, après trois étapes de centrifugation et de lavage, les billes ont été reprises dans un tampon de charge 2x (Bleu NuPage 4X (Life technologies) supplémenté en agent réducteur 10X (Life technologies) et eau), de même que la partie du lysat préalablement conservée.

d. Western Blot

Les lysats protéiques ont tout d'abord été dénaturés (5 min à 95°C en bain sec) puis ont été déposés sur un gel de polyacrylamide (Bolt 4-12% Bis-Tris plus, Invitrogen) en présence du marqueur de poids moléculaires *Precision plus protein* (Biorad). Les protéines ont été séparées par électrophorèse à 120V pendant environ 45 min dans du tampon MOPS (Invitrogen). Les protéines ont ensuite été transférées sur des membranes de nitrocellulose en milieu liquide (Transfert buffer Novex Bolt 20x + éthanol 96° 20% + antioxydant) pendant environ 1 h. Les membranes ont été bloquées pendant 1 h dans un mélange de lait-PBS-tween (Phosphate-Buffered Saline, 5% lait, 0,1 % de Tween-20). Puis les anticorps anti-GST (1/5000ème, Ozyme) ou anti-3x-flag (1/10000ème, Merck) directement couplés à la HRP (*Horseradish Peroxidase)* ont été dilués dans ce tampon de blocage et les membranes ont été incubées sur la nuit à 4°C. Le lendemain, trois lavages ont été effectués à l'aide d'un tampon PBS-tween et les protéines ont été révélées grâce au substrat Clarity Western ECL Substrate (Biorad) et au Chemidoc imaging systeme (Biorad).

4. Colocalisation par microscopie confocale

La microscopie confocale à fluorescence permet de connaitre la localisation subcellulaire de certaines protéines mais en plus d'évaluer si des protéines interagissant potentiellement peuvent colocaliser. Les gènes viraux d'intérêt (A151R et MGF360-21R) ont été clonés avec la stratégie de clonage Gateway dans un vecteur exprimant la GFP (pDEST-EmGFP-vivid colors). Le gène cellulaire BANF1 a quant à lui été cloné dans un vecteur exprimant la cherry (pmCherry).

Des cellules IBRS-2 (*Instituto Biologico-Rim Suino-2*), dérivées de cellules épithéliales de rein de porcs ont été utilisées pour ces expériences de microscopie. Ces cellules ont été cultivées dans un milieu MEM (Fisher) supplémenté en 1,5% hydrolysat de lactalbumine (Sigma), 7% SVF (Eurobio), 1% pénicilline-streptomycine (Fisher) et 2,5% Hepes (Fisher) et maintenues à 37 °C dans un incubateur à 5 % de CO_2. Les IBRS-2 ont été ensemencées dans des plaques 24 puits (Ibidi), avec 100 000 cellules par puits. Vingt-quatre heures après, ces cellules ont été transfectées avec des plasmides codant les protéines virales fusionnées à la GFP, et/ou avec le plasmide exprimant la protéine cellulaire BANF1 fusionnée au tag cherry. Cette étape de transfection a été effectuée à l'aide de l'agent transfectant Jet Prime Optimus (Polyplus transfection, Ozyme), en suivant les recommandations du fabriquant. Quarante-huit heures après la transfection, les cellules ont été lavées dans du PBS, puis fixées grâce une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4% (Euromedex). Après différentes étapes de lavage, un tampon de *quenching* (PBS 1X-Glycine 0.1M) a été utilisé afin d'inhiber l'autofluorescence des cellules. Du Hoechst (Fisher) dilué au 1/10000ème dans du PBS a été utilisé pour marquer les noyaux des cellules. Après plusieurs lavages au PBS, les cellules ont pu être visualisées grâce à un microscope confocal (Leica) à objectif x40.

5. Fragmentome

a. Principe

Le fragmentome permet de cartographier les domaines minimums d'interaction entre deux protéines. La méthode dite par « *gap repair* » permet de tester des interactions en double-hybride en levure à partir de séquences appâts et proies connues. Elle utilise la capacité des levures à faire des recombinaisons homologues, ici entre un produit de PCR (nos fragments) et un plasmide linéarisé. La forme entière de A151R est testée contre tous les différents fragments de BANF1. De même, la forme entière de BANF1 est testée contre tous les fragments de A151R.

b. Construction des différents fragments

Des amorces sens et antisens ont été conçues de façon à découper BANF1 et A151R du côté amino-terminal et du côté carboxy-terminal. BANF1 a été découpée tous les douze acides aminés, tandis qu'A151R a été découpée tous les vingt-cinq acides aminés.

Tableau 6 : Découpage de la protéine BANF1

1_89	1_77	1_65	1_53	1_41	1_29	1_17
17_89	17_77	17_65	17_53	17_41	17_29	
29_89	29_77	29_65	29_53	29_41		
41_89	41_77	41_65	41_53			
53_89	53_77	53_65				
65_89	65_77					
77_89						

Les chiffres représentent le numéro de l'acide aminé des bornes des fragments découpés

Tableau 7: Découpage de la protéine A151R.

1_151	1_125	1_100	1_75	1_50	1_25
25_151	25_125	25_100	25_75	25_50	
50_151	50_125	50_100	50_75		
75_151	75_125	75_100			
100_151	100_125				
125_151					

Les chiffres représentent le numéro de l'acide aminé des bornes des fragments découpés

Une PCR a été effectuée, en utilisant la polymérase Hot Star Taq (Qiagen), avec un cycle de 15 min à 95°C, puis 35 cycles de 30s à 94°C, 30 s 60°C, 1 min/kb à 72°C, puis 10 min à 72°C.

c. Transformation des levures

Tout d'abord des levures de la souche de levure YH2 Gold ont été transformées d'une part avec le vecteur A151R-pPC97 (GAL4-DB) et d'autre part avec le vecteur BANF1-pPC86 (GAL4-AD), puis respectivement étalées sur des milieux sélectifs -L et -W.

Les fragments de A151R générés lors de la PCR ont été ensuite introduits dans le vecteur linéarisé pPC97 (Gal4-DB) par recombinaison homologue dans la levure exprimant BANF1 fusionnée à Gal4-AD. Tandis que les fragments de BANF1 ont été introduits dans le vecteur linéarisé pPC86 (GAL4-AD) dans la levure exprimant A151R-GAL4-AD. Les levures sont sélectionnées sur un milieu -L, -W et dépourvu d'histidine + 3-AT pour révéler les interactions.

6. Tests rapporteurs luciférase

Deux tests rapporteurs luciférase ont été utilisés. L'un appelé IFNβ-luc permet d'évaluer l'action individuelle des protéines virales sur la voie d'induction de l'IFN-I. L'autre, nommé ISRE-luc permet d'évaluer la réponse IFN en aval des récepteurs IFNAR. Le plasmide IFNβ-luc est composé d'un gène codant la *Firefly* Luciférase sous le contrôle du promoteur IFNβ. Le plasmide ISRE-luc est composé d'un promoteur minimal en amont duquel a été cloné 5

séquences ISRE (*IFN-stimulated response element)* (Agilent). La quantité de luciférase émise est mesurable et considérée comme proportionnelle à l'état d'activation du promoteur. Le plasmide rapporteur pCMV-renilla codant pour la *Renilla* Luciferase a été utilisé pour normaliser les résultats, ce qui nous permet de nous affranchir des variabilités liées au nombre de cellules et à l'efficacité de transfection.

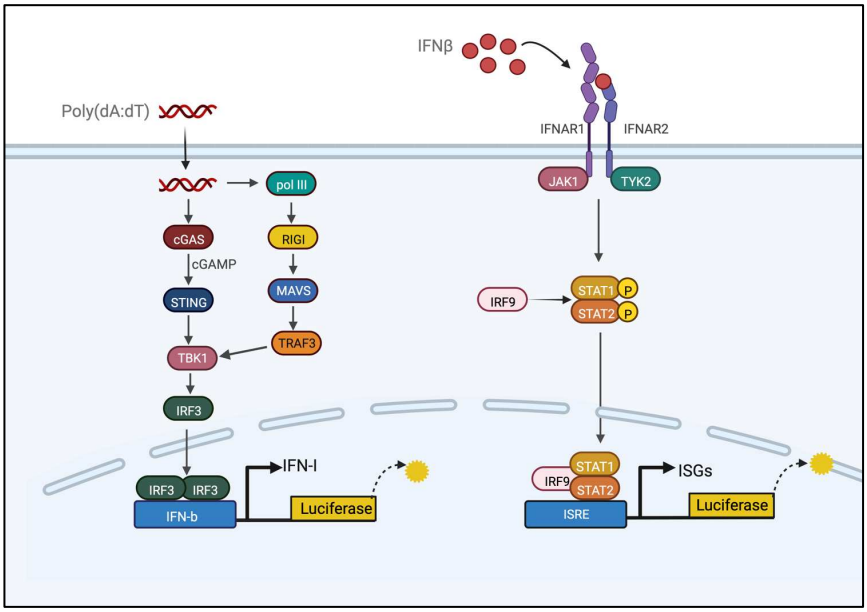


Figure 22 : Tests rapporteurs IFN-β et ISRE-luciférase.

Des cellules HEK-293T ont été cultivées comme décrit précédemment. Ces cellules ont été ensemencées en plaques de culture vingt-quatre puits à raison de 500 000 cellules par puits. Pour les tests rapporteurs IFNβ-luc, les cellules ont été transfectées 24 h après à l'aide de jetPRIME (Polyplus transfection, Ozyme) avec 300 ng de chaque plasmide codant les protéines virales, 300ng de plasmide IFNβ-luc, 30 ng de pCMV-renilla ainsi qu'avec 100 ng de poly(dA:dT) (Invitrogen) ou 300ng de NΔ-RIGI, 300 ng de TBK1, 300ng d'IRF3-5D ou 250 ng de cGAS + 250 ng de STING permettant de stimuler la voie IFN. NΔ-RIG-I et IRF3-5D correspondent aux formes constitutivement actives de RIG-I et IRF3. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 36h à 37 °C et 5 % de CO_2. Pour le test rapporteur ISRE-luc, les cellules ont été transfectées avec 300 ng de plasmides exprimant les protéines virales, 300 ng de plasmide codant le gène rapporteur ISRE-luc et 30 ng de pCMV renilla. Vingt-quatre heures après, les

cellules ont été stimulées avec 1000 UI/mL d'IFNβ humain recombinant (PBL Assay Science) pendant 18h à 37 °C et 5 % de CO_2.

Pour finir, les cellules ont été d'abord lysées (Passive lysis buffer, Promega) puis mises en présence d'un substrat spécifique pour mesurer les productions de Firefly luciférase (Bright-Glo, Promega) et de *Renilla* luciférase (Renilla-Glo, Promega). Ces mesures sont effectuées à l'aide d'un luminomètre (Glo-Max, Promega).

7. Évaluation de la quantité d'IFNβ par RT-qPCR

Afin d'évaluer l'effet inhibiteur de nos protéines virales sur la voie d'induction d'IFN-β en cellules porcines, une RT-qPCR (*quantitative real time polymerase chain reaction*) a été utilisée. Pour ce faire, des cellules PK15 (*Porcine Kidney-15*) ont été cultivées dans un milieu DMEM + Glutamax (Fisher) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Eurobio), 1 mM de pyruvate de sodium (Fisher), 1 % de pénicilline-streptomycine (Fisher) et 1% d'acide aminées non essentiels (Fisher). Elles ont été cultivées à 37 °C dans un incubateur à 5 % de CO_2. Ces cellules ont été ensemencées en plaques de culture vingt-quatre puits à raison de 500 000 cellules par puits. Vingt-quatre heures après leur mise en plaque, les cellules ont été transfectées avec 300ng de plasmide codant les protéines virales ainsi qu'avec 1 µg d'ISD (*interferon stimulatory DNA*, Invitrogen). L'ISD permet de stimuler spécifiquement l'axe STING-TBK1-IRF3. Cette transfection a été effectuée grâce à l'agent transfectant Jet Prime Optimus (Polyplus transfection, Ozyme). Trente-six heures après, les ARNs ont été extraits à l'aide du kit RNAeasy (Qiagen) en respectant les recommandations du fabriquant. Puis une RT-qPCR (QuantiNova SYBR Green RT-PCR kit, Qiagen) a été effectuée permettant ainsi de mesurer l'expression du gène codant l'IFN-β porcin.

Toutes les séquences des amorces utilisées sont répertoriées en Annexe 1.

8. siARN

Des cellules HEK-293T ont été ensemencées comme décrit précédemment. Au même moment, 2 nM de siARNs (siPOOL Biotech) dirigés contre la séquence de BANF1 ont été transfectés à l'aide de Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen). Vingt-quatre heures après, les cellules ont été transfectées avec 250 ng de cGAS + 250 ng de STING (Invitrogen) ou 100 ng de poly(dA:dT) (Invitrogen), ainsi qu'avec 300 ng de plasmides codant les protéines virales, 300 ng de plasmide IFNβ-luc et 30 ng de pCMV-renilla. Vingt-quatre heures après, la révélation du test rapporteur luciférase a été effectuée comme décrit précédemment.

L'efficacité de l'extinction du gène BANF1 a été évaluée par RT-qPCR. Pour ce faire, les ARNs ont été extraits à l'aide du kit RNAeasy (Qiagen) en respectant les recommandations du fabriquant. Puis une RT-qPCR (QuantiNova SYBR Green RT-PCR kit, Qiagen) a été effectuée permettant ainsi de mesurer l'expression du gène codant BANF1.

III. Résultats

1. Identifications des interactions par Y2H

Pour cartographier à grande échelle les interactions entre les protéines du virus et celles de l'hôte, nous avons utilisé des cribles double-hybride en levure. Dans le cadre du projet « ASFVint », cent protéines de la souche très virulente Georgia 2007/01 de l'ASFV ont été sélectionnées afin d'être utilisées comme appâts lors des cribles Y2H. Ces cribles ont été effectués en utilisant une banque d'ADNc produite à partir de macrophages alvéolaires porcins, correspondant aux cellules cibles du virus. Cependant, 22 protéines virales ont également été criblées contre une banque d'ADNc produite à partir de cellules humaines A549 (déjà présente au laboratoire). En dépit du fait que ces cellules n'ont pas été décrites comme étant permissives à l'ASFV, cette banque nous a permis de commencer les cribles en attendant d'obtenir la banque d'ADNc porcine produite en prestation de service (Creative Biogene). Ces 22 gènes ont été décrits comme étant des facteurs de virulence, particulièrement importants dans la pathogénicité du virus et leur délétion aboutit bien souvent à une atténuation de la souche. Pourtant, peu de mécanismes explicatifs et d'interactions sous-jacentes avaient été montrés, permettant d'expliquer leur action. Il nous paraissait ainsi particulièrement pertinent de commencer nos cribles avec ces appâts.

Dans un premier temps, les différents ORFs viraux ont été clonés dans le vecteur pPC97 codant pour le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (GAL4-DB) à l'aide du clonage par stratégie Gateway. Quant à la banque d'ADNc de porc, elle a été acquise déjà clonée au sein du vecteur pDEST22 contenant le domaine activateur de la transcription de GAL4 (GAL4-AD). Les plasmides pPC97 codant pour les ORFs viraux ont été transformés au sein de la souche de levure Y2H Gold, puis nous avons testé l'auto-activation de chacun de nos appâts. Parmi les cent appâts testés, seule la protéine MGF505-3R a la capacité d'activer seule la transcription du gène rapporteur *HIS3* et d'induire la pousse des levures à 5 mM et 20 mM de 3-AT mais pas à 50 mM. Celle-ci sera donc criblée à 50 mM de 3-AT contre 5 mM pour les appâts n'auto-activant pas (Figure 23). En parallèle, les banques d'ADNc ont été transformées dans la souche

Y187. Celle issue de cellules humaines A549 avait déjà été produite avant mon arrivée au laboratoire, je n'ai donc participé qu'à la mise en levure de la banque porcine. La complexité de cette dernière a été évaluée à 2 millions de transformants (= nombre de clones sur une boîte de levure x nombre de boîtes).

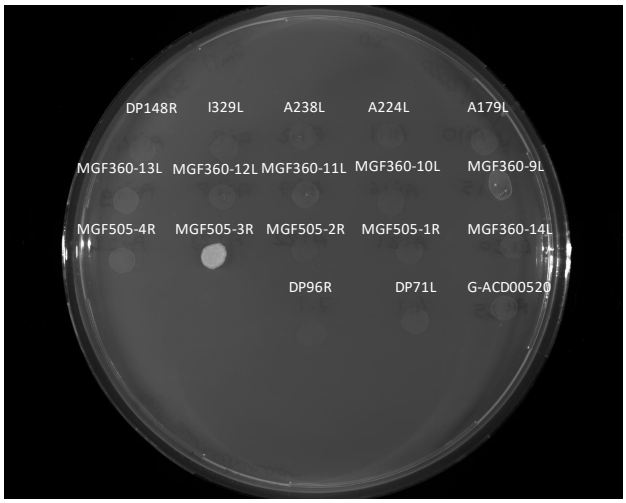


Figure 23 : Test d'auto-activation des appâts viraux.

Un test d'auto-activation des appâts a été effectué en transformant nos différents appâts dans la souche Y2H Gold en présence de quantité croissante (5-20-50 mM) de 3-AT. Ici, exemple du test d'auto-activation de quelques appâts sur boîte -L, -W + 3-AT 5 mM.

122 cribles en double hybride ont été réalisés au total (100 contre la banque porcine et 22 contre la banque humaine), en utilisant nos 100 protéines virales comme appât. Pour les cribles contre la banque humaine, le nombre de diploïdes (= nombre d'interactions testées) générés lors de nos cribles a été estimé à > 15,6 millions, correspondant à cinq fois la complexité de la banque. Chaque proie cellulaire a ainsi été testée en moyenne 5 fois pour interagir avec l'appât viral d'intérêt. Pour les cribles contre la banque porcine, le nombre de diploïdes a été évalué au minimum à 8 millions, recouvrant ainsi 4 fois la complexité de la banque.

A l'issu des cribles effectués contre la banque humaine, nous avons identifié des interactions potentielles (= nombre de clones) pour 50% des cribles (11/22) avec entre 4 et 1335 clones par appât (Tableau 8, Annexe 2). Pour ceux effectués avec la banque porcine, seuls 20% des cribles ont donné naissance à des clones, avec entre 2 et 2000 clones par appât (Tableau 9, Annexe 3). Au total, plus de 7200 clones ont été générés. Parmi eux, seuls 2130

ont été sélectionnés pour être analysés. En effet, l'appât R298L pour la banque humaine ainsi que MGF360-6L, MGF360-21R, A151R et MGF360-9L pour la banque porcine ont donné de trop nombreux clones pour être tous sélectionnés. Parmi eux, nous avons ainsi choisi arbitrairement environ 200 clones par appâts, que nous pensions être représentatifs de l'intégralité des clones (des clones de différentes tailles ont été choisis). Tous les clones sélectionnés ont été repiqués pendant trois semaines à raison de deux fois par semaine permettant ainsi d'éliminer les potentielles proies satellites ne participant pas à l'interaction.

A l'issu des repiquages, une PCR sur levure a été effectuée sur chacun des clones afin d'amplifier l'ADNc correspondant à la proie participant à l'interaction, puis les produits de PCR ont été séquencés (Eurofins). Enfin, un BLAST automatique a été effectué pour identifier le nom de l'interacteur cellulaire participant à l'interaction, permettant ainsi de comparer les séquences des proies vis à vis de séquences de références spécifiques au porc ou à l'humain. Cette analyse nous a permis d'identifier 70% (1480/2130) des partenaires cellulaires trouvés lors des cribles (Figure 24). Ainsi, 30% des interacteurs n'ont pas pu être identifiés. Cela peut s'expliquer par une mauvaise amplification de l'ADN lors de la PCR ou par une mauvaise qualité de la séquence obtenue lors du séquençage. Un filtre statistique a été ensuite appliqué pour conserver uniquement 88 interacteurs identifiés au moins deux fois par appât (Annexe 4) permettant ainsi d'éliminer la plupart des faux positifs. En effet, il a été démontré que 80 % des interactions identifiées deux fois ou plus en Y2H peuvent être validées par d'autres techniques expérimentales comme la co-purification d'affinité par exemple (326). Les différentes interactions sont représentées dans la Figure 25 sous forme d'une carte à l'aide du logiciel Cytoscape.

Tableau 8: Nombre de clones ayant poussé lors des cribles effectués contre la banque humaine d'ADNc.

Appâts	Nombre de clones
R298L	1335
MGF360-13L	159
MGF360-9L	152
MGF505-3R	187
MGF360-12L	139
MGF505-9R	118
MGF360-11L	41
I267L	34
DP148R	13
DP71L	10
A224L	4

Le nombre de clones trouvés lors des cribles contre la banque humaine sont représentés en face du nom de l'appât avec lesquels ils ont été trouvés. Seuls les appâts pour lesquels des clones ont été trouvés sont représentés ici. La liste complète des appâts criblés contre la banque humaine est représentée en Annexe 2.

Tableau 9: Nombre de clones ayant poussé contre la banque porcine d'ADNc.

Appâts	Nombre de clones	Appâts	Nombre de clones
MGF360-6L	2000	**B407L**	19
MGF360-21R	1000	**I8L**	13
A151R	978	**DP238L**	6
MGF360-9L	487	**R298L**	5
MGF100-1R	218	**MGF505-3R**	5
MGF100-3L	170	**I226R**	5
MGF505-9R	35	**S183L**	4
MGF360-1Lb	34	**EP296R**	2
EP424R	30	**MGF360-13L**	2
C315R	26	**C962R**	1

Le nombre de clones trouvés lors des cribles contre la banque porcine sont représentés en face du nom de l'appât avec lesquels ils ont été trouvés. Seuls les appâts pour lesquels des clones ont été trouvés sont représentés ici. La liste complète des appâts criblés contre la banque porcine est représentée en Annexe 3.

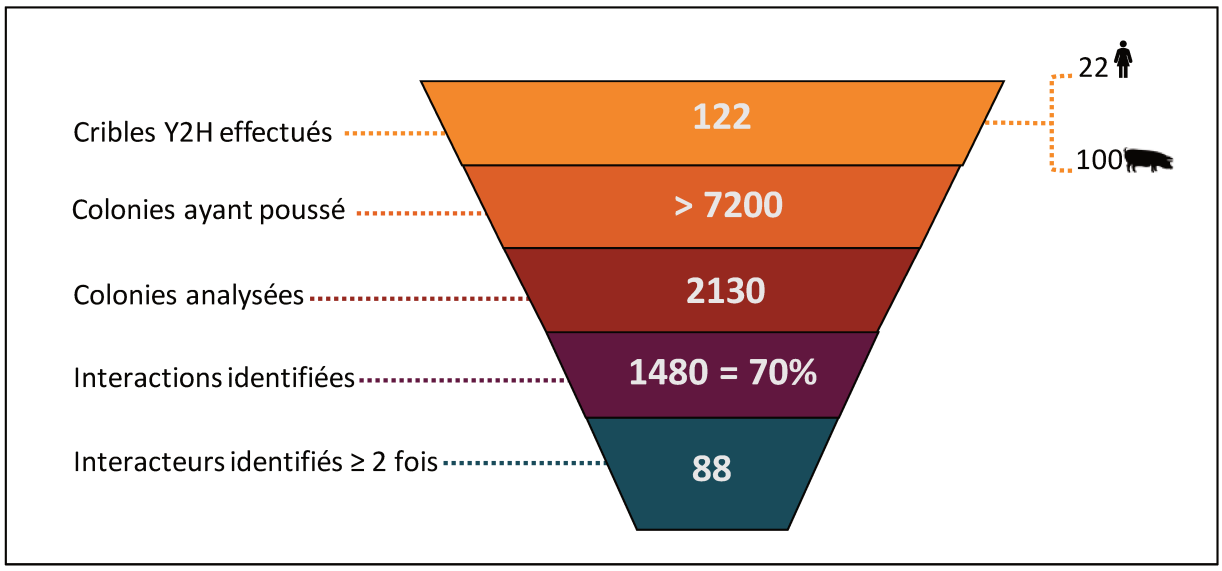


Figure 24 : Résumé des cribles en Y2H, contenant les résultats trouvés à chaque étape des cribles.

Parmi ces interacteurs identifiés deux fois ou plus (Figure 25), il est particulièrement frappant de remarquer la sur-représentation des interacteurs trouvés avec la banque humaine par rapport à ceux identifiés avec la banque porcine alors que cinq fois moins de cribles ont été effectués avec la banque humaine par rapport à la banque porcine. Sept interacteurs ont été trouvés en commun entre les deux banques (NME1/NME2, CLTC, RPL35A, PPP1R12C, RPS28, NME1, NME2).

Afin de connaitre dans quels modules fonctionnels de la cellule les interacteurs identifiés sont impliqués, une analyse de GO (*Gene Ontology*) terms a été effectuée à l'aide du logiciel « *Panthers classification system* ». L'utilisation du logiciel Revigo a permis d'élaguer les GO terms redondants. Les vingt GO terms les plus enrichis au sein de notre liste d'interacteurs sont représentés dans la Figure 26. Cette analyse nous a permis de mettre en évidence un nombre importants de GO terms en lien avec l'immunité et plus particulièrement les infections virales mais aussi avec la traduction et l'organisation cellulaire (Annexe 5). Cette analyse nous permet ainsi d'émettre des hypothèses sur les principaux modules fonctionnels de la cellule qui pourraient être piratés par l'ASFV, ce qui correspond d'ailleurs aux processus classiquement modulés dans le cadre des infections virales. Il ne faut cependant pas oublier

qu'une validation fonctionnelle est nécessaire afin de savoir si les interactions identifiées sont biologiquement pertinentes.

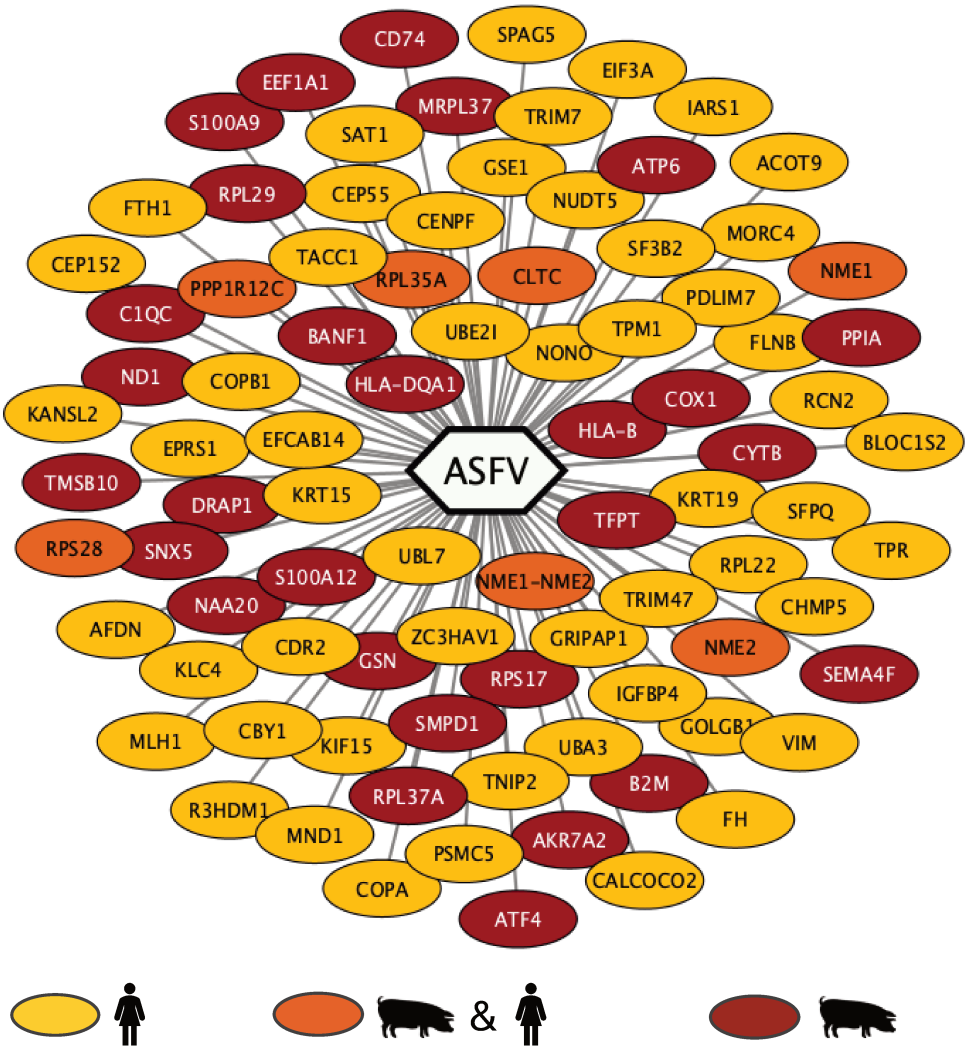


Figure 25 : Carte d'interaction représentant les interacteurs cellulaires trouvés lors des cribles Y2H.

Les cercles colorés représentent les interacteurs. Seuls les interacteurs cellulaires trouvés deux fois et plus par appât sont représentés ici. En jaune : les interacteurs identifiés exclusivement avec la banque humaine. En rouge : les interacteurs identifiés exclusivement avec la banque porcine. En orange : les interacteurs identifiés à la fois avec la banque humaine et la banque porcine. Carte crée avec l'aide du logiciel Cytoscape.

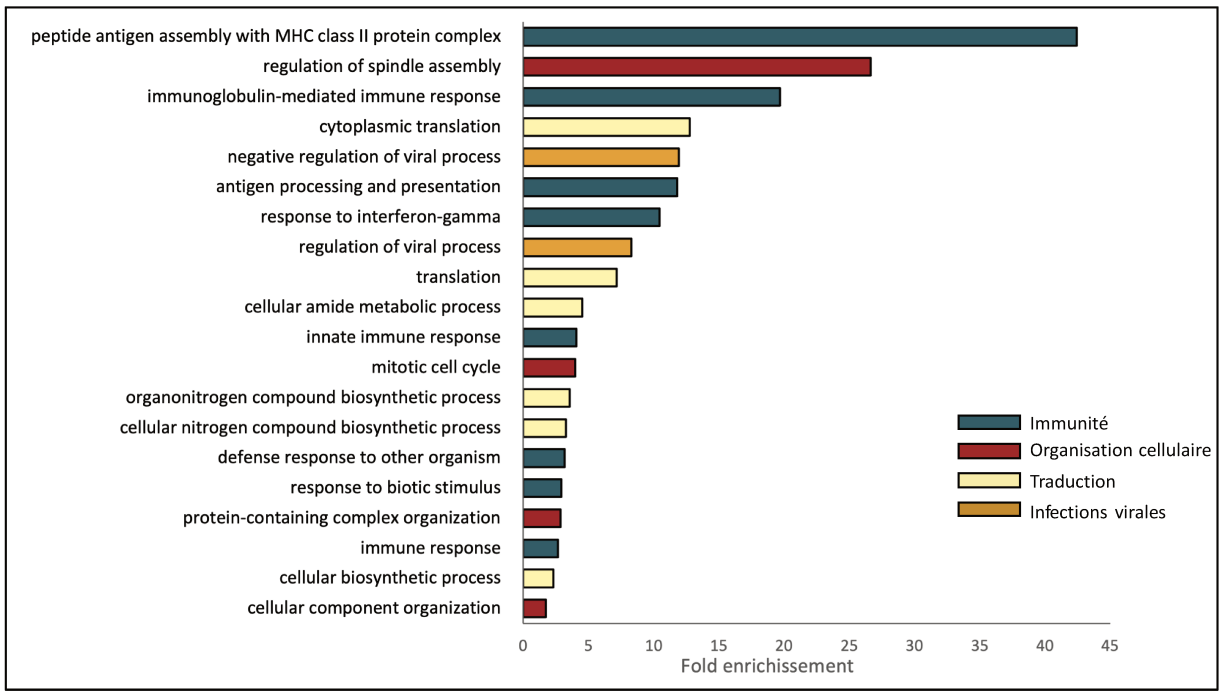


Figure 26 : Analyse des GO terms les plus enrichis au sein de nos interacteurs.

Analyse effectuée à l'aide de Panther classification system (P < 0.05). Utilisation de Revigo pour enlever les GO term redondants. Les vingt GO terms les plus enrichis sont représentés. En bleu : GO terms en lien avec l'immunité, en orange : les GO terms en lien direct avec l'infection virale. En beige : les GO terms en lien avec la traduction. En rouge : les GO terms en lien avec l'organisation cellulaire.

2. Choix des interacteurs

a. Carte d'interactions par appât

Le réseau d'interaction peut aussi être représenté de façon séparée pour chaque appât. Nous avons représenté sur la Figure 27 les interacteurs identifiés deux fois ou plus par appât. Les traits représentent les interactions et leur épaisseur est proportionnelle au nombre de fois où l'interaction a été trouvée lors de nos cribles. Nous pouvons ainsi remarquer que seule une partie des interacteurs cellulaires est partagée entre les différents appâts viraux. De plus, il y a un nombre d'interacteurs variable en fonction des appâts. Notamment, les appâts viraux codés par des gènes faisant partie de la famille des MGF semblent surreprésentés parmi les cribles ayant donné de nombreux clones. Est-ce dû à une raison technique (de nombreux MGF ont aussi été criblés sur la banque humaine) ou est-ce le reflet d'une réalité biologique où ces gènes, en tant que facteurs de virulence, ont de nombreux partenaires cellulaires ?

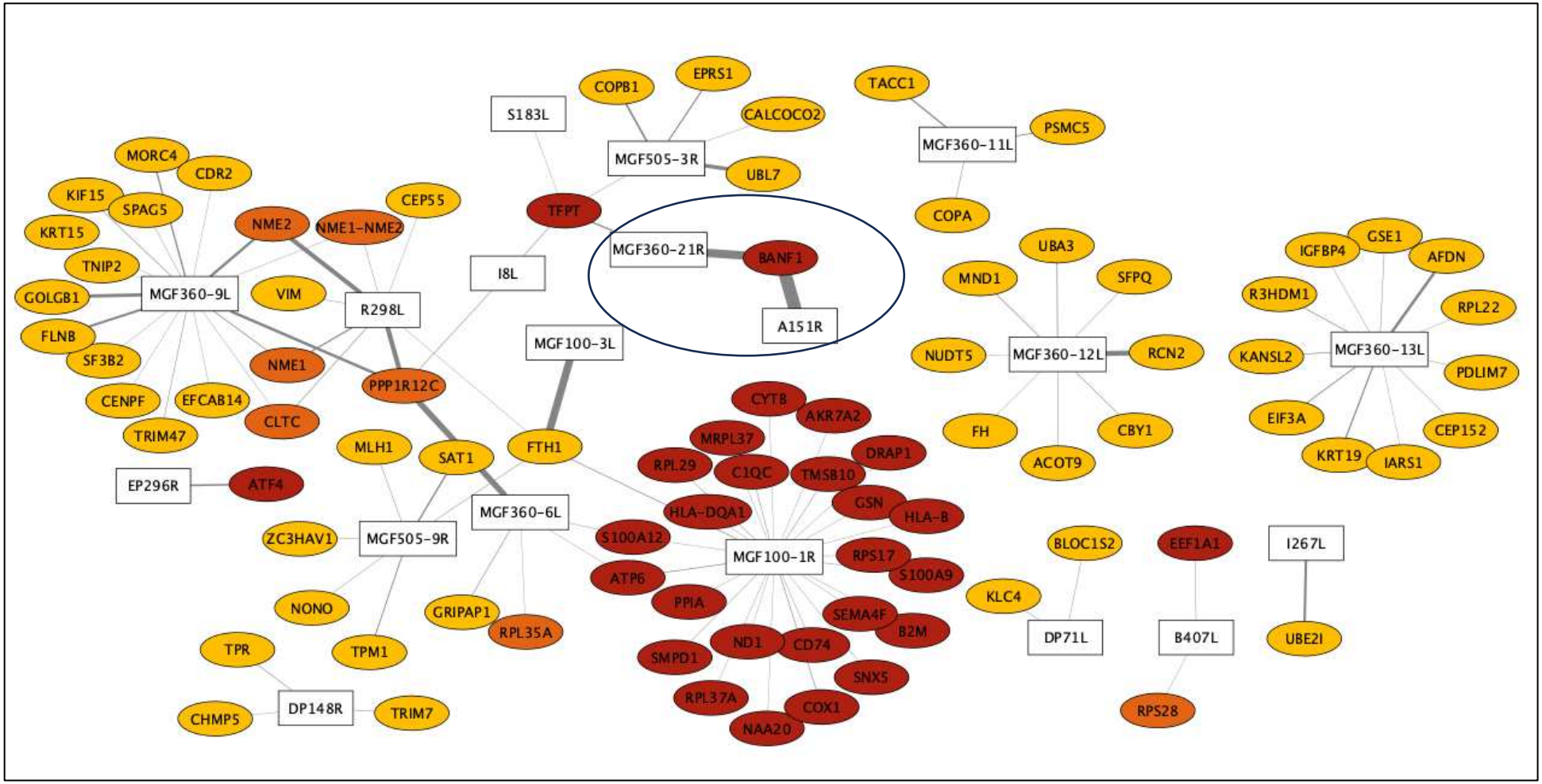


Figure 27 : Cartographie des interactions trouvées pour chaque appât.

L'épaisseur du trait est proportionnelle au nombre de fois où l'interaction a été identifiée. En jaune : interacteurs trouvés exclusivement avec la banque humaine. En rouge : interacteurs trouvés exclusivement avec la banque porcine. En orange : interacteurs communs entre la banque humaine et la banque porcine. Le cercle bleu permet de mettre en valeur notre interacteur principal : BANF1. Carte créée avec l'aide du logiciel Cytoscape

b. BANF1, un interacteur d'intérêt

Une fois que les interacteurs ont été identifiés, certains ont été sélectionnés pour une étude plus approfondie. Cette sélection a été réalisée sur la base du nombre de fois où l'interacteur a été identifié et sa fonction biologique connue dans la littérature. Or, nous avons au sein de notre équipe une affinité particulière pour l'immunité innée et plus particulièrement pour la voie IFN-I. Différents interacteurs ont été trouvés en lien avec cette voie, dont BANF1 (*barrier-to-autointegration factor*), CALCOCO2 (*Calcium-binding and coiled-coil domain-containing protein 2)*, UBA3 (*Ubiquitin-like modifier activating enzyme 3*) et COPA (*COPI coat complex subunit alpha*). Parmi ces interactions, nous avons choisi d'investiguer particulièrement l'interaction entre la protéine cellulaire BANF1 et les protéines virales A151R et MGF360-21R pour différentes raisons.

Tout d'abord BANF1 a été touvée 179 fois avec l'appât viral A151R et 114 fois avec MGF360-21R lors des cribles sur la banque porcine, ce qui fait de lui l'interacteur majoritairement identifié, tous cribles confondus. A151R et MGF360-21R ayant seulement été criblés contre la banque porcine d'ADNc, uniquement la forme porcine de BANF1 a été identifiée. Seule la forme entière de BANF1 (89 acides aminés) a été retrouvée comme interagissant avec A151R. Pour MGF360-21R, la forme entière de BANF1 n'a jamais été retrouvée, seules des formes plus courtes de BANF1 ont été identifiées. Notamment une forme majoritaire correspondant à l'acide aminé 21 jusqu'à l'acide aminé 89 de BANF1 a été trouvée une cinquantaine de fois sur les 114 fois au total (Figure 28).

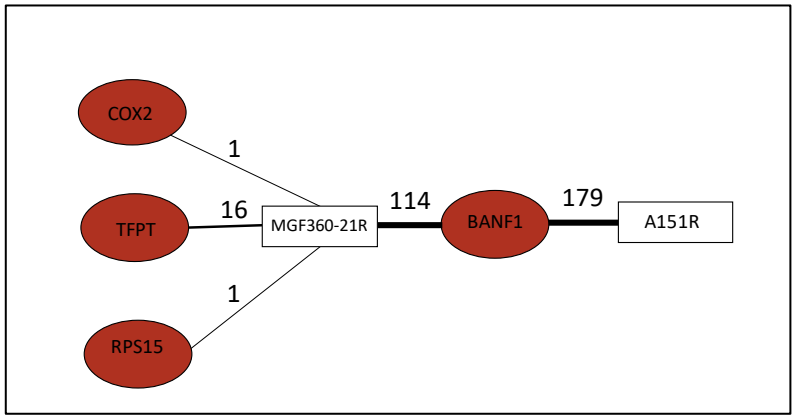


Figure 28 : Carte d'interaction des appâts viraux MGF369-21R et A151R.

Les appâts viraux sont représentés dans les carrés blanc et les interacteurs cellulaires en rouge. Les nombres représentent le nombre de fois où l'interaction a été trouvée. La protéine cellulaire BANF1 a été trouvée 179 fois avec A151R et 114 fois avec MGF360-21R. BANF1 est le seul interacteur qui a été trouvé lors des cribles d'A151R. COX2, TFPT et RPS15 ont aussi été identifiées avec MGF360-21R. MGF360-21R et A151R ont seulement été criblés en utilisant la banque porcine d'ADNc.

BANF1 a été également un interacteur retrouvé majoritairement lors des cribles en AP-MS (*Affinity Purification Mass Spectrometry*) effectués par nos collaborateurs du FLI, impliqués dans le même projet européen ASFVint. En effet, cette équipe s'est attachée à faire les interactomes d'une partie des mêmes protéines virales d'intérêt que nous, en utilisant une technique d'AP-MS complémentaire à nos cribles. Dans cette perspective, nous avons cloné les ORFs viraux correspondants dans des vecteurs GFP : DP148R, A224L, A238L, I215L, B125R, S183L, H233R, M448R, E301R, I7L, K205R, B475L, C129R, CP123L, E184L, E146L, H171R, B119L, L60L, CP312R, A104R, A137R, B263R, B385R, C315R, C475L, CP80R, D205R, EP296R, EP424R, H359L, K78R, 285L et A151R. Ces protéines d'ASFV ont par la suite été utilisées par nos collaborateurs comme appâts pour des cribles en AP-MS dans des cellules HEK-293 infectées par une souche Armenia/07 adaptée (Figure 29.A). Parmi les interacteurs identifiés, 184 sont spécifiques à la protéine virale MGF360-21R, 33 spécifiques à A151R et 48 sont communs à MGF360-21R et A151R (Figure 29.B). Parmi les interacteurs de MGF360-21R, A151R a d'ailleurs été la seule protéine virale qui a été retrouvée. La base de données STRING a ensuite été utilisée afin d'identifier les interactions entre les protéines de l'hôte au sein même des interacteurs de A151R et MGF360-21R. Les interacteurs ont ensuite été classés dans des complexes protéiques spécifiques, en utilisant la base de données EBI Complex Portal (Figure 29.C). Parmi les interacteurs partagés entre A151R et MGF360-21R, BANF1 est celui ayant le

plus haut niveau de confiance (Figure 29.C), justifiant d'autant plus notre intérêt pour cet interacteur. De plus, BANF1 est une protéine cellulaire non seulement en lien avec la voie IFN-I, mais plus particulièrement impliquée dans la régulation de cGAS (327, 328), qui est le senseur principalement décrit à ce jour comme étant capable de détecter le génome de l'ASFV. BANF1 est notamment capable de rentrer en compétition avec cGAS pour sa liaison à l'ADN (327). En plus de son lien avec l'immunité innée, BANF1 semble impliquée dans la réplication de différents virus (329). Remarque : toutes les expériences de la Figure 29 ont été effectuées par la Dr Katarzyna Dolata, post-doctorante au sein du FLI.

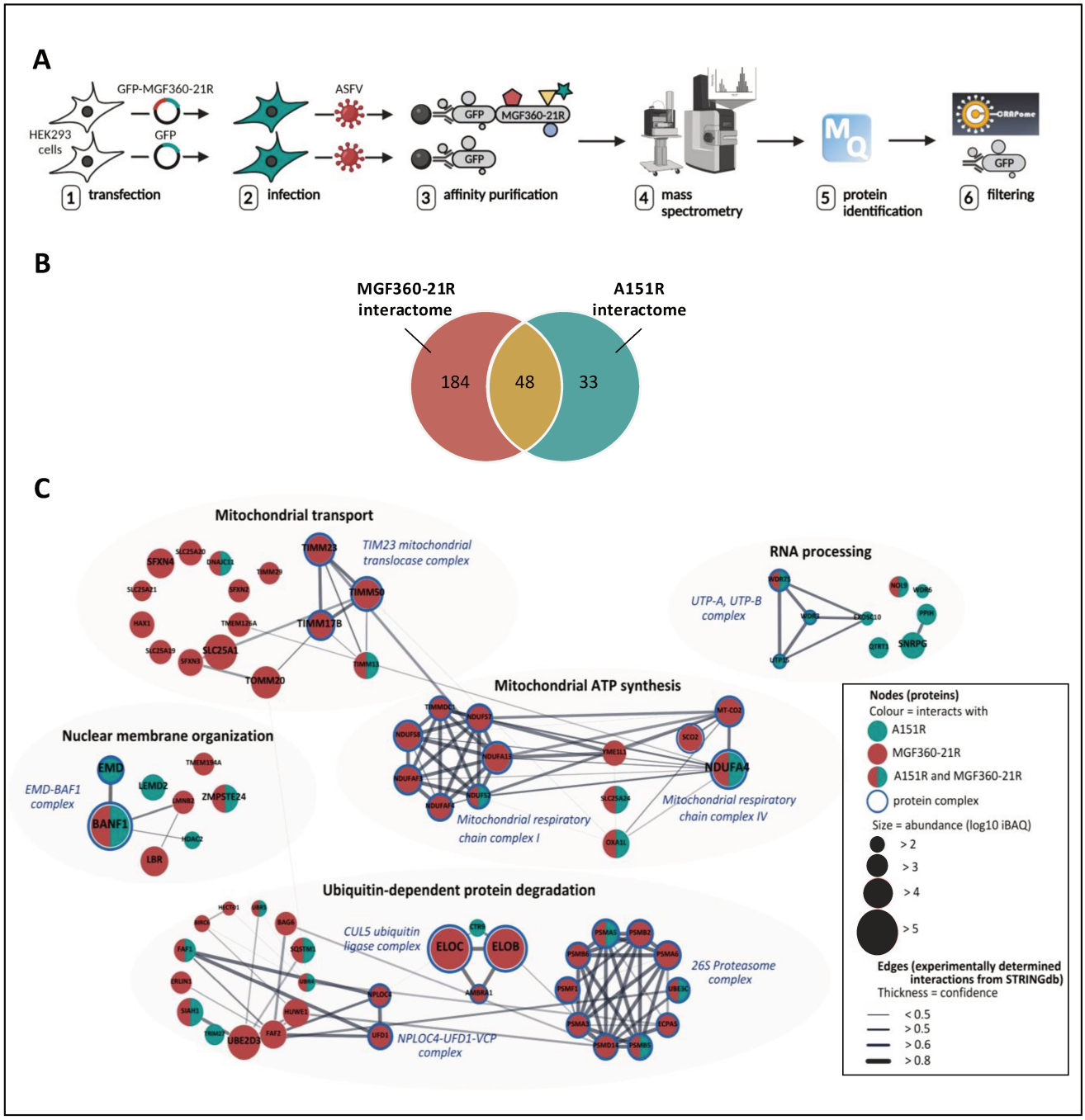


Figure 29 : Interactome des protéines virales MGF360-21R et A151R en AP-MS

Toutes les expériences représentées sur cette figure ont été effectuées par la Dr Katarzyna Dolata du FLI*. (A) : processus d'AP-MS utilisé afin d'identifier les interacteurs cellulaires et viraux de l'appât viral MGF360-21R. Le même processus a été utilisé avec l'appât viral A151R. (B) : Diagramme de Venn des interacteurs identifiés en AP-MS spécifiques à l'appât MGF360-21R, à A151R ou commun aux deux appâts. (C) Carte d'interactions des protéines interagissant avec A151R (en vert), avec MGF360-21R (en rouge) ou avec les deux (mi-vert mi-rouge). La base de données STRING a été utilisée pour trouver les interactions au sein des protéines cellulaires. Les interacteurs sont regroupés grâce à la base de données EBI Complex Portal. La taille des interacteurs est proportionnelle à leur abondance, tandis que l'épaisseur de l'interaction représente la confiance de l'interaction prédite sur STRING.*

3. Validation des interactions A151R-BANF1-MGF360-21R

a. Validation par double-hybride en levure

Dans un premier temps, nous avons revalidé l'interaction entre BANF1 et les protéines virales. Nous avons une nouvelle fois utilisé le double-hybride en levure, cette fois-ci à partir d'appâts et de proies connus. Pour cela, BANF1 a été clonée dans un vecteur pPC86 (codant GAL4-AD). Elle a ensuite été transformée dans la levure Y2H Gold exprimant chacun de nos appâts viraux (A151R ou MGF360-21R). Nous avons ainsi pu reconfirmer l'interaction entre BANF1 et A151R, ainsi qu'entre BANF1 et MGF360-21R (Figure 30). De plus, l'interaction entre la protéine virale A151R et BANF1 semble plus forte que l'interaction entre MGF360-21R et BANF1 (différence de pousse de levure).

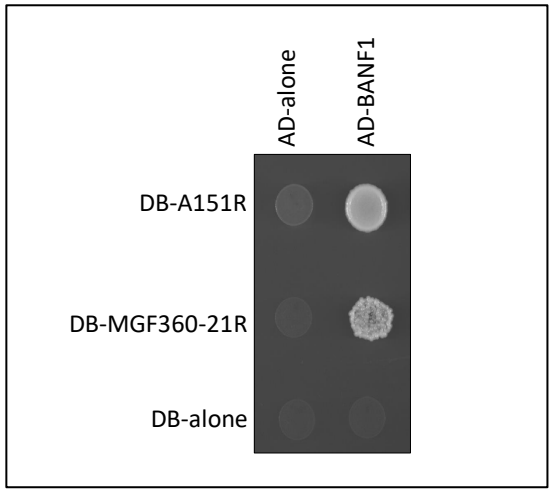


Figure 30 : Validation de l'interaction A151R-BANF1 et MGF360-21R et BANF1 en levure

Une souche de levure YH2 Gold a été transformée avec les plasmides codant les protéines virales A151R ou MGF360-21R liées à GAL4-DB. Puis, ces levures ont été de nouveaux transformées avec un plasmide codant pour BANF1 lié au domaine GAL4-AD. L'interaction entre A151R et BANF1 et entre MGF360-21R et BANF1 permet la pousse des levures sur un milieu dépourvu en leucine, en tryptophane et histidine, et supplémenté en 3-AT. Les plasmides vides AD-alone et DB-alone servent de contrôles négatifs.

b. Validation par co-purification d'affinité

Afin de valider l'interaction biochimique entre BANF1, A151R et MGF360-21R, une méthode par co-purification d'affinité (*GST pull down*) a été utilisée. Pour cela, les protéines virales A151R et MGF360-21R ont été fusionnées à une étiquette 3x-Flag, tandis que la protéine cellulaire BANF1 a été fusionnée à une étiquette GST. Des cellules HEK-293T ont été transfectées avec ces différentes constructions. Après 48 h, les lysats ont été récupérés et purifiés sur billes de Glutathion sépharose, permettant la purification de BANF1 via son étiquette GST et la co-purification des protéines virales en cas d'interaction. L'interaction peut ainsi être détectée par western blot en utilisant un anticorps anti-flag pour détecter nos protéines virales d'intérêt et un anticorps anti-GST pour détecter BANF1.

Nous nous sommes attachés à valider l'interaction entre les protéines virales d'intérêt et la forme porcine de BANF1 (correspondant à la forme trouvée en Y2H), mais aussi avec la forme humaine de BANF1. En effet, étant donné que nous utilisons principalement des cellules humaines HEK-293T lors de nos diverses expériences, il nous semblait pertinent de valider l'interaction aussi avec BANF1 humain. Ainsi, l'utilisation du GST pull-down nous a permis de valider l'interaction entre les formes humaine et porcine de BANF1 avec A151R (Figure 31. A) et MGF360-21R (Figure 31.B).

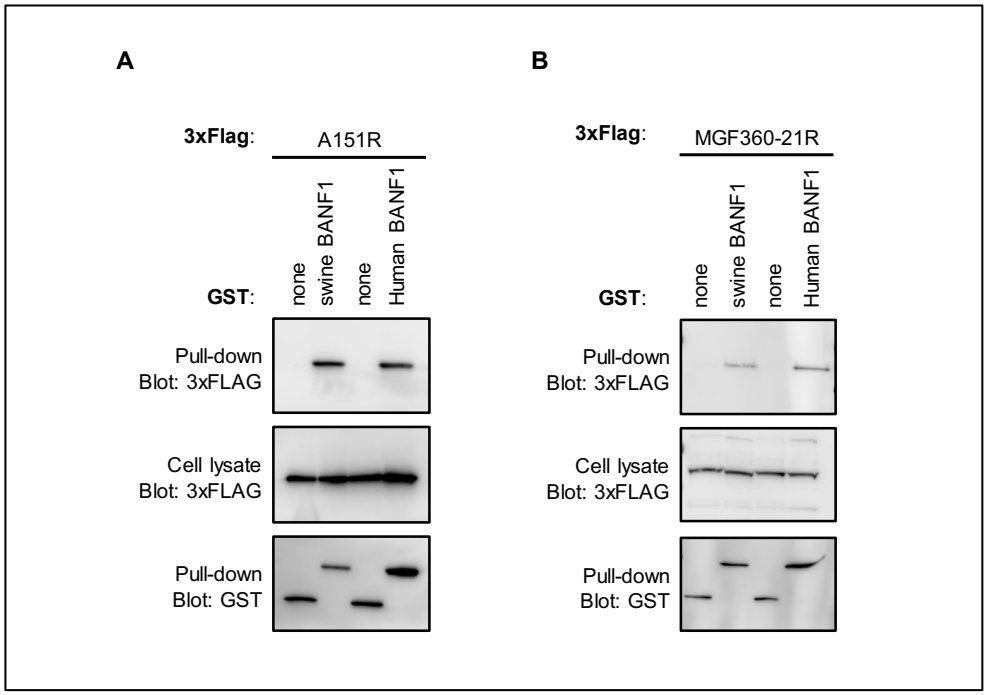


Figure 31 : Validation de l'interaction A151R-BANF1 et MGF360-21R-BANF1 par GST pull-down.

Des cellules HEK-293T ont été cotransfectées avec 500 ng d'un plasmide codant les formes humaines ou porcines de BANF1-GST et avec 300 ng de plasmides exprimant A151R-3x-flag ou MGF360-21R-3x-flag. 48 h après, les lysats ont été purifiés à l'aide de billes de glutathion sépharose. Puis un western blot a été effectué, en utilisant des anticorps dirigés contre les étiquettes GST ou 3x-flag.

4. Cartographie des domaines minimums d'interactions

Nous avons ensuite essayé d'identifier les domaines minimums d'interaction entre la protéine virale A151R et la protéine cellulaire BANF1. Pour cela, nous avons utilisé une nouvelle fois la technique du double-hybride mais aussi la capacité des levures à effectuer des recombinaisons homologues entre des fragments flanqués par des amorces spécifiques (*Gap Repair*). Des amorces ont été désignées le long de l'ORF codant pour BANF1, de façon que la protéine soit découpée *in fine* tous les 12 acides aminés. Toutes les combinaisons possibles des fragments ont été amplifiées par PCR. Puis, les produits de PCR correspondants à tous les fragments de BANF1 ainsi qu'un plasmide pPC86 (codant GAL4-AD) linéarisé ont été transformés dans la levure Y2H Gold exprimant notre appât viral A151R. Les levures vont alors effectuer une recombinaison homologue entre le produit de PCR et le vecteur pPC86 linéarisé, permettant de reconstituer un plasmide exprimant la proie liée à GAL4-AD. Nous avons pu

ainsi montrer que l'interaction entre BANF1 et A151R est maintenue seulement lorsque les 17 premiers acides aminés de BANF1 sont délétés (Figure 32.A-B). Ainsi, le domaine 17-89 de BANF1 semble participer et nécessaire à l'interaction avec A151R (Figure 32.C).

La même stratégie a été employée pour découper A151R tous les 25 acides aminés et en testant l'interaction entre les différents fragments et la forme entière de BANF1. Cette fois-ci, seule la forme entière de A151R semble capable d'interagir avec BANF1 (Figure 32.D-F).

Nous n'avons pas essayé de cartographier le domaine minimum d'interaction entre BANF1 et MGF360-21R. En effet, lors des cribles en Y2H en utilisant MGF360-21R en appât, c'est toujours une forme tronquée de BANF1 qui a été identifiée. La forme tronquée majoritairement trouvée correspond à l'acide aminé 21 jusqu'à la fin de la protéine. D'autres formes plus courtes ont aussi été trouvées plus de deux fois chacune, à partir des acides aminés 14, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 28 (Figure 33). Ainsi, à partir de ces données, nous savons qu'au minimum la forme 28-89 de BANF1 est toujours capable d'interagir avec MGF360-21R, au moins par double-hybride en levure.

.

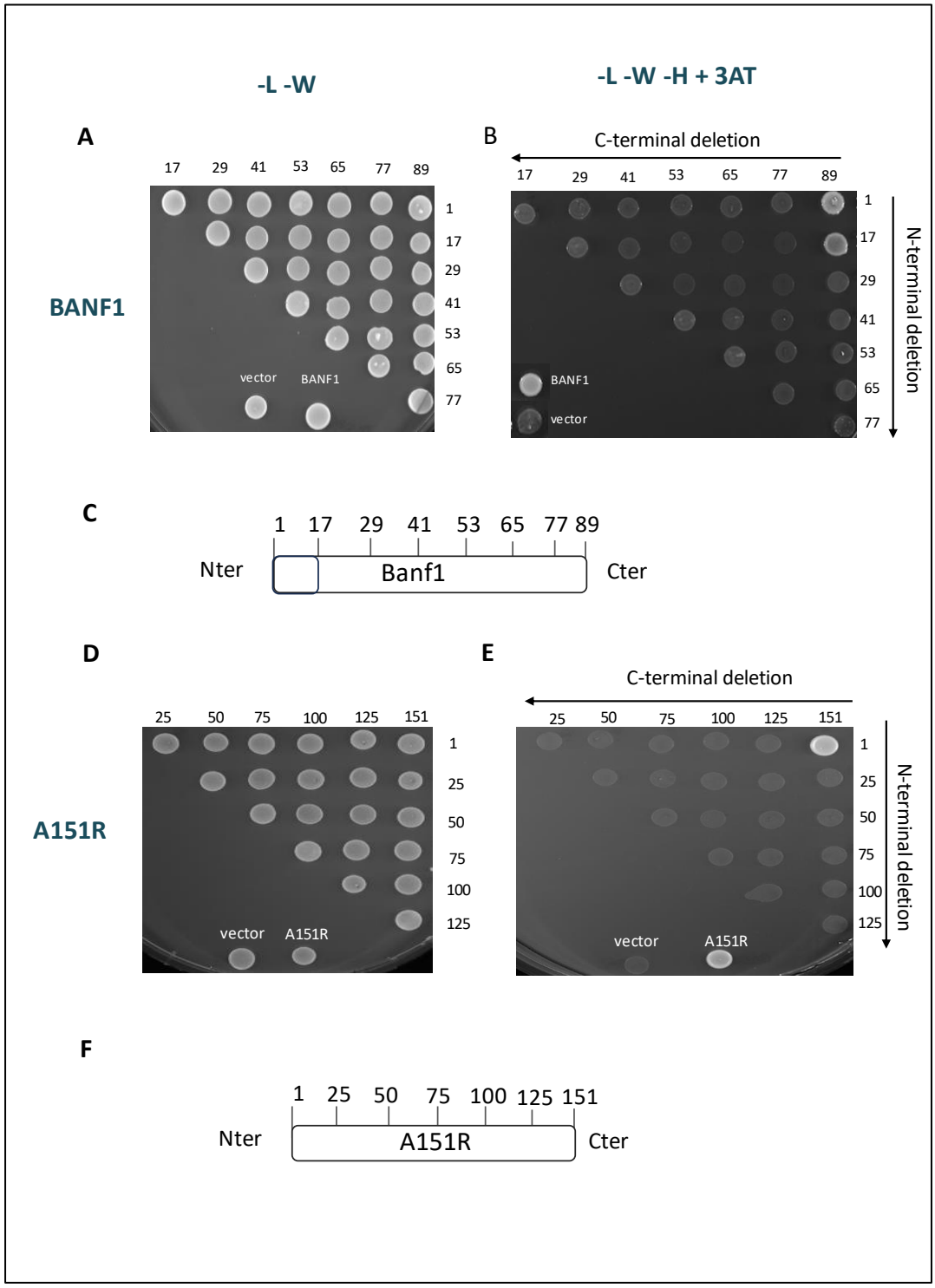


Figure 32 : Fragmentome de A151R et de BANF1.

Les protéines BANF1 (A-C) ou A151R (D-F) ont été découpées en N-ter et en C-ter afin de déterminer leur domaine minimal d'interaction respectivement avec les protéines A151R ou BANF1 entières. Les fragments de BANF1 ou de A151R dans le vecteur pPC86 ont été transformés dans une souche de levure préalablement transformée avec la forme entière de A151R-pPC97 ou de BANF1-pPC97. Les transformants ont été étalés sur un milieu -L -W (A, D) ainsi que sur un milieu sélectif -L -W, -H + 3-AT (B, E). Les axes vertical et horizontal des figures (B, E) indiquent respectivement le premier et le dernier acide aminé de chaque fragment testé. (C) : Domaine de liaison de BANF1 à A151R. (E) : Seule la forme entière de A151R est capable de se lier à BANF1.

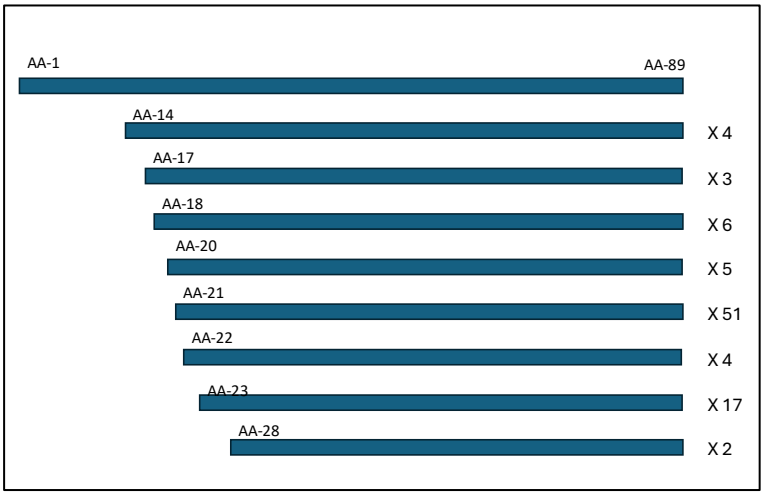


Figure 33 : Domaines de BANF1 identifiés en Y2H avec MGF360-21R

Les différents domaines de BANF1 identifiés lors des cribles en Y2H. La forme entière (AA1-AA89) n'a pas été trouvée. Les différents fragments sont délétés en N-ter. Les numéros à droite correspondent au nombre de fois où l'interaction entre ces fragments et MGF360-21R a été trouvée.

5. Colocalisations entre A151R-BANF1 & MGF360-21R

Nous avons ensuite étudié la localisation cellulaire des protéines A151R, MGF360-21R et BANF1 par microscopie confocale, afin de savoir si A151R et BANF1 ainsi que MGF360-21R et BANF1 étaient capables de colocaliser. Ainsi, les protéines A151R, MGF360-21R et une forme porcine de BANF1 ont été surexprimées en cellules porcines. Pour ce faire, des cellules IBRS-2 ont été co-transfectées avec les plasmides codant A151R-GFP ou MGF360-21R-GFP et BANF1-cherry, ainsi qu'avec les plasmides contrôles exprimant la GFP ou la cherry seule. Quarante-huit heures après, les cellules ont été fixées et les noyaux cellulaires marqués au Hoechst. Enfin les cellules ont été visualisées grâce à un microscope confocal (Figure 34).

Lorsque BANF1-cherry est exprimée seule, elle semble localiser de façon ponctiforme au sein du cytoplasme, ainsi que très légèrement et de manière diffuse dans le cytoplasme et dans le noyau. Lorsque A151R-GFP est exprimée seule, son expression est diffuse au sein du noyau (hors nucléole) et du cytoplasme. Elle est particulièrement marquée au niveau de l'enveloppe nucléaire. Enfin, lorsque la protéine virale MGF360-21R est surexprimée seule, sa localisation est cytoplasmique (Figure 34). Cependant, nous avons remarqué que non seulement la protéine MGF360-21R semble plus difficile à exprimer que la protéine A151R,

mais aussi que la surexpression de MGF360-21R semble entrainer une certaine toxicité pour les cellules puisque les cellules transfectées avec succès semblent dans un mauvais état physiologique. Nous pouvons aussi préciser que le plasmide EV (*empty vector*) - cherry s'exprime peu et semble difficilement visualisable sur ces images.

Lorsque les protéines A151R-GFP et BANF1-cherry sont coexprimées au sein de la même cellule, la protéine A151R est visible en points périnucléaires, correspondant à la localisation de BANF1 (Figure 34). Ainsi, la présence de la forme surexprimée de BANF1 pourrait induire une relocalisation de A151R. Lors de la cotransfection de MGF360-21R et BANF1, nous avons remarqué que peu de cellules semblent coexprimer les deux protéines d'intérêt. Cependant, dans les cellules cotransfectées, MGF360-21R et BANF1 semblent colocaliser au sein de points cytoplasmiques (Figure 34).

Des résultats tout à fait semblables ont été obtenus en cellules humaines HeLa (*Henrietta Lacks*) en surexprimant cette fois-ci la forme humaine de BANF1 (Annexe 5).

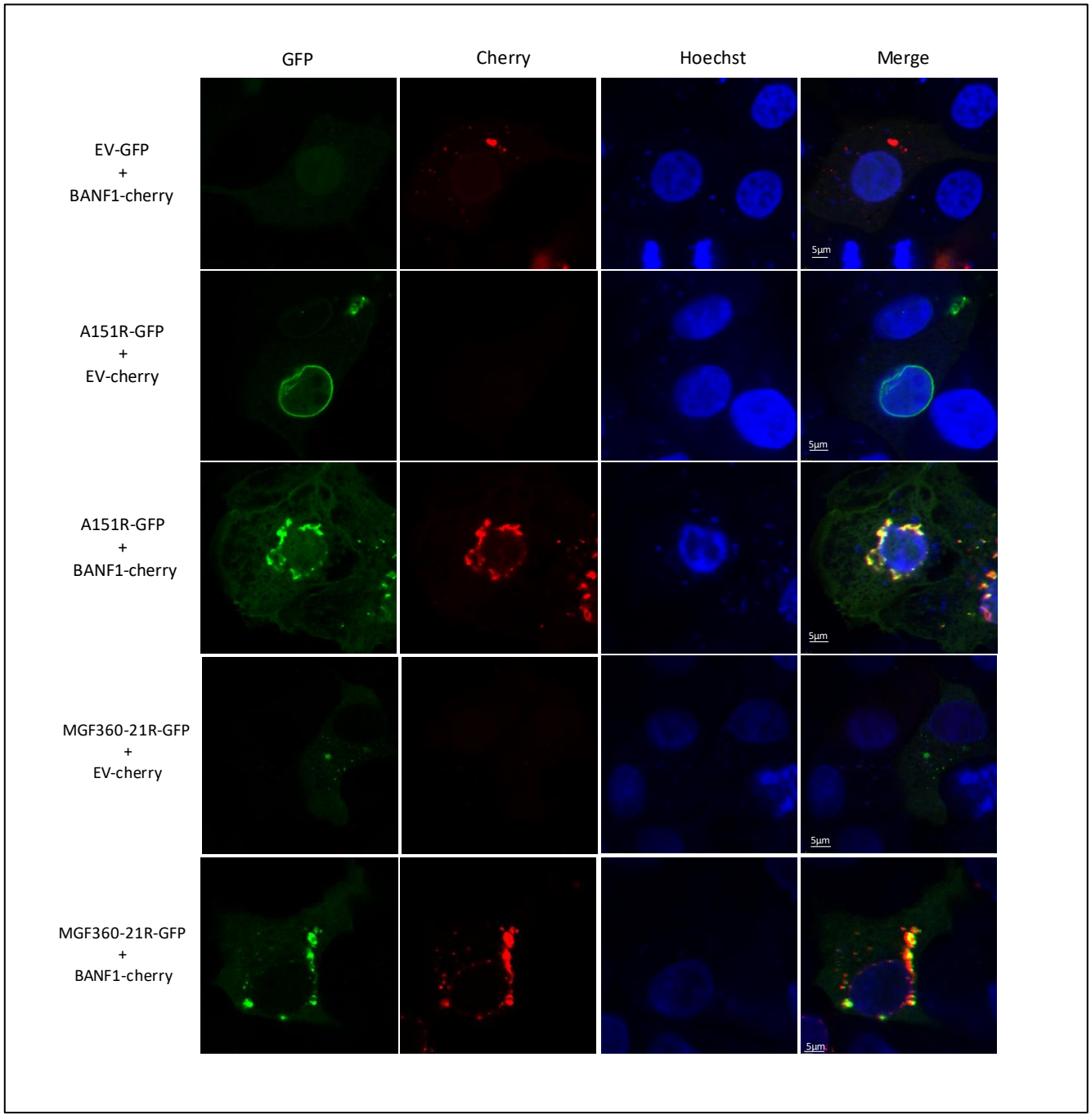


Figure 34 : Colocalisation des protéines A151R, MGF360-21R avec BANF1 en miscroscopie confocale.

Des cellules porcines IBRS-2 ont été co-transfectées avec 250 ng de plasmides exprimant A151R-GFP ou MGF360-21R-GFP et BANF1_porc-cherry ou avec les contrôles correspondants. Quarante-huit heures après la transfection, les cellules ont été fixées et les noyaux marqués au Hoechst. Les cellules ont été visualisées à l'aide d'un microscope confocal.

Il a été décrit dans la littérature que les infections par le virus de la Vaccine (VV) et par le virus Herpès Simplex 1 (HSV-1) induisent une relocalisation de BANF1 (330, 331). Nous nous sommes ainsi demandé si l'infection par l'ASFV était aussi capable d'induire une relocalisation de BANF1. Ces expériences ont été réalisées par nos collaborateurs du FLI et les résultats sont présentés dans la Figure 35. Dans un premier temps, A151R-GFP et MGF360-21R-GFP ont été surexprimés dans des cellules HEK-293 et la localisation de BANF1 endogène a été visualisée grâce à un anticorps dirigé contre BANF1 (Figure 35.A). BANF1 endogène, contrairement à BANF1-cherry, est exclusivement localisée dans le noyau lorsque le contrôle GFP seul est surexprimé dans les cellules. Cependant, les surexpressions d'A151R-GFP et de MGF360-21R-GFP induisent une relocalisation de BANF1 du noyau vers le cytoplasme (Figure 35.A). A151R-GFP et MGF360-21R-GFP ont des localisations différentes, ils colocalisent bien tous les deux avec la forme endogène de BANF1, autour du noyau pour A151R-GFP et de façon plus dispersée dans le cytoplasme pour MGF360-21R-GFP (Figure 35.A).

Dans un deuxième temps, afin de préciser la localisation des protéines virales au sein du cytoplasme, un marqueur de la membrane externe des mitochondries a été utilisé (TOMM22), montrant que MGF360-21R-GFP colocalise avec TOMM22, contrairement à A151R-GFP (Figure 35.B).

Enfin, la localisation de BANF1 dans des cellules WSL (cellules de sanglier) infectées a été analysée (Figure 35.C). Comme attendu, BANF1 a une localisation nucléaire dans les cellules contrôles non infectées. Cependant, au cours de l'infection BANF1 n'est plus du tout détectée (à 8h post-infection) ou alors très peu au sein du cytoplasme (à 24 h post-infection) (Figure 35.C). Afin de savoir si l'infection par l'ASFV induisait une dégradation de BANF1, une analyse de protéomique a été menée afin de déterminer le niveau de la protéine BANF1 au cours de l'infection par l'ASFV (Figure 35.D). Or, aucune variation du niveau de protéine de BANF1 n'a lieu au cours de l'infection (Figure 35.D). Ainsi, l'ASFV ne semble pas entrainer la dégradation de BANF1. Il serait ainsi possible que l'infection par l'ASFV induise des modifications post-traductionnelles sur BANF1, ne permettant plus la reconnaissance de BANF1 par l'anticorps utilisé.

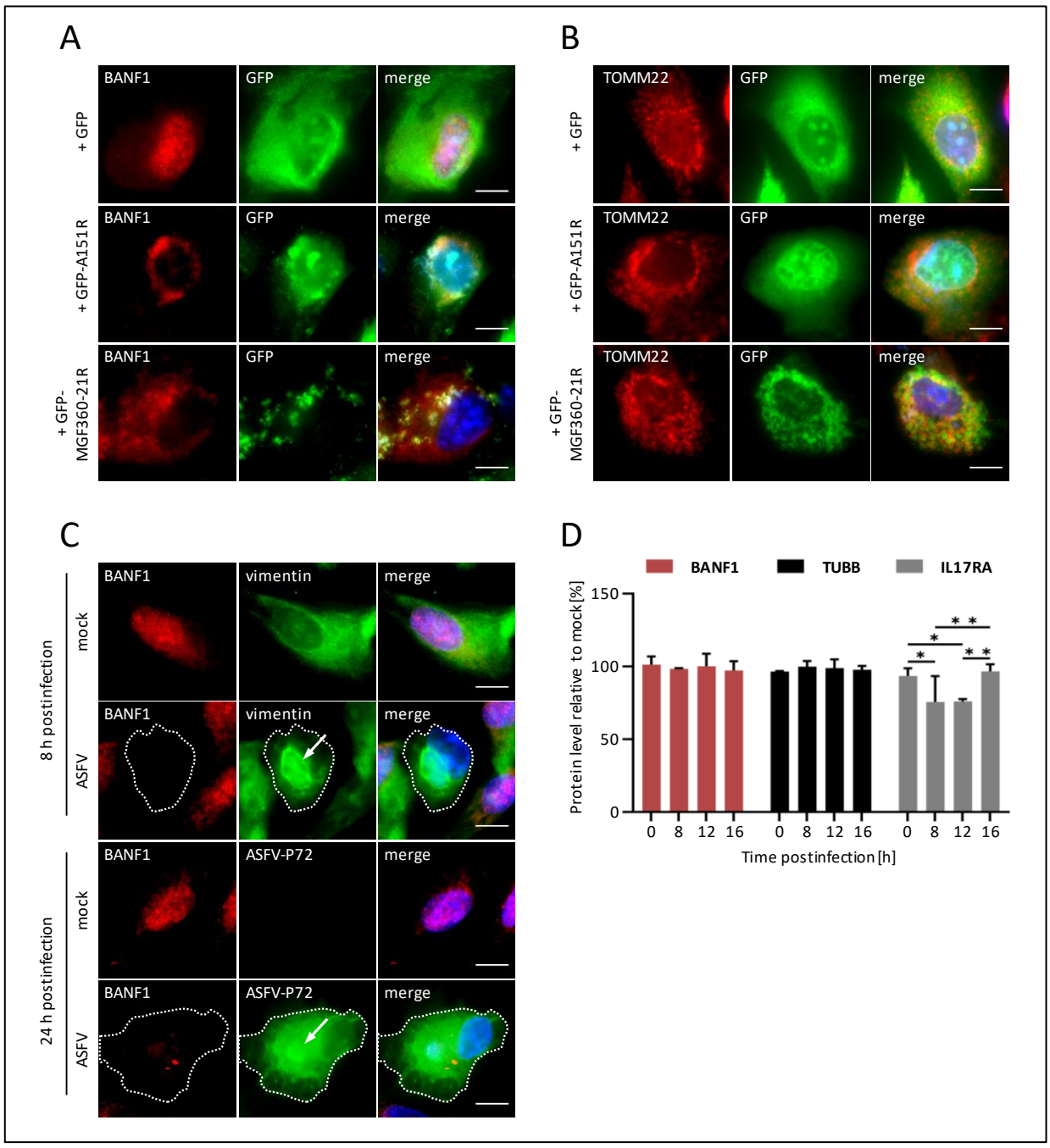


Figure 35 : Relocalisation de BANF1 endogène

Toutes les expériences représentées sur cette figure ont été effectuées par la Dr Katarzyna Dolata. *A151R-GFP, MGF360-21R-GFP et GFP seule ont été surexprimées en cellules HEK-293. (A) : Colocalisation de BANF1 endogène avec A151R-GFP et MGF360-21R-GFP. BANF1 a été visualisée grâce à un anticorps anti-BANF1. (B) La localisation de MGF360-21R correspond à celle du marqueur mitochondrial TOMM22. (C) : Localisation de BANF1 endogène au cours de l'infection dans des cellules WSL. Les sites de réplication de l'ASFV correspondent aux flèches blanches et sont marqués à l'aide de la vimentine à 8h post-infection et via un anticorps dirigé contre la protéine virale p72 à 24 h post-infection. Barre d'échelle : 10 µm. (D) : Comparaison du niveau protéique de BANF1 au cours de l'infection par rapport à des cellules non infectées. Les niveaux de tubuline et du récepteur à l'interleukine 17 ont servis de contrôle.*

.

6. Le silencing de BANF1 induit une diminution de la réplication de l'ASFV

Une interaction décrite physiquement ne signifie pas forcément qu'elle a une conséquence physiologique sur la réplication virale et/ou sur la cellule infectée. Il est donc particulièrement important d'évaluer une interaction virus-hôte sur le plan fonctionnel. En somme et dans notre cas, est-ce que BANF1 a un effet pro ou antiviral sur la réplication de l'ASFV ?

BANF1 a été décrite comme ayant un effet proviral sur les rétrovirus (332, 333) et antiviral sur le VV (334) et l'HSV-1 (330). Afin de déterminer si BANF1 joue un rôle dans la réplication du virus, un silencing de BANF1 à l'aide d'un siARN (*short interfering RNA*) a été effectué en cellules WSL. Ces expériences ont été également réalisées par nos collaborateurs du FLI et les résultats sont présentés dans la Figure 36. Dans un premier temps, l'efficacité du si-BANF1 a été vérifiée par western blot (Figure 36.A) et par immunofluorescence (Figure 36.B) et la viabilité cellulaire ne semble pas altérée par l'inhibition de l'expression de BANF1 (Figure 36.C). Des cellules WSL ont ensuite été infectées à une MOI (*multiplicity of infection*) de 1 en présence du si-BANF1 à 3 nM ou 6 nM ou du si contrôle (si-NegC). Les surnageants titrés à 0h, 24 h et 48 h post-infection montrent que le silencing de BANF1 induit une diminution de la réplication de l'ASFV (Figure 36.D). BANF1 semble ainsi avoir un effet proviral pour l'ASFV. Pourtant, la surexpression de BANF1 ne semble pas avoir d'impact sur la réplication virale (données non montrées). Il serait ainsi envisageable que le rôle de BANF1 ne se limite pas directement à la réplication du virus, mais que la diminution de son expression induit des altérations au sein de la cellule, contribuant *in fine* à l'inhibition de la réplication virale. Pour évaluer cette hypothèse, une analyse de protéomique en cellules WSL a été effectuée en présence de si-BANF1. 92 protéines sont exprimées seulement dans les cellules si-BANF1, contre 37 exprimées dans les cellules si-NegC (Figure 36.E). De plus, l'expression de 67 protéines est augmentée tandis que celle de 7 est diminuée dans les cellules traitées avec le si-BANF1 par rapport aux cellules si-NegC (Figure 36.E). En particulier, l'extinction de BANF1 induit la surexpression de nombreux gènes en lien avec la voie IFN, cGAS-STING et RIG-I, mais aussi en lien avec la réplication de l'ADN et sa méthylation, ainsi qu'avec l'import nucléaire (Figure 36.F).

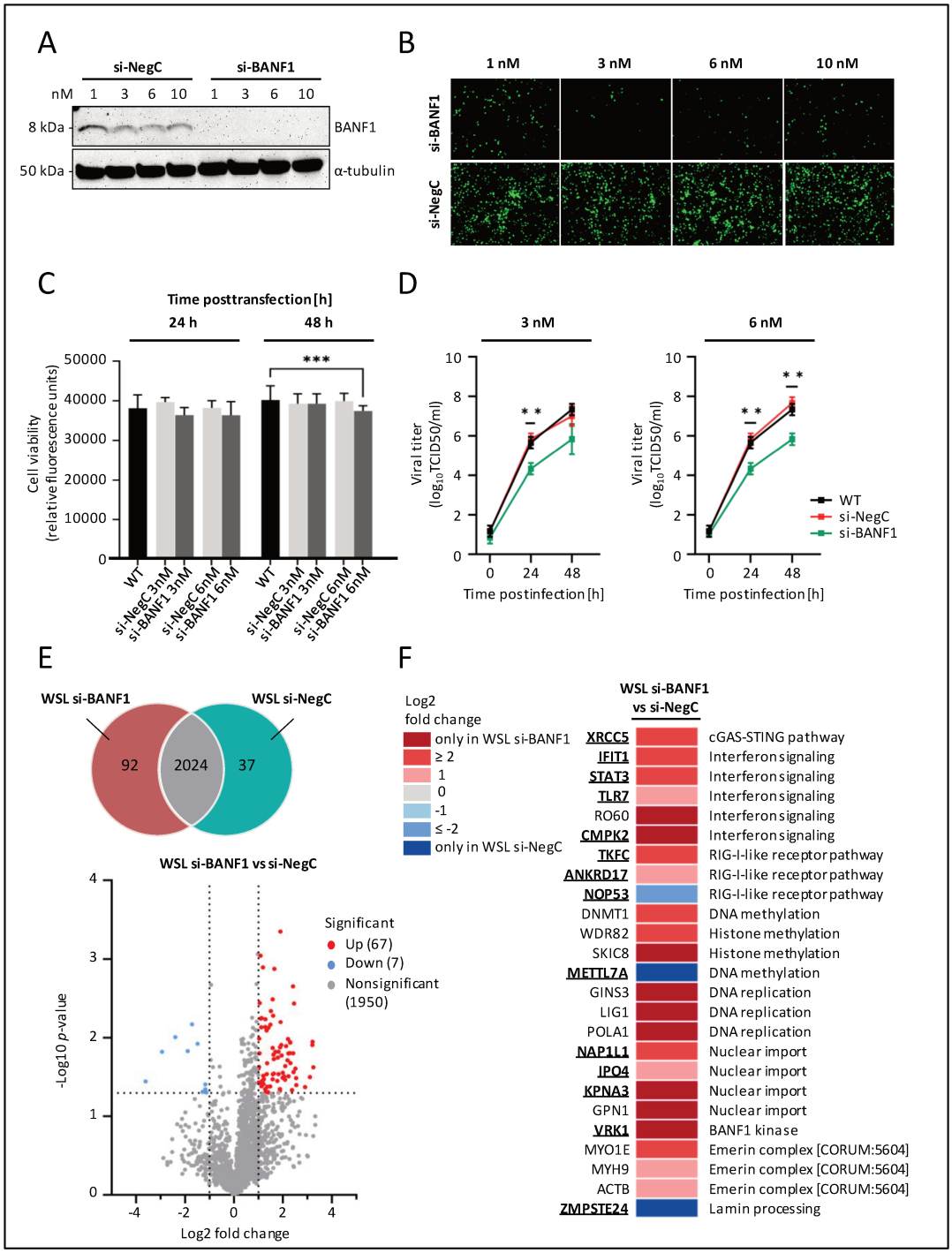


Figure 36 : Effet du silencing de BANF1 sur la réplication de l'ASFV et sur le protéome cellulaire

Toutes les expériences représentées sur cette figure ont été effectuées par la Dr Katarzyna Dolata du FLI. *Des cellules WSL ont été transfectées avec un siARN dirigé contre BANF1 (si-BANF1) ou un si contrôle (si-NegC). (A) : Évaluation de l'expression de BANF1 par western blot dans des cellules transfectées avec une gamme de si-BANF1 ou de si-NegC. (B) : Immunofluorescence montrant BANF1 en présence d'une quantité croissante de si-BANF1. (C) : évaluation de la viabilité cellulaire en présence de si-BANF1. (D) : Cinétique de réplication de l'ASFV par titrage à 0h, 24 h et 48 h en présence de si-BANF1. (E) : Diagramme de Venn montrant les protéines identifiées en spectrométrie de masse dans des cellules WSL traitées avec un si-BANF1 ou un si-NegC et diagramme de dispersion montrant les protéines exprimées différentiellement. (F) : Représentation en heatmap des protéines surexprimées dans les cellules WSL si-BANF1 vs si-NegC. Les protéines décrites comme étant impliquées dans la réplication du virus ont été soulignées.*

7. A151R et MGF360-21R : des inhibiteurs de la voie IFN-I

Compte tenu du rôle connu de BANF1 dans la voie de l'IFN-I et des résultats présentés dans la Figure 36.F, nous nous sommes intéressés aux rôles potentiels des protéines virales A151R et MGF360-21R dans cette voie importante de l'immunité innée. En effet, MGF360-21R n'est absolument pas décrite dans la littérature, à part qu'elle appartient, comme son nom l'indique, à la famille des MGF. Quant à la protéine A151R, elle a été montrée comme étant un facteur de virulence car sa délétion aboutit à une atténuation de la souche virulente Georgia 2010 (335). Pourtant, aucun mécanisme explicatif n'a été décrit et sa fonction reste à ce jour inconnue.

Nos deux protéines virales d'intérêt interagissent avec la protéine cellulaire BANF1, elle-même impliquée dans l'inhibition de la voie cGAS-STING. Nous avons donc effectué une étude fonctionnelle sur le rôle potentiel de ces deux protéines virales sur la voie d'IFN-I. Pour ce faire, nous avons utilisé un test rapporteur IFN-β-luciférase, permettant d'évaluer l'état d'activation du promoteur du gène codant l'IFN-β. Des cellules HEK-293T ont été transfectées avec le plasmide codant l'IFN-β-luc, le pCMV-renilla permettant de normaliser les résultats et les plasmides codant pour nos protéines virales d'intérêt. Différents composants ont été utilisés pour stimuler la voie IFN-β. Dans un premier temps, cette voie a été stimulée en surexprimant cGAS et STING (Figure 37.A). En effet, les cellules HEK-293T n'expriment ni cGAS (336), ni STING (337). Ainsi, la surexpression de ces deux composants est nécessaire à l'activation de la voie de cGAS-STING dans ces cellules. Comme montré dans la Figure 37.A les protéines virales A151R et MGF360-21R sont capables d'inhiber la voie IFN-β en aval d'une stimulation cGAS-STING. Le poly(dA:dT), un analogue artificiel de l'ADNdb, permettant de mimer l'infection par l'ASFV, stimule les différents senseurs capables de détecter les ADNdb (cGAS, AIM2, DAI, DDX41, IFI16), mais aussi RIG-I de façon indirecte via la polymérase III. Ici, les HEK-293T n'exprimant pas cGAS, la stimulation par le poly(dA:dT) n'induit pas la voie cGAS-STING, mais seulement les autres voies. A151R et MGF360-21R sont aussi capables d'inhiber significativement l'induction d'IFN-β en aval d'un stimulation avec du poly(dA:dT) (Figure 37.B), avec une inhibition dose dépendante (Figue 37.C). A151R et MGF360-21R inhibent aussi

l'induction d'IFN-β en aval d'une surexpression par RIG-I (Figue 37.D), TBK1 (Figue 37.E) et IRF3 (Figue 37.F). Ainsi, quelle que soit la stimulation testée, les deux protéines virales d'intérêt semblent capables d'inhiber l'induction d'IFN-β.

Afin de vérifier si la même inhibition était retrouvée en cellules porcines, A151R et MGF360-21R ont été surexprimées en cellules PK15 (cellules rénales porcines). La voie IFN-I a été induite en utilisant de l'ISD (*interferon stimulatory DNA)* (Figure 38.A), un oligomère permettant d'induire spécifiquement l'axe cGAS-STING-TBK1 ainsi que par du poly(dA:dT) (Figure 38.B). L'expression du gène codant l'IFN-β a été évaluée en RT-qPCR, et montre que A151R et MGF360-21R sont également capables d'inhiber significativement l'induction d'IFN-β en cellules porcines (Figure 38).

Nous nous sommes ensuite demandé si ces deux protéines virales avaient aussi une action sur la voie de réponse aux IFN-I (voie JAK-STAT), en aval des récepteurs IFNAR. Pour ce faire, nous avons de nouveau utilisé un gène rapporteur, cette fois-ci avec le gène de la luciférase sous contrôle du promoteur ISRE. A151R et MGF360-21R ont ainsi été surexprimées en cellules HEK-293T, en présence des plasmides ISRE-luc et pCMV renilla. Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules ont été stimulées avec de l'IFN-β humain recombinant pendant 16h. Cette expérience a permis de mettre en évidence que A151R et MGF360-21R n'ont pas d'action sur cette voie (Figure 39). Ces deux protéines semblent donc jouer spécifiquement un rôle antagoniste sur la voie d'induction de l'IFN-β.

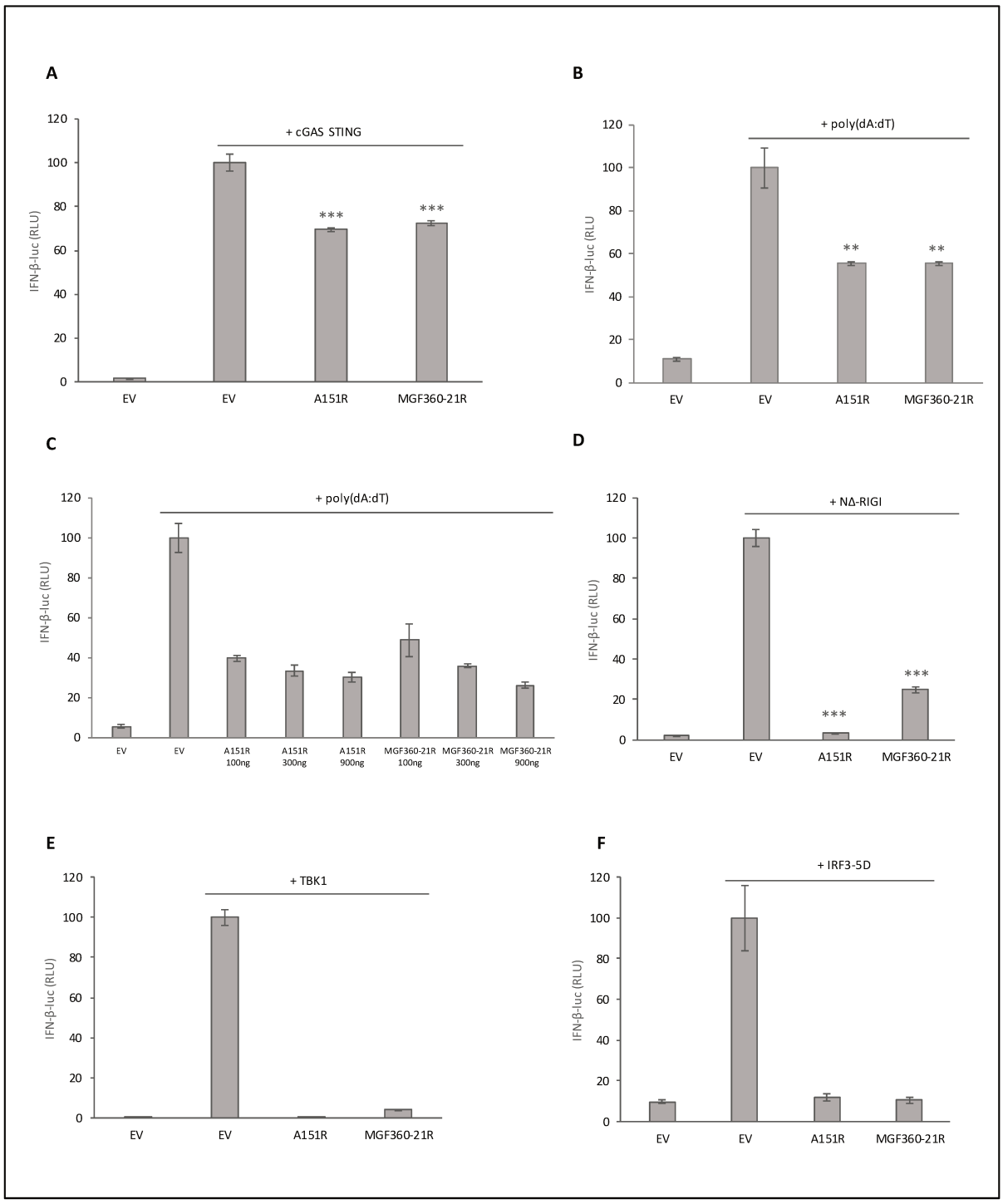


Figure 37 : Inhibition de la voie d'induction de l'IFN-β par A151R et MGF360-21R en cellules HEK-293T

Des cellules HEK-293T ont été transfectées avec 300 ng de gène rapporteur IFN-β-luc, 30ng de pCMV renilla ainsi qu'avec 300 ng de A151R-3x-flag ou MGF360-21R-3x-flag. Différents composants ont été utilisés pour stimuler la voie : (A) : 250 ng de cGAS et 250 ng de STING. (B) : 100 ng de poly(dA:dT). (C) Transfection de dose croissante de protéines virales (entre 100 ng et 900 ng) en présence de 100ng de poly(dA:dT). (D) : 300 ng de RIG-I constitutionnellement actif. (E) : 300 ng de TBK1. (F) : 300 ng de IRF3 constitutionnellement actif. EV : vecteur vide. Les résultats ont été normalisés par rapport aux valeurs de renilla-luciférase. Chaque point a été fait en triplicats et ces résultats correspondent à une seule expérience et sont représentatifs des résultats obtenus à l'issue d'un minimum de 3 expériences indépendantes.

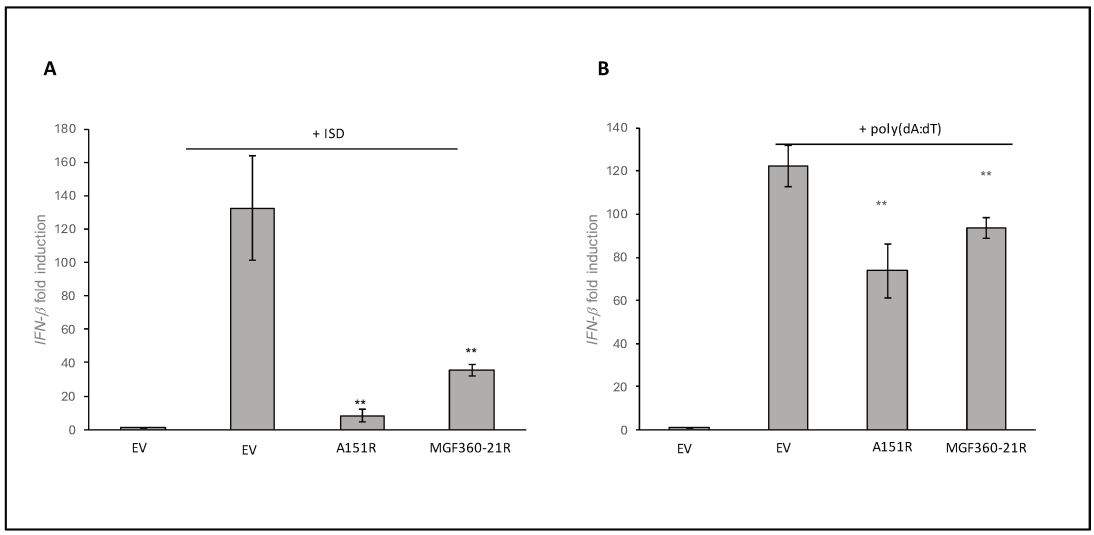


Figure 38 : Inhibition de l'induction d'IFN-β par A151R et MGF360-21R en cellules PK15.

Des cellules porcines PK15 ont été transfectées avec 300 ng de A151R-3x-flag ou MGF360-21R-3x-flag et stimulées avec 1000 ng d'ISD (A) ou 1000 ng de poly(dA:dT) (B). Quarante-huit heures après, les ARNs ont été extraits puis une RT-qPCR a été effectuée en utilisant des amorces encadrant le gène codant l'IFN-β porcin. L'expression de l'IFN-β a été normalisée par l'expression de la GAPDH. Chaque point a été fait en triplicats et ces résultats correspondent à une seule expérience et sont représentatifs des résultats obtenus à l'issue d'un minimum de 3 expériences indépendantes.

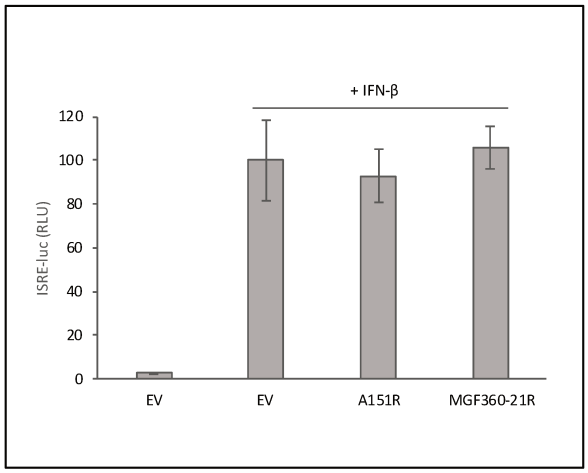


Figure 39 : A151R et MGF360-21R n'ont pas d'effet sur la voie d'amplification de la réponse IFN-I

Des cellules HEK-293T ont été transfectées avec 300 ng de ISRE-luc, 30 ng de pCMV renilla ainsi qu'avec 300 ng de A151R-3x-flag ou MGF360-21R-3x-flag. Vingt-quatre heures après les cellules ont été stimulées avec 1000 UI/mL d'IFN-β humain recombinant pendant 16 h. EV : vecteur vide. Les résultats ont été normalisés par rapport aux valeurs de renilla-luciférase. Chaque point a été fait en triplicats et ces résultats correspondent à une seule expérience et sont représentatifs des résultats obtenus à l'issue d'un minimum de 3 expériences indépendantes.

8. L'action inhibitrice de A151R et MGF360-21R ne semble pas liée à BANF1

Afin d'évaluer si l'action inhibitrice d'A151R et MGF360-21R est médiée par BANF1, un test rapporteur l'IFN-β-luc a été utilisé en présence d'un siARN dirigé contre BANF1 en cellules HEK-293T. Contre toute attente, l'inhibition induite par A151R et MGF360-21R est maintenue en absence de BANF1, que ce soit en aval d'une induction via cGAS-STING (Figure 40.A) ou via le poly(dA:dT) (Figure 40.B). La bonne extinction de l'expression du gène BANF1 a été vérifiée par RT-qPCR (Figure 40.C). Ainsi, l'inhibition de l'induction de la voie IFN-I induite par A151R et MGF360-21R est indépendante de BANF1.

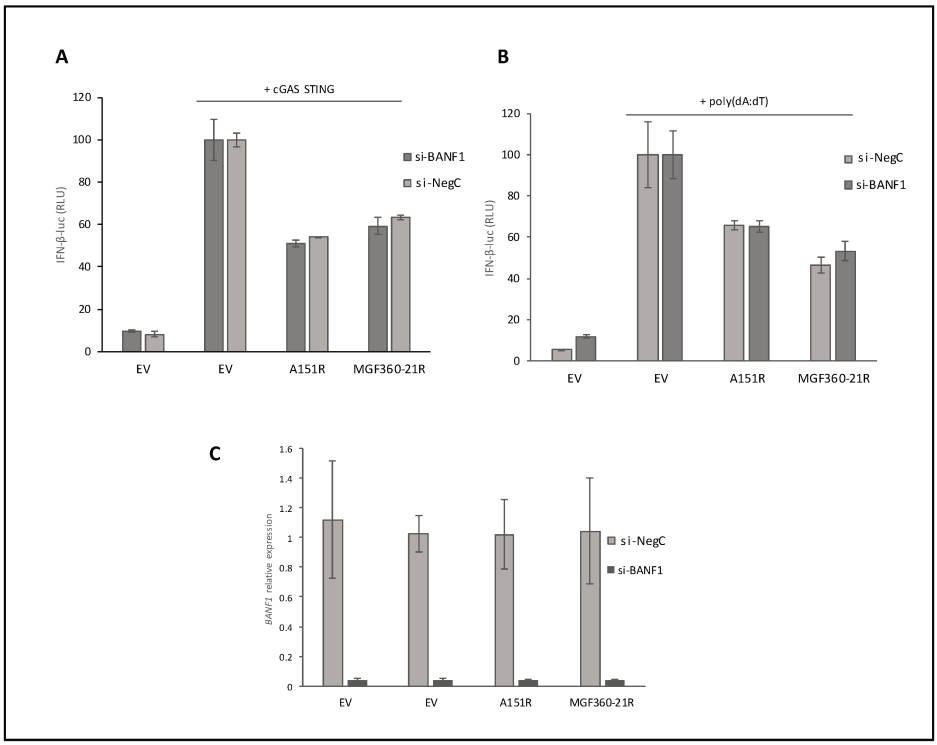


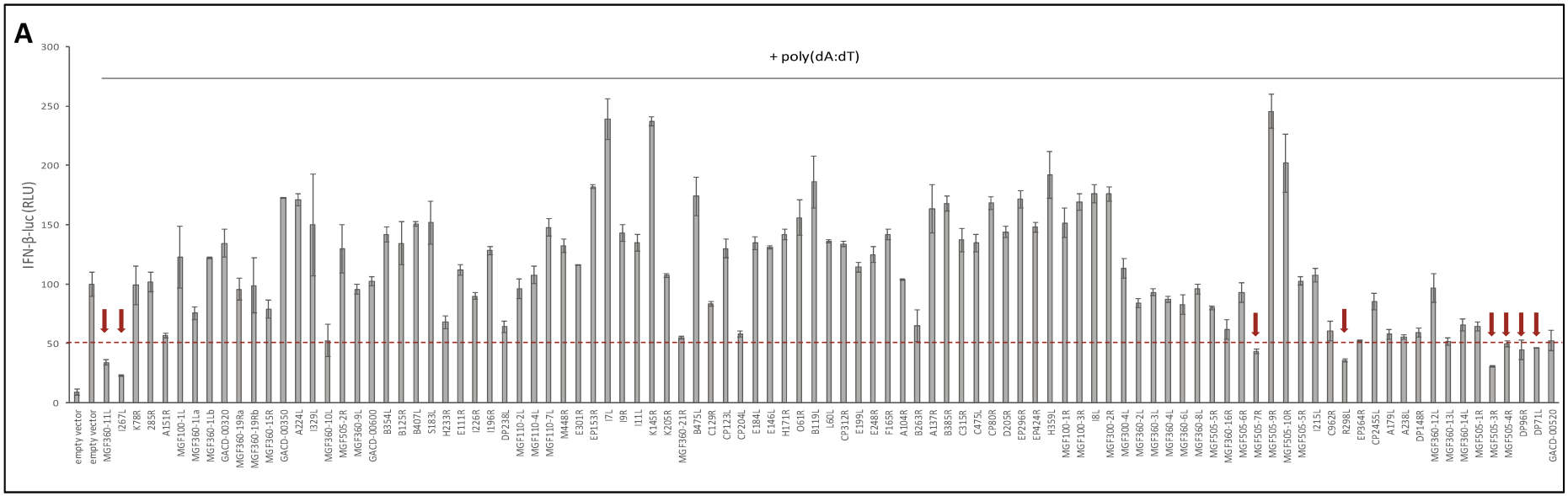
Figure 40 : Effet du silencing de BANF1 sur l'inhibition induite par A151R et MFG360-21R.

Des cellules HEK-293T ont été transfectées avec 2 nM de siARN dirigé contre BANF1 (si-BANF1) ou avec un si contrôle (si-NegC), avec 300 ng d'A151R-3x-flag ou de MGF360-21R-3x-flag, ainsi qu'avec 300 ng de gène rapporteur IFN-β-luc et 30 ng de pCMV renilla. (A) La voie IFN-I a été stimulée avec 250ng de cGAS et 250 ng de STING. (B) : stimulation avec 100 ng de poly(dA:dT). (C) : contrôle de l'extinction de BANF1 à 2 nM de si-BANF1 par RT-qPCR. Chaque point a été fait en triplicats et ces résultats correspondent à une seule expérience et sont représentatifs des résultats obtenus à l'issue d'un minimum de 3 expériences indépendantes.

9. Cribles avec à priori sur la voie IFN-I

Comme décrit dans l'introduction, nous savons que l'ASFV est capable d'inhiber efficacement la voie IFN-I. Afin d'expliquer cette inhibition sur le plan moléculaire, nous avons effectué un crible avec *à priori* pour tester individuellement la capacité des protéines d'ASFV à moduler les voies de l'IFN-I en cellules HEK-293T. Pour atteindre cet objectif, nous avons utilisé la même collection d'ORFs que celle utilisée dans nos cribles double-hybride et deux tests rapporteurs luciférase déjà mentionnés plus haut : IFN-β-luc et ISRE-luc stimulés respectivement par du poly(dA:dT) (Figure 41.A) et de l'IFN-β recombinant (Figure 41.B).

Parmi les différentes protéines testées, 8 protéines R298L, MGF360-11L, I267L, MGF505-7R, MGF505-3R, MGF505-4R, DP96R et DP71L inhibent à plus de 50% la voie d'induction. Sur la voie de réponse et d'amplification de l'IFN-I, seules 3 protéines C962R, MGF505-7R et R298L inhibent à plus de 50% cette voie.


A
+ poly(dA:dT)
IFN-β-luc (RLU)
300
250
200
150
100
50
0
empty vector
empty vector
MGF360-11L
I267L
K78R
285R
A151R
MGF100-1L
MGF360-1La
MGF360-1Lb
GACD-00320
MGF360-19Ra
MGF360-19Rb
MGF360-15R
GACD-00350
A224L
I329L
MGF360-10L
MGF505-2R
MGF360-9L
GACD-00600
B354L
B125R
B407L
S183L
H233R
E111R
I226R
I196R
DP238L
MGF110-2L
MGF110-4L
MGF110-7L
M448R
E301R
EP153R
I7L
I9R
I11L
K145R
K205R
MGF360-21R
B475L
C129R
CP123L
CP204L
E184L
E146L
H171R
O61R
B119L
L60L
CP312R
E199L
E248R
F165R
A104R
B263R
A137R
B385R
C315R
C475L
CP80R
D205R
EP296R
EP424R
H359L
MGF100-1R
MGF100-3R
I8L
MGF300-2R
MGF300-4L
MGF360-2L
MGF360-3L
MGF360-4L
MGF360-6L
MGF360-8L
MGF505-5R
MGF360-16R
MGF505-6R
MGF505-7R
MGF505-9R
MGF505-10R
MGF505-5R
I215L
C962R
R298L
EP364R
CP2455L
A179L
A238L
DP148R
MGF360-12L
MGF360-13L
MGF360-14L
MGF505-1R
MGF505-3R
MGF505-4R
DP96R
DP71L
GACD-00520

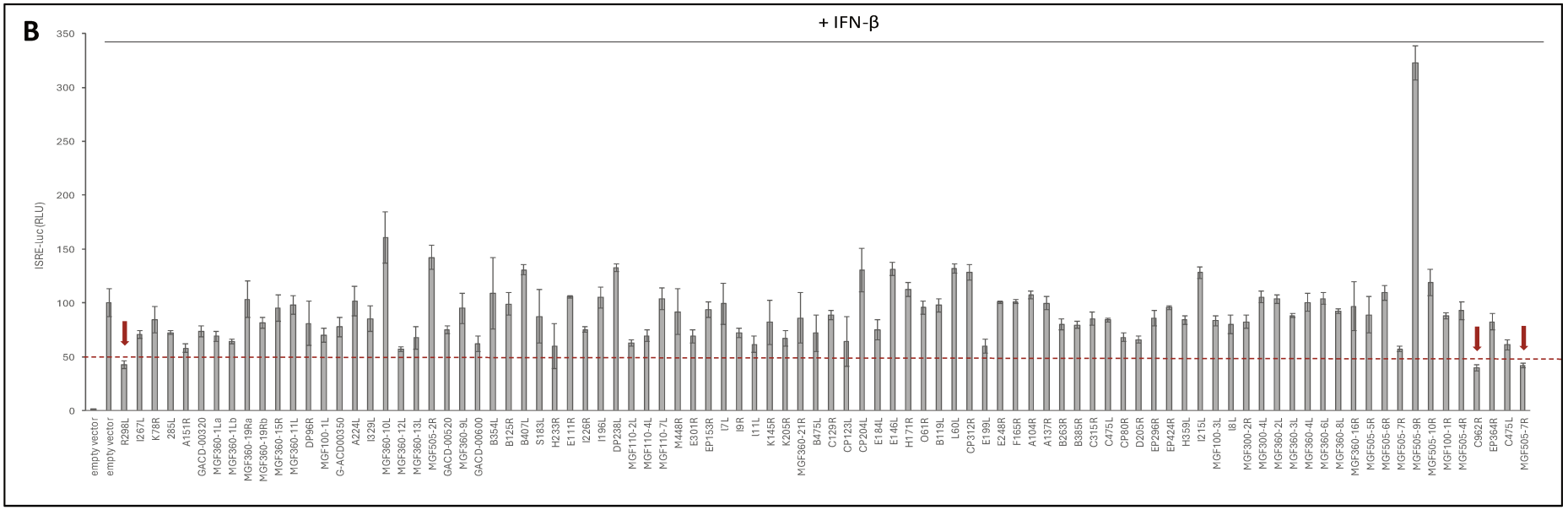

B
+ IFN-β
ISRE-luc (RLU)
350
300
250
200
150
100
50
0
empty vector
empty vector
R298L
I267L
K78R
285L
A151R
GACD-00320
MGF360-1La
MGF360-1Lb
MGF360-19Ra
MGF360-19Rb
MGF360-15R
MGF360-11L
DP96R
MGF100-1L
G-ACD00350
A224L
I329L
MGF360-10L
MGF360-12L
MGF360-13L
MGF505-2R
GACD-00520
MGF360-9L
GACD-00600
B354L
B125R
B407L
S183L
H233R
E111R
I226R
I196L
DP238L
MGF110-2L
MGF110-4L
MGF110-7L
M448R
E301R
EP153R
I7L
I9R
I11L
K145R
K205R
MGF360-21R
B475L
C129R
CP123L
CP204L
E184L
E146L
H171R
O61R
B119L
L60L
CP312R
E199L
E248R
F165R
A104R
A137R
B263R
B385R
C315R
C475L
CP80R
D205R
EP296R
EP424R
H359L
I215L
MGF100-3L
I8L
MGF300-2R
MGF300-4L
MGF360-2L
MGF360-3L
MGF360-4L
MGF360-6L
MGF360-8L
MGF360-16R
MGF505-5R
MGF505-6R
MGF505-7R
MGF505-9R
MGF505-10R
MGF100-1R
MGF505-4R
C962R
EP364R
C475L
MGF505-7R

Figure 41 : Identification des inhibiteurs des voies d'induction et d'amplification de la réponse IFN-I.

A : Des cellules HEK-293T ont été transfectées avec 300 ng de gène rapporteur IFN-β-luc, 30ng de pCMV renilla, 300 ng de plasmides codant les différentes protéines virales ainsi qu'avec 100 ng de poly(dA:dT). Quarante-huit heures après, les cellules ont été lysées et les quantités de luciférase ont été mesurées. B : Des cellules HEK-293T ont été transfectées avec 300 ng de gène rapporteur ISRE-luc, 30ng de pCMV renilla, 300 ng de plasmides codant les différentes protéines virales. Vingt-quatre heures après transfection, 1000 UI/mL d'IFN-β ont été ajouté. Seize heures après, les cellules ont été lysées et les quantités de luciférase ont été mesurées. Chaque point a été fait en triplicats. La ligne pointillée rouge représente le seuil de 50%. Les flèches rouges mettent en valeur les protéines inhibitrices.

IV. Discussion

1. Cribles Y2H

L'objectif de cette première partie de ma thèse a été de cribler par la technique du double- hybride en levure une grande partie des protéines codées par l'ASFV (souche Georgia 2007/1). Nous avons pu dévoiler une partie de l'interactome de l'ASFV, avec 88 interacteurs cellulaires identifiés lors de nos cribles en Y2H. Cependant, l'ASFV est un virus très complexe, codant de multiples protéines capables inhiber de nombreuses voies cellulaires, en particulier en lien avec l'immunité innée. Compte tenu de ces éléments, nous nous attendions à trouver un plus grand nombre d'interactions entre l'ASFV et son l'hôte, permettant au virus de reprogrammer l'environnement cellulaire en vue d'une réplication efficace et d'un échappement immunitaire. Peu d'appâts ont donné des interacteurs cellulaires en Y2H, avec en outre une grande disparité au niveau du nombre de clones entre nos deux banques d'ADNc utilisées. En effet, les faux négatifs semblent être le principal biais du Y2H et peuvent s'expliquer par différentes raisons.

Il pourrait s'agir d'un problème avec la qualité des banques. En effet, les deux banques d'ADNc n'ont pas été obtenues par les mêmes prestataires. La banque porcine semblerait être peu complexe et peu diverse par rapport à la banque humaine. Le contenu des banques est inconnu et n'est pas forcément représentatif de ce qui est vraiment exprimé au sein d'une cellule. Pour pallier ce manque de connaissance, il serait possible de faire du NGS (*Next Generation sequencing*) pour connaitre les compositions exactes des banques et ainsi savoir quels sont les types d'ADNc exprimés dans celles-ci. De plus, nous avons seulement utilisé des ORFs codant pour des formes entières des protéines virales en appât. Ces formes entières pourraient par exemple créer un encombrement stérique masquant des interfaces de liaison. Il serait ainsi opportun de tester individuellement les sous-domaines de ces protéines en tant qu'appât. Les étiquettes AD et BD utilisés, clonées du côté N-terminal, pourraient aussi empêcher l'identification de certaines interactions. Les protéines (appâts et proies) exprimées de façon hétérologue dans la levure n'ont pas forcément les mêmes repliements, localisations et expressions que dans la cellule hôte. Cela pourrait notamment être dû au fait que les

levures ne reproduisent pas forcément les mêmes modifications post-traductionnelles que dans la cellule hôte, pouvant affecter la fonction et la stabilité des protéines. En outre, les interactions sont testées au sein du noyau de la levure, ce qui ne correspond pas toujours à la localisation physiologique de l'interaction (325). Les interactions faibles ou transitoires peuvent échapper à la détection par Y2H.

Enfin, seules les interactions binaires peuvent être détectées. Le Y2H ne permet pas d'avoir une vue complète du réseau d'interactions au sein de la cellule, puisque les interactions au sein de complexes multiprotéiques ne peuvent être identifiées. Pour pallier ce problème, nous pouvons utiliser des bases de données d'interactions déjà décrites comme STRING afin d'établir la connexion des interacteurs cellulaires, c'est à dire identifier les interactions au niveau N+1. Nous pouvons aussi émettre l'hypothèse que certaines interactions virus-hôte ne peuvent être détectées qu'en contexte infectieux ou en présence de certaines autres protéines virales. Ainsi, une méthode par co-purification d'affinité suivie d'une analyse en spectrométrie de masse peut être très complémentaire du Y2H (intérêt de notre collaboration avec l'équipe du FLI) car celle-ci permet d'identifier des interactions directes ou indirectes, et même en contexte infectieux.

Il serait aussi particulièrement intéressant d'établir l'interactome au sein même du virus, permettant d'identifier les complexes de protéines virales. Cela permettrait peut-être d'élucider les fonctions inconnues de certaines protéines virales et de comprendre par exemple les mécanismes moléculaires mis en place au cours du cycle de réplication, qui ne sont pas encore totalement connus à ce jour.

2. Analyse des GO Terms

Une analyse de l'ensemble des interacteurs a permis d'identifier plusieurs processus cellulaires enrichis, dont ceux en lien avec l'immunité, les infections virales, la traduction et l'organisation cellulaire (Annexe 5).

Parmi ces différents modules fonctionnels de la cellule piratés par l'ASFV, nous nous sommes particulièrement intéressés à ceux en lien avec la voie IFN-I. En plus de BANF1, COPA par exemple, (identifiée 5 fois avec MGF360-11L), possède un rôle essentiel dans le

transport de STING du Golgi vers le RE (338). UBA3 (identifiée 8 fois avec MGF360-12L), est impliquée dans le processus de neddylation, une modification post-traductionnelle décrite pour être notamment nécessaire à la production d'IFN-I induite par le virus HSV-I (339). Enfin, CALCOCO2 (identifiée 2 fois avec MGF505-3R) est une protéine de l'autophagie connue pour être impliquée dans la dégradation d'IRF3 (340). Il est à noter que ces trois interacteurs cellulaires ont été retrouvés uniquement avec la banque humaine. Nous avons déjà confirmé les interactions UBA3-MGF360-12L et COPA-MGF360-11L par GST pull-down. Les protéines MGF360-11L et MGF360-12L ont déjà été montrées dans la littérature comme étant des inhibiteurs de la voie IFN-I (268, 292). Il serait maintenant intéressant d'évaluer si ces inhibitions de la voie IFN-I pourraient aussi être expliquées par ces interactions. L'interaction entre UBA3 et MGF360-12L est actuellement étudiée de manière plus approfondie par nos collaborateurs du *Pirbright Institute* (équipe de Linda Dixon).

En plus des interacteurs en lien avec l'IFN-I, de nombreuses autres proies identifiées sont en lien avec l'immunité. Plusieurs GO Terms à l'interface entre immunités innée et adaptative font partie des modules fonctionnels les plus enrichis : assemblage d'antigènes avec le complexe du CMH II (B2M, HLA-DQA1), présentation d'antigène (B2M, HLA-DQA1, MLH1, HLA-B, CD74) et production d'IFNγ (FLNB, CALCOCO2, CD74, EPRS1, VIM, GSN) (Annexe 5). Ces voies étant très peu étudiées dans le cadre de l'infection par l'ASFV, il serait particulièrement intéressant d'étudier ces interactions car la majeure partie de ces proies cellulaires sont associées à l'appât viral MGF100-1R, dont la fonction est encore inconnue.

3. Un autre crible en Y2H a récemment été publié

Nous pensions dévoiler pour la première fois une partie l'interactome avec le Y2H, approche que nous pensions inédite pour l'ASFV. Pourtant, très récemment (novembre 2023) une publication a montré l'interactome entre les protéines de l'ASFV et les voies de l'immunité innée (341). Cette équipe a aussi utilisé une technique de Y2H, mais avec un système de crible d'une banque virale contre une banque de gènes cellulaires appelée RLL-YH2 (*recombination-based library vs library yeast two-hybrid*) (342). Ils ont ainsi pu cribler 179 protéines codées par la souche chinoise HLJ/18 de l'ASFV (dont MGF360-21R et A151R) contre 1264 protéines

porcines impliquées dans l'immunité innée. Cette banque porcine a été construite à partir d'ARN extraits de différents organes de porcs domestiques. Par cette approche, ils ont pu mettre en évidence des interacteurs cellulaires pour 43% de leurs protéines virales testées, ce qui est un pourcentage supérieur à nos résultats (18%). Le fait d'orienter le crible vis-à-vis d'une banque de l'immunité innée, cible préférentielle des infections virales, est un avantage certain pour aller chercher des interactions virus-hôte. Ils n'ont pas retrouvé d'interacteur pour MGF360-21R, BANF1 ne faisant pas partie de leur collection « immunité innée ». En revanche, NFκB1, IKKα et p65 ont été retrouvés pour interagir avec A151R. Peut-être que ces gènes cellulaires n'étaient pas ou peu exprimés dans notre banque porcine. Finalement, aucun interacteur commun n'a été identifié entre nos cribles et ceux réalisés dans cette étude. Ainsi, nous avons eu des résultats différents avec des approches relativement similaires (pas la même banque, ni la même souche virale). Cela démontre une nouvelle fois l'intérêt de combiner différentes approches.

4. Interaction A151R-BANF1-MGF360-21R

Les cribles Y2H nous ont permis d'identifier BANF1 comme interacteur cellulaire des protéines virales A151R et MGF360-21R. Nous avons confirmé cette interaction par GST *pull-down* et nos collègues du FLI l'ont également identifiée en AP-MS en contexte infectieux. BANF1 est une protéine capable de se lier à l'ADN double brin et de le compacter afin de former une nucléoprotéine (343). Cette action est médiée par le domaine de liaison à l'ADN de BANF1 présentant un motif hélice-épingle à cheveux-hélice (344). BANF1 est nécessaire à de multiples processus cellulaires. Elle agit sur l'assemblage post-mitotique (345–349) mais aussi sur la réparation de la membrane nucléaire (350, 351), la voie de réponse aux lésions de l'ADN (352, 353) et le recrutement de facteurs de transcription (352, 354, 355). La plupart de ses actions semblent ainsi être en lien avec le maintien de l'intégrité du génome (356). BANF1 joue aussi un rôle dans l'immunité innée, notamment en entravant la voie cGAS-STING. BANF1 entre en compétition avec cGAS pour accéder à l'ADN dans le noyau ainsi que dans le cytoplasme (327), empêchant ainsi cGAS de détecter les ADN cellulaires endogènes. BANF1 protège contre une réponse basale de la voie cGAS-STING et sa déplétion induit une

augmentation de l'expression des ISGs ainsi qu'une diminution de l'infection par différents virus (Flavivirus, Alphavirus, Herpesvirus) (328).

Nous avons aussi mis en évidence que A151R et MGF360-21R inhibent particulièrement bien la voie IFN-I, que ce soit en aval d'une stimulation cGAS/STING ou poly(dA:dT). Grâce à l'utilisation d'ARN interférence dirigé contre BANF1, nous savons que cette inhibition est indépendante de BANF1. Cependant, nous n'avons pas encore réussi à décrire le mécanisme d'inhibition de ces deux protéines virales. Ces deux protéines semblent agir en aval d'IRF3, peut être en jouant sur sa phosphorylation ou sur sa translocation nucléaire. Des données non publiées de l'équipe du Dr Linda Dixon (*Pirbright Institute*) semblent montrer que certaines protéines de la famille des MGFs bloqueraient IRF3 au niveau de sa liaison à l'ADN, ce qui pourrait être cohérent avec nos données. Il serait cependant intéressant d'évaluer le rôle de ces protéines en contexte infectieux. Pour ce faire, nous sommes en collaboration avec cette même équipe du *Pirbright Institute* afin d'évaluer l'impact de la double délétion de ces protéines au sein de la souche Georgia 2007/01. Nous saurons ainsi prochainement si les délétions (simples ou doubles) de ces gènes induisent une différence d'induction d'IFN-I. Cela nous permettra aussi d'évaluer l'impact de l'absence de ces deux protéines sur la réplication du virus. Si tel est le cas, cela nous permettrait aussi à terme d'imaginer une nouvelle souche à potentiel vaccinal.

Nous avons pu mettre en évidence une nouvelle fonction antagoniste de la voie d'induction de l'IFN-I pour la protéine MGF360-21R. Cette protéine n'est à ce jour absolument pas décrite dans la littérature et aucune fonction ne lui est connue. Nous avons pu noter quelques difficultés à exprimer cette protéine virale dans nos différents types cellulaires. Elle semble en effet induire une certaine toxicité, puisque les images de microscopies semblent montrer que les cellules exprimant cette protéine ont l'air d'être dans un mauvais état physiologique. Il serait ainsi peut être pertinent de mesurer si effectivement MGF360-21R induit une mort cellulaire. Cette protéine fait partie de la famille des MGFs, dont de nombreuses autres protéines ont déjà été décrites comme étant des facteurs de virulence, inhibant aussi la voie IFN-I. En effet, MGF505-11R, MGF360-13L, MGF505-7R, MGF360-11L, MGF505-3R, MGF110-9L, MGF360-14L, et MGF360-15R ont déjà été montrés comme étant des inhibiteurs de la voie d'induction d'IFN-I. Il semble donc y avoir une certaine redondance fonctionnelle au sein de la famille des MGF. Ces gènes ont évolué par

recombinaison homologue (92), ce qui semble être une manœuvre efficace de l'ASFV pour générer de la diversité génétique et développer des stratégies pour échapper à l'immunité de l'hôte (91). Le même type de mécanisme semble avoir eu lieu chez les poxvirus, permettant au virus de s'adapter et d'évoluer pour pirater les défenses de l'hôte, malgré le faible taux de mutations de ce gros virus à ADN (357).

Concernant A151R, elle a préalablement été décrite comme un facteur de virulence, car sa délétion entraine une atténuation de la souche Georgia 2010 (335) et une protection des porcs challengés avec la souche parentale. Nous pensions montrer pour la première fois son action inhibitrice sur la voie IFN-I. Pourtant, la même publication très récente ayant publié les cribles Y2H a aussi montré qu'A151R avait une action inhibitrice sur la voie IFN-I (341). De notre côté, nous n'avons pas réussi à trouver d'autres interacteurs d'A151R, en dehors de BANF1. Nous avions notamment testé l'interaction entre A151R et une quinzaine de protéines de la voie IFN-I (dont IKKα) préférentiellement ciblées lors d'infection virale grâce à une technique de split-nanoluciférase. Nous n'avons pourtant identifié aucune interaction entre IKKα et A151R dans nos conditions expérimentales.

Nous avons pu montrer en microscopie à fluorescence que BANF1-cherry et BANF1 endogène ont des localisations différentes. En effet, BANF1-cherry seule semble localiser de façon ponctiforme en périphérie du noyau, tandis que BANF1 endogène semble exclusivement localisée dans le noyau. Il serait ainsi possible que l'étiquette cherry empêche la translocation nucléaire de BANF1. Nous avons aussi pu montrer que la surexpression des protéines virales A151R et MGF360-21R induisait une relocalisation de BANF1 endogène du noyau vers le cytoplasme dans des cellules non infectées. Cependant, au cours de l'infection, nos collaborateurs du FLI n'ont pas été capables de détecter BANF1 endogène ou alors très légèrement au sein du cytoplasme. Or, des analyses montrent que l'infection n'induit pas de dégradation de BANF1 (Figure 35.D). Il pourrait alors s'agir d'un défaut technique de détection de BANF1. Nous pouvons imaginer que les épitopes détectés par l'anticorps anti-BANF1 pourraient être masqués par des modifications post-traductionnelles induites sur BANF1 en réponse à l'infection, empêchant ainsi la reconnaissance par l'anticorps. Par exemple, il a déjà été montré à de multiples reprises que la phosphorylation de BANF1 induit sa relocalisation

vers le cytoplasme (334, 358). Les kinases cellulaires VRKs (*vaccinia-related kinases*) sont notamment capables de phosphoryler le domaine N-terminal de BANF1, induisant sa relocalisation vers le cytoplasme (334). Cette kinase VRK1 fait d'ailleurs partie des protéines particulièrement surexprimées lors de l'analyse du protéome cellulaire en présence de si-BANF1. La phosphorylation de BANF1 sur ses résidus thréonine et serine en positions 2, 3 et 4 de sa séquence primaire (334, 359, 360) régule sa fonction et en particulier son affinité de liaison à l'ADN (perte de l'interaction) (330, 351). Différents virus sont capables de moduler cet état de phosphorylation de BANF1. Par exemple, BANF1 non phosphorylée interagit de façon stable avec l'ADN du HSV-1, interférant ainsi avec sa réplication. La phosphorylation de BANF1 diminue sa fonction antivirale, permettant ainsi une réplication efficace de l'HSV-1 (330). De même, BANF1 se lie au génome du Virus de la Vaccine dans le cytoplasme, empêchant ainsi sa réplication. Or, la protéine B1 de ce Poxvirus est capable de phosphoryler et donc d'inactiver BANF1 (331, 361, 362). Il serait ainsi particulièrement pertinent de s'intéresser à l'état de phosphorylation de BANF1 au cours de l'infection par l'ASFV.

BANF1 a une action antivirale sur la réplication de nombreux virus de différentes familles, tels que le VV (361), l'HSV-1 (330) ou l'HBV (Virus de l'Hépatite B) (363). Cependant, BANF1 semble avoir une action provirale dans le cadre de l'infection par l'ASFV, car l'absence de celle-ci induit une diminution de la réplication, bien que la surexpression de BANF1 ne semble pas avoir d'impact sur la réplication virale. L'action provirale de BANF1 a déjà été décrite dans le cadre de l'infection par différents Retroviridae tels que le VIH (Virus de l'Immunodéficience humaine) ou le MoMLV (Virus de la leucémie murine de Moloney), BANF1 faisant partie de leur complexe de pré-intégration (332, 364, 365). BANF1 a aussi une action provirale chez les Gammaherpèsvirus dont le KSHV (Virus du Sarcome de Kaposi) et l'EBV (Virus d'Epstein-Barr). Chez ces derniers, l'action inhibitrice de BANF1 sur cGAS permet la réactivation lytique de ces virus sans détection par ce senseur cytoplasmique (366). Il serait ainsi pertinent de s'intéresser aux mécanismes expliquant cette action provirale de BANF1 sur l'ASFV et d'investiguer plus profondément le lien entre ASFV, BANF1 et cGAS.

Nous avons remarqué une différence dans la force de l'interaction A151R-BANF1 par rapport à celle entre MGF360-21R et BANF1. En effet, nos résultats de Y2H semblent décrire une interaction A151R-BANF1 plus forte que l'interaction MGF360-21R-BANF1. Afin de mesurer plus précisément la force de ces interactions, des expériences de MST (*MicroScale*

Thermophoresis) sont actuellement réalisées par l'équipe du FLI, afin de mesurer précisément les affinités de liaison.

Nous avons également tenté de cartographier l'interaction A151R-BANF1. Nous avons utilisé une approche systématique en délétant tous les 12 ou 25 acides aminées, respectivement pour BANF1 et A151R, permettant de réduire l'interface de liaison en C-ter et en N-ter de chacune de nos protéines d'intérêt. A l'issue de ces expériences, seule la forme entière de A151R semble interagir avec BANF1. Peut-être aurait-il fallu utiliser des logiciels de prédiction de conformations de la structure tertiaire des protéines, permettant de prédire d'éventuels domaines favorables aux interactions au lieu de déléter de façon aléatoire les acides aminés de chaque côté de la protéine. En effet, certaines protéines possèdent des domaines intrinsèquement désordonnés leur permettant d'établir des interactions avec de nombreux partenaires. En utilisant *a posteriori* un logiciel de prédiction de domaine intrinsèquement désordonné (Predict Protein & DISEMBL), nous avons identifié un domaine désordonné entre ses acides aminés 51 et 65 prédit pour la protéine A151R. De plus, la structure de A151R déterminée en cristallographie semble indiquer un domaine en doigt de zinc en C-ter (367), motif souvent impliqué dans les interactions protéine-protéine/ADN/ARN (368). D'autres données de la littérature indiquent que BANF1 possède aussi un domaine intrinsèquement désordonné en Nter, contenant plusieurs interfaces de liaison qui sont abolies lorsque certains résidus de ce domaine sont phosphorylés (369). Nous avons pour l'instant pu réduire l'interface de liaison au sein de BANF1 pour A151R de 17 acides aminés, côté N-ter. *A priori*, les résidus potentiellement phosphorylés en N-ter ne sont pas impliqués dans l'interaction avec A151R. Il serait maintenant pertinent de tester plus précisément l'interaction entre A151R avec BANF1 au niveau du domaine désordonné entre les acides aminés 51 et 65, ainsi qu'au niveau du domaine en doigt de zinc.

Nous n'avons pas encore cartographié l'interaction entre BANF1 et MGF360-21R. L'analyse des fragments identifiés en Y2H nous permet d'affirmer que les 28 premiers acides aminés de BANF1 ne semblent pas participer à l'interaction (Figure 33). Il serait maintenant intéressant d'identifier plus précisément le domaine minimum d'interaction, pour savoir s'il chevauche celui entre A151R et BANF1. Les interactions BANF1-A151R et BANF1-MGF360-21R sont actuellement en train d'être modélisées par l'équipe du FLI, ce qui pourrait être complémentaire avec nos approches de cartographie du domaine minimum d'interaction afin

de comprendre notamment comment ces protéines interagissent. Forment-elles un complexe tripartite ? Interagissent-elles de manière séquentielle ? Pour commencer à répondre à ces questions, nous avons testé l'interaction entre A151R et MGF360-21R par Y2H. Contrairement aux données de nos collègues du FLI, nous n'avons pas pu mettre en évidence cette interaction. Cette dernière pourrait être, par exemple, médiée par BANF1, ceci pourrait alors expliquer le fait qu'elle ne soit pas détectable par Y2H.

5. Cribles sur la voie IFN-I

En parallèle de l'approche de protéomique, nous avons utilisé la même collection de protéines virales pour effectuer un crible ciblé sur la voie IFN-I. Nous avons pu mettre en évidence un grand nombre de protéines ayant une tendance à inhiber les voies d'induction et d'amplification de l'IFN-I, permettant aussi d'illustrer les rôles redondants des protéines de l'ASFV dans l'inhibition ces voies. Ce grand nombre de protéines inhibitrices, bien que cohérent avec les donnes récentes de la littérature, nous a incité à nous interroger quant au seuil à fixer pour affirmer une inhibition. De façon arbitraire, nous l'avons choisi à > 50%. Sur les huit protéines (R298L, MGF360-11L, I267L, MGF505-7R, MGF505-3R, MGF505-4R, DP96R et DP71L) inhibant à plus de 50% la voie d'induction de l'IFN-I, cinq ont depuis été décrites dans la littérature pour le même phénotype (188, 267–269, 271). Sur la voie d'amplification de la réponse IFN-I, sur les trois protéines (C962R, MGF505-7R et R298L) inhibant à plus de 50% cette voie, l'une a depuis été décrite dans la littérature (280). Il semble cependant y avoir certaines différences entre les données publiées dans la littérature et notre crible. Ces différences peuvent parfois s'expliquer par le type cellulaire utilisé et la façon de stimuler ces voies IFN-I.

Parmi les résultats des cribles en Y2H effectués, seule l'interaction entre COPA et MGF360-11L pourrait potentiellement expliquer l'une de ces inhibitions. Étant donné que nous sommes particulièrement intéressés par les interacteurs en lien avec la voie IFN-I, il serait opportun d'effectuer des cribles contre une banque d'ADNc issus de cellules prétraitées à l'IFN. Cela permettrait d'exprimer des gènes en lien avec l'immunité innée, tels que les ISGs, non

exprimés à l'état basal dans la cellule. Ne serait-il pas pertinent d'effectuer également nos cribles contre une banque d'ADNc issus de cellules préalablement infectées ?

Il nous reste maintenant à décrypter les interactions moléculaires expliquant les inhibitions non décrites dans la littérature. Comprendre les mécanismes sous-jacents de cette inhibition est particulièrement important dans le but de trouver des cibles permettant d'imaginer de nouveaux vaccins vivants atténués.

CHAPITRE 2 : Processus d'atténuation et d'inhibition de la voie IFN-I

I. Introduction

L'issue de l'infection par le virus de la peste porcine africaine varie en fonction des facteurs liés à l'hôte et au virus. Les souches virulentes induisent un taux de létalité proche de 100%. Pourtant, des isolats naturellement atténués dont certains gènes ont été délétés, peuvent induire une forme réduite ou inexistante de la maladie. Le génome de l'ASFV contient de très nombreux ORFs. Parmi eux, certains codent des protéines absolument essentielles au cycle de réplication du virus, tandis que d'autres ne sont pas forcément nécessaires à la réplication virale, mais permettent d'échapper aux réponses immunitaires. Les protéines codées par les gènes de la famille des MGF ont notamment été décrites comme capables de pirater la voie IFN-I. Ces MGF font partie de ces facteurs de virulence, absents de certaines souches atténuées, naturellement (89) ou non (162).

L'équipe Virologie Immunologie Porcine de l'ANSES, menée par ma co-encadrante de thèse Marie-Frédérique Le Potier, a récemment décrit et caractérisé une nouvelle souche atténuée, appelée ASFV-989 (370). Cette souche a été générée de façon tout à fait fortuite, lors d'une tentative d'inactivation de la souche particulièrement virulente Georgia 2007/1. La souche ASFV-989 présente une délétion de 7 458 nucléotides au sein de la région codant pour les MGF505/360, correspond ainsi à la délétion partielle de MGF505-1R et -4R ainsi qu'à la délétion totale de six gènes MGF360-12L, -13L, -14L, MGF505-1R, -2R, -3R, -4R et G_ACD00_520.

La première caractérisation de cette souche a permis de mettre en lumière son potentiel vaccinal. *In vivo*, des porcs SPF (*specific pathogen free*) infectés avec la souche 989 par voies intramusculaire ou oronasale ne présentent que de légers symptômes

(hyperthermie transitoire et légère diminution de la croissance par rapport aux porcs contrôles non infectés), ainsi qu'une virémie jusqu'à 1000 fois inférieure aux animaux infectés avec la souche parentale. Les porcs infectés avec la souche atténuée ont développé une réponse via les anticorps et une réponse à médiation cellulaire. Enfin, les porcs immunisés avec l'ASFV-989 puis infectés avec la souche Georgia 2007/1 ne développent pas de symptôme ni de virémie induite par la souche parentale (371).

Nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires sous-jacents à l'atténuation de la souche ASFV-989. Pour atteindre cet objectif, nous avons tout d'abord comparé l'induction de la voie IFN-I en réponse à l'infection par la souche ASFV 989 et par la souche parentale Georgia 2007/1, *in vivo* sur porcs et *in vitro* sur macrophages alvéolaires porcins. Puis, nous avons comparé la capacité des protéines codées par les gènes délétés dans la souche atténuée à moduler individuellement la voie IFN-I à l'aide des mêmes tests rapporteurs luciférase que ceux mentionnés plus haut.

Cette partie de ma thèse fait actuellement l'objet d'une publication soumise au journal *Frontiers Immunology* que vous retrouverez dans la section suivante.

Exploring Type I interferon pathway: virulent vs. attenuated strain of African swine fever virus revealing a novel function carried by MGF505-4R

Authors: Juliette Dupré[1,2†], Mireille Le Dimna[2,†], Evelyne Hutet[2], Pascal Dujardin[1], Aurore Fablet[1], Aurélien Leroy[3], Isabelle Fleurot[3], Grégory Karadjian[4], Ferdinand Roesch[3], Ignacio Caballero[3], Olivier Bourry[2], Damien Vitour[1], Marie-Frédérique Le Potier[2,*†] and Grégory Caignard[1,*†]

Affiliations: [1]UMR VIROLOGIE, INRAE, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, ANSES Laboratoire de Santé Animale, Université Paris-Est, 94700 Maisons-Alfort, France. [2]Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (Anses), Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, BP 53, 22440 Ploufragan, France. [3]UMR 1282 ISP, INRAE Centre Val de Loire, Nouzilly, France. [4]Laboratoire de Santé Animale, UMR BIPAR, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, INRAE, ANSES, F-94700 Maisons-Alfort, France. [†]These authors contributed equally to this work.

[*]**Corresponding authors:** Marie-Frédérique Le Potier; Email: marie-frederique.lepotier@anses.fr; Phone: 33-(2)-96-01-62-90 ; Grégory Caignard; Email: gregory.caignard@vet-alfort.fr; Phone: 33-(1)-43-96-73-75.

Abstract

African swine fever virus represents a significant reemerging threat to livestock populations, as its incidence and geographic distribution have surged over the past decade in Europe, Asia, and Caribbean, resulting in substantial socio-economic burdens and adverse effects on animal health and welfare. In a previous report, we described the protective properties of our newly thermo-attenuated strain (ASFV-989) in pigs against an experimental infection of its parental Georgia 2007/1 virulent strain. In this new study, our objective was to characterize the molecular mechanisms underlying the attenuation of ASFV-989. We first compared the activation of type I interferon pathway in response to ASFV-989 and Georgia 2007/1 infections, employing both *in vivo* and *in vitro* models. Expression of *IFN-α* was significantly increased in porcine alveolar macrophages infected with ASFV-989 while pigs infected with Georgia 2007/1 showed higher IFN-α than those infected by ASFV-989. We also used a medium-throughput transcriptomic approach to study the expression of viral genes by both strains, and identified several patterns of gene expression. Subsequently, we investigated whether proteins encoded by the eight genes deleted in ASFV-989 contribute to the modulation of the type I interferon signaling pathway. Using different strategies, we showed that MGF505-4R interfered with the induction of IFN-α/β pathway, likely through interaction with TRAF3. Altogether, our data reveal key differences between ASFV-989 and Georgia 2007/1 in their ability to control IFN-α/β signaling and provide molecular mechanisms underlying the role of MGF505-4R as a virulence factor.

Keywords: African swine fever virus, IFN, viral immune evasion, virulence factor, TRAF3.

Running title: ASFV virulence and IFN evasion

Introduction

African Swine Fever (ASF) represents a significant health risk due to its ability to cause severe and often fatal disease in domestic pigs and wild boars, with no efficient vaccine or treatment. Due to the ensuing high socio-economic burden and impact on animal health, ASF is a listed disease by the World Organisation for Animal Health (WOAH). Therefore, ASF remains a significant challenge for the worldwide pig farming sector, casting a pervasive shadow over porcine populations. The causative agent, African Swine Fever Virus (ASFV) is a large enveloped virus belonging to the *Asfarviridae* family. Transmission can occur through direct contacts between animals (1,2), by aerosol (3) but also via soft ticks of the *Ornithodoros* genus (4–6). Due to its high resistance in the environment, ASFV can also be indirectly transmitted to pig or wild boar through the ingestion of infected pork or exposure to contaminated tools or clothes. Virulent strains induce hemorrhagic fever with mortality rates up to nearly 100% in domestic pigs and wild boars, while adult African wild suids appear asymptomatic (7–11). In 2007, the ASFV Georgia 2007/1 strain has emerged in Georgia (12) and has spread all over the European continent, entering the European Union in 2014, then China and South-Eastern Asia in 2018, and the Caribbean in 2021. This major panzootic of ASFV has unfolded, impacting almost every continent and leading to devastating economic and social consequences (13). ASFV harbors a double-stranded DNA (dsDNA) genome of unparalleled complexity, with genes that encode between 150 and 170 proteins, depending on the isolate. This variation is mainly due to the loss or gain of genes within the Multigene families (MGF) (14). Previous works suggest that genes within MGF360 and MGF505 are crucial in the modulation of the type I Interferon (IFN-α/β) signaling pathway (15–17). Moreover, attenuated ASFV strains, exhibiting the loss or truncation of various MGF360 and 505 genes, are more sensitive to IFN-α in comparison to their virulent counterparts (18–21).

Among the arsenal of host defense mechanisms, IFN-α/β emerge as sentinel molecules in the early antiviral response. Indeed, IFN-α/β orchestrate a multifaceted defense strategy by inducing an array of antiviral proteins, encoded by ISGs (Interferon stimulated genes), that inhibit viral replication and spread (22). The critical role of IFN-α/β for the establishment of an efficient antiviral response against ASFV has also been documented (23,24). Their synthesis are based on the recognition of specific molecular motifs known as PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) by either membrane receptors or cytoplasmic sensors, collectively termed PRRs (pattern recognition receptors). The PRRs involved in the detection of ASFV are only partially characterized to date, with cGAS (Cyclic GMP-AMP synthase) emerging as the most extensively studied among them (25–28). cGAS is a sensor capable of detecting dsDNA of over 40 base pairs. Upon binding to dsDNA, cGAS undergoes a conformational change, subsequently catalyzing the production of cGAMP (2',3'-cyclic GMP-AMP). This cGAMP molecule is then recognized by the transmembrane receptor STING (stimulator of interferon genes), which is embedded in the endoplasmic reticulum (ER) membrane. Binding of cGAMP to STING triggers its conformational change, resulting in oligomerization and translocation of STING from the ER to the Golgi apparatus. STING subsequently recruits TBK1 (TANK-binding kinase 1), which in turn activates both STING and IRF3 (Interferon regulatory factor 3). This activation leads to IRF3 dimerization and its nuclear translocation, enabling the transcription of *IFN-α/β* genes (29).

The significant enrichment of AT sequences in the genome of ASFV allows these regions to be also recognized by RNA Polymerase III and the transcripts produced are subsequently detectable by RIG-I (30). RIG-I (retinoic acid inducible gene I) is a cytosolic sensor that recognizes the free 5'-triphosphate ends of exogenous RNAs, which differ from cellular RNAs, usually capped. Uppon activation, RIG-I is taken over by MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein) via its CARD domains. This leads to dimerization of MAVS, which

92 then associates with TRAF3 (tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 3) and
93 TANK (TRAF family member-associated NF-kappa B activator). The latter can recruit the IKK
94 (Inhibitory protein κB kinase) and TBK1 kinases, inducing activation of the IRF3 and IRF7
95 (and NF-kB via IKK) transcription factors and, ultimately, the transcription of *IFN-α/β* genes.
96 Altogether, the RIG-I-TBK1 axis also appears to be activated in response to ASFV infection
97 (31).

98 As known for other viruses, the pathogenesis of ASFV involves a complex interplay
99 between viral factors and the host's intricate immune defenses, making it imperative to dissect
100 the molecular intricacies that govern this dynamic interaction. In our previous report (32), we
101 described and characterized the protective properties of the newly thermo-attenuated strain
102 ASFV-989 in pigs against an experimental infection of its parental virulent Georgia 2007/1
103 strain . The ASFV-989 strain is distinguished by the deletion of eight genes within the MGF360
104 and MGF505 regions (MGF360-12L, -13L, -14L, MGF505-1R, -2R, -3R, -4R and
105 G_ACD_00520). The molecular mechanisms underlying the attenuation of ASFV-989 remain
106 to be established. In this study, we first compared the induction of IFN-α/β pathway in response
107 to ASFV-989 and Georgia 2007/1 infections, employing both *in vivo* and *in vitro* models. We
108 used a medium-throughput transcriptomic approach to examine the expression of viral genes in
109 both strains, uncovering various patterns of gene expression. Subsequently, we explored
110 whether proteins encoded by the eight genes deleted in ASFV-989 play a role in the modulation
111 of the IFN-α/β signaling pathway. Using different strategies, we provide unprecedented
112 evidence for the crucial role of MGF505-4R in counteracting the induction of the IFN-α/β
113 response and suggest that this inhibition involves a key actor of the IFN signaling, TRAF3.
114 Interestingly, the conserved fragment (MGF505-4R$^{109\text{-}506}$) in ASFV-989 was shown to impair
115 MGF505-4R inhibitory function, potentially contributing to the attenuation of this new
116 potential vaccine candidate.

Materials and Methods

Viruses and cells

The virulent Georgia 2007/1 strain was isolated from domestic pigs in Georgia in 2007 (12). The attenuated ASFV-989 strain was obtained after thermo-attenuation of the Georgia 2007/1 as previously described (32). Both strains were grown in primary porcine alveolar macrophages (PAMs) cultures and used after three passages for the Georgia 2007/1 strain and one passage for the ASFV-989 strain for pig inoculation. For the *in vivo* study, viruses were diluted in RPMI medium to adjust the inoculation dose to 1 x 10^3 hemadsorbing dose 50% (HAD50) per pig for intramuscular (i.m.) inoculation. Inoculation doses for animal experiments were confirmed by back titration. PAMs were maintained in RPMI 1640 medium with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin at 37°C and 5% CO_2. HEK-293T and HeLa cells were maintained in DMEM medium containing 10% fetal bovine serum, 1% sodium pyruvate and 1% penicillin/streptomycin at 37°C and 5% CO_2.

Pig experiments

The blood samples were collected in a previous *in vivo* study (32) that had been approved by the ethics committee N°16 (authorization number 19-018#19585) and authorized by the French Ministry of Research (project n°2019030418445731). The SPF (specific pathogen free) pigs were inoculated using intramuscular (i.m.) route for both strains, with 6 pigs inoculated with Georgia 2007/1 and 17 pigs inoculated with ASFV-989. EDTA-blood and serum samples were collected at day 3 and 5 post inoculation for virological and IFN assays, respectively. Assessment of the ASFV viremia in infected pigs was performed with a pan-ASFV real-time PCR, as previously described (33), using DNA extracted from 100 µL of EDTA blood samples with the NucleoSpin® 8 Virus (Macherey-Nagel, Düren, Germany). The

ASFV genomic load was determined by means of a standard viral range (with a known HAD_{50} titer) diluted in negative blood. The results were expressed as equivalent (eq) HAD_{50}/mL of blood. The protein level of IFN-α was determined by a sandwich ELISA as previously described (34). Microtiter plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated overnight at room temperature (RT) with K9 IFN-α mAb at 7.5 µg/mL in PBS, then blocked for 1 hour (h) at 37 °C in PBS containing 5% BSA and 0.05% Tween 20. After three washes in PBS containing 0.05% Tween 20, plates containing samples and recombinant IFN-α protein (R&D Systems) standard range were incubated for 2h at RT. After five washes, biotinylated-F17 IFN-α mAb (0.5µg/ml) was added for 2h at RT. Following three washes, peroxidase-conjugated ExtrAvidin (Sigma–Aldrich) was then added for 1h at 37 °C. Peroxidase activity was measured using the tetramethilbenzidine substrate (Sigma–Aldrich) at 450 nm.

Infection experiments in PAMs

PAMs were plated in 24-well plates (1.2 x 10^6 cells per well). After 4h, cells were infected with either the Georgia 2007/1 or ASFV-989 strains with a multiplicity of infection (MOI) of 2. The inoculum was removed after one hour of incubation, and fresh complete medium was added after rinsing the plates with RPMI. Then the cell culture supernatants were collected at 0, 4, 24, 48 and 72h post infection (p.i.) and the plates containing the cells were frozen. The kinetics assays were run in triplicate for both strains. For each time point, the three supernatants collected were pooled (equal volume) for further virus titration performed by hemadsorption assay on PAMs as previously described (35).

Quantitative RT-PCR in PAMs

RNA were extracted directly from each well of infected PAMs (after harvesting the supernatant) with the NucleoSpin® RNA kit (REF 740955, Macherey-Nagel, Düren, Germany)

and gene expressions were determinated by reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) using the GoTaq® 1-Step RT-qPCR system (Promega ref A6020). For each reaction, 80 ng of RNA in 5 µl final volume were added to the mix with experimental or control primers, according to the manufacturer's instructions. For *IFN-α*, the sequences used were 5'GGCTCTGGTGCATGAGATGC3' and 5'CAGCCAGGATGGAGTCCTCC3', while 5'AGTTGCCTGGGACTCCTCAA3' and 5'CCTCAGGGACCTCAAAGTTCAT3' were used to quantify *IFN-β* expression, 5'ATGAAAATGGAGGTCATCTTCAAAAC3' and 5'AAGTTTAATGACCATGAGTCTTACC3' for P30 viral gene, 5'ACATGGCCTCCAAGGAGTAAGA3' and 5'GATCGAGTTGGGGCTGTGACT3' for *GAPDH*. The relative amount of IFN-α, IFN-β and P30 transcripts were normalized to the endogenous GAPDH reference and then calculated using the 2-ΔΔCt method (36).

cDNA pre-amplification and RT-qPCR on the BioMark HD real-time PCR platform

Extracted total RNA was converted to cDNA by reverse transcription of 20 ng of RNA with iSCRIPTtm Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad). Pre-amplification was performed with cDNA diluted 1:4 in RNAse free water using a Preamp Master Mix (Fluidigm, # 100-5581) in a T100 thermal cycler (BioRad). One µl of Preamp Master Mix was mixed with 0.5 µl of a 500 nM primer stock (Supplementary Table 1), 2.25 µl of H2O and 1.25 µl of the diluted cDNA. The pre-amplification thermal cycle conditions were: 95 °C for 2 minutes (min) followed by 14 cycles of 95 °C for 15 seconds and 60 °C for 4 min. Pre-amplified cDNA was subjected to an exonuclease treatment for 30 min (Exonuclease I, New England Biolabs, #MO293) and diluted 1:5 in TE (10 mM Tris-HCI, 1.0 mM EDTA).

Real-time quantitative PCR was performed in a 48x48 Dynamic Array Integrated Fluidic Circuits (Fluidigm), combining 48 samples with 48 primer sets for 2304 simultaneous qPCR reactions. The reaction mix for each of the 48 samples was as follows: three µl of 2x

SsoFast EvaGreen with Low Rox (Biorad, #172-5211), 0.3 µl of 20x DNA binding dye (Fluidigm, #100-7609) and 2.7 µl of pre-amplified cDNA. Specific primer mixes for each of the primer sets were: 3.5 µl of 2x assay loading reagent (Fluidigm), 2.8 µl of TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0), 0.35 µl of 100 µM forward primer and 0.35 µl of 100 µM reverse primer. 5 µl of the reaction mix and specific primer mix were dispensed into the appropriate inlets and loaded into the circuit. The thermal cycle conditions were 1 min at 95°C, followed by 30 cycles with denaturing for 5 secondes (sec) at 96°C and annealing/elongation for 20 sec at 60°C. The quantitative RT-PCR data were analyzed using the 2ΔΔCt method, where the amount of target, normalized to 3 endogenous reference genes and relative to an experimental control, is given by 2-ΔΔCt. The results are expressed as relative fold change (Fc) in comparison with the the Georgia 2007/1 at 4h p.i..

Plasmid DNA constructs

Open reading frame (ORF)-encoding sequences from the Georgia 2007/1 strain were amplified by PCR (Thermo Scientific™ Phusion™ Plus DNA Polymerase) from infected PAMs. Amplification was performed using ORF-specific primers flanked with the Gateway cloning sites 5′-GGGGACAACTTTGTACAAAAAAGTTGGC and 5′-GGGGACAACTTTGTACAAGAAAGTTGG. PCR products were cloned by *in vitro* recombination into pDONR207 (Gateway System; Invitrogen). ORF coding sequences were subsequently transferred by *in vitro* recombination from pDONR207 into different Gateway-compatible destination vectors (see below) according to the manufacturer's recommendations (LR cloning reaction; Invitrogen). In HEK-293T cells, GST tag and 3×FLAG tag fusions were achieved using pDEST27 (Invitrogen) and pCI-neo-3×FLAG vector, respectively (37). Expression vectors carrying genes for the constitutively active forms of RIG-I (NΔRIG-I) (38) or IRF3 (IRF3-5D) (39) and pCI-neo-3×FLAG vectors encoding MAVS or TBK1 were used to

217 stimulate the luciferase reporter gene downstream of an IFN-β-specific promoter sequence.
218 ORFs encoding components of our swine IFN-α/β response-dedicated library (MDA5, TRAF3,
219 IRF3, TBK1, PKR, NEMO, STING, TRIF, IKKε, IKKα, IRF7, MAVS, RIG-I, STAT1,
220 STAT2) and human TRAF3 were cloned in pTwist ENTR vectors by Twist Bioscience
221 company (service delivery).
222 All sequences are available in the literature and Genbank references are provided in
223 Table 1. ORFs from pTwist ENTR vectors were transferred into a Gateway®-compatible
224 destination vector following the same protocol as previously detailed above.
225
226 *Luciferase reporter gene assays*
227 HEK-293T were plated in 24-well plates (5×10^5 cells per well). One day later, HEK-
228 293T cells were co-transfected (JetPRIME; Polyplus) with IFN-β-pGL3 or pISRE-Luc plasmid
229 (0.3 µg/well; Stratagene) that contain the firefly luciferase reporter gene downstream of an IFN-
230 β-specific promoter sequence or the ISRE enhancer element upstream, respectively. Cells were
231 simultaneously co-transfected with the pRL-CMV reference plasmid (0.03 µg/well; Promega)
232 and the empty pCI-neo-3×FLAG expression vector (0.3 µg/well) or encoding proteins as
233 specified. When specified, cells were transfected with 0.1 µg/well of poly(dA:dT) (Invivogen)
234 or treated with 1 x 10^3 IU/ml of recombinant IFN-β (PBL Assay Science) 24h after transfection.
235 After 24h post-IFN-β-stimulation or 48h post-transfection, the cells were lysed (Passive lysis
236 buffer, Promega), and both firefly and *Renilla* luciferase activities in the lysate were determined
237 using the Bright-Glo and Renilla-Glo luciferase assay systems (Promega), respectively. The
238 reporter activity was calculated as the ratio of firefly luciferase activity to the reference *Renilla*
239 luciferase activity. All graphs show mean values and include error bars indicating the standard
240 deviations (SD).
241

242 *Nanoluciferase-2-hybrid (N2H) complementation assays*

243 The N2H protocol complementation assay was adapted from the report of Choi et al
244 (40). The NanoLuciferase fragments 1 (aa1-65aa) and 2 (aa66-aa171) were linked to the N-
245 terminal (pDEST-N2H-N1, -N2) extremity of the tested protein. HEK-293T were plated in
246 white 96-well plates (1×10^5 cells per well, Greiner Bio-One). HEK-293T cells were co-
247 transfected (JetPRIME; Polyplus) 24h later with pDEST-N2H-N1 encoding MGF505-4R and
248 pDEST-N2H-N2 alone or fused to the indicated swine cellular protein (0.1 µg of each
249 plasmid/well). After 24h, cells were lysed (Passive lysis buffer, Promega) and then incubated
250 with a solution of hikarazine-103 (Z103) provided by Dr Yves L. Janin (41,42). Enzymatic
251 activity of the NanoLuciferase, quantified as bioluminescence, was measured using a
252 GloMax® luminometer (Promega).

253

254 *GST pulldown experiments and Western blot analysis*

255 HEK-293T cells were plated in 6-well plates (2×10^6 cells) before being transfected,
256 24h later, (JetPRIME; Polyplus) with pDEST 27 (Invitrogen) expressing either GST alone (0.5
257 µg) or GST-MGF505-4R (0.5 µg) and with 0.5 µg of pCI-neo-3xFLAG vector encoding human
258 or swine TRAF3. After 48h, cells were collected in PBS and then lysed on ice in lysis buffer
259 (20 mM morpholinepropanesulfonic acid [MOPS]-KOH [pH 7.4], 120 mM KCl, 0.5% Igepal,
260 2 mM β-mercaptoethanol, supplemented with complete protease inhibitor cocktail [Roche]) for
261 20 min. Cell lysates were clarified by centrifugation at 14,000 × g for 30 min. For pulldown
262 analysis, protein extracts were incubated for 2h at 4°C on a spinning wheel with 30 µL of
263 glutathione-Sepharose beads (Amersham Biosciences). Beads were then washed 3 times for 5
264 min with ice-cold lysis buffer and on a spinning wheel, and proteins were recovered by boiling
265 in denaturing loading buffer (Invitrogen).

Purified complexes and protein extracts were boiled at 95°C for 5 min and resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 4 to 12% NuPAGE bis-Tris gels with Bolt morpholineethanesulfonic acid (MES) SDS running buffer and transferred to a nitrocellulose membrane under wet conditions (Invitrogen). GST- and 3×FLAG-tagged proteins were detected with a rabbit polyclonal anti-GST antibody (1:2,500; Sigma-Aldrich) and a mouse monoclonal horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-FLAG antibody (M2; 1:10,000; Sigma-Aldrich), respectively. Secondary anti-rabbit HRP-conjugated antibody was purchased from Invitrogen (1:5,000). Nitrocellulose membrane was then incubated with a peroxidase substrate (Clarity Western ECL substrate; Bio-Rad) and visualized with the ChemiDoc MP imaging system (Bio-Rad).

Confocal fluorescence microscopy assays

Plates (24-well; Ibidi, BioValley) were seeded with HeLa cells (9×10^4 cells per well). One day later, cells were transfected with 200 ng of pCherry-C1 encoding human TRAF3 and/or 800 ng of pEGFP-C1 expressing MG505-4R. After 24h, cells were fixed with a 4% paraformaldehyde (PFA) solution (Electron Microscopy Sciences) for 30 minutes, treated with PBS-glycine (0.1 M) for 5 minutes, and incubated with a solution containing Hoechst 33342 dye (1/10,000) (Life technologies). Preparations were visualized using a Leica DMI 8 confocal microscope (×40 magnification).

Statistical analyses

p-values are a result of two-tailed t-tests and R square (R) values are a result of linear regression tests. Both p-values and R square (R) values were calculated using Prism 7, version 7.0a. All graphs represent the mean, and include error bars of the standard deviation.

Results

Differential in vivo production of IFN-α by Georgia 2007/1 and ASFV-989

To evaluate the IFN-α/β response following infection by Georgia 2007/1 and ASFV-989, SPF pigs were i.m. infected with 1 x 10^3 HAD_{50} of each strain. This dose was lethal in all pigs infected with Georgia 2007/1 by day 5-6 p.i., whereas pigs infected with ASFV-989 strain displayed limited symptoms (32). As a measure of viral load, we determined the expression of the P72 viral gene by qPCR in the blood samples collected from pigs infected with Georgia 2007/1 and ASFV-989 strains (33). In these conditions, P72 expression in pigs infected with Georgia 2007/1 was significantly increased by more than 1.0 and 2.0 log 10 relative to those infected with ASFV-989 at days 3 (D3) and 5 p.i. (D5), respectively (Figure 1A). This suggests that the parental Georgia 2007/1 strain replicates more efficiently than its attenuated counterpart *in vivo*. In the sera from the same samples, we determined the protein level of IFN-α that is known to be highly expressed during ASFV infection (20). We did not see any significant increase in IFN-α at day 3. However, at day 5, the protein levels of IFN-α were significantly increased in pigs infected with Georgia 2007/1 compared to those infected with ASFV-989 (Figure 1B). Indeed, there is a statistically significant positive correlation between the P72 expression of Georgia 2007/1 at day 3 and the high level of IFN-α at day 5 (Figure 1C). In contrast, ASFV-989 infected pigs did not show any correlation between viral replication and IFN-α levels (Figure 1D). Taken together, these observations suggest that high ASFV replication results in a significant IFN response in pigs infected with the virulent Georgia 2007/1 strain, but not for its ASFV-989 attenuated counterpart.

Comparison of viral replication dynamics between Georgia 2007/1 and ASFV-989 in PAMs

316 To better characterize the differences between the Georgia 2007/1 and ASFV-989
317 strains, we followed the kinetics of viral replication in infected PAMs over three days using a
318 MOI of 2. The virus was harvested from the pool of supernatants and titrated at each kinetics
319 time. The results showed that similar virus titers (≅ 1 x 10^4 HAD_{50}/ml) were obtained at 0h p.i.,
320 confirming that PAMs were infected with the same amount of virus for both viral strains (Figure
321 2A). From 4 to 48h p.i., higher titers were obtained from cells infected with ASFV-989,
322 suggesting a faster viral replication for the attenuated strain compared to its parental strain.
323 However, both viral strains exhibited similar viral titers at 72h p.i. (between 6 x 10^7 and 8 x 10^7
324 HAD_{50}/ml). To confirm this result, total RNAs were extracted from infected PAMs and the
325 expression of the P30 viral gene was determined by RT-qPCR. We observed higher P30 mRNA
326 levels in cells infected with ASFV-989 in early time points, but similar levels at 72h, consistent
327 with the results of infectious viral titers (Figure 2B). As a complementary approach, we used a
328 medium-throuput qPCR approach based on microfluidics technology to measure
329 simultaneously the transcripts levels of 33 ASFV genes at 0, 4, 24, 48 and 72h p.i.. Viral gene
330 selection was guided by their absence in ASFV-989 and their known or hypothesized roles in
331 ASFV virulence. In contrast to Georgia 2007/1, no transcripts were detected in ASFV-989
332 infected cells for MGF360-12L, -13L, -14L, MGF505-2R, -3R, -4R and G_ACD_00520
333 (Figure 2C, group I), which is consistent with its known genetic deletion (32). Most
334 interestingly, the expression kinetics showed two other groups of viral genes. The expression
335 kinetics of group II genes were characterized by a sustained increase in transcripts level, while
336 those of group III seemed to reach a plateau starting from 48h p.i. and were exclusively
337 observed in the case of ASFV-989. In both cases, the expression level of genes from ASFV-
338 989 were higher than those from Georgia 2007/1 at all time points confirming the difference in
339 virus replication between these two ASFV strains in PAMs.

340 The same RNA samples were used to measure the expression levels of *IFN-α* and *IFN-*
341 *β*. As shown in Figure 2D and 2E, expression levels of *IFN-α* and *IFN-β* mRNAs in PAMs
342 infected with ASFV-989 at 72h p.i. were increased by more than 8 and 4-fold, respectively,
343 relative to those infected by Georgia 2007/1. Although we cannot exclude the possibility that
344 the increased expression levels of *IFN-α* and *-β* could be caused by the higher viral replication
345 of ASFV-989 in PAMs, we hypothesized that gene deletions in the ASFV-989 strain might also
346 explain its inability to efficiently control the IFN-α/β response *in vitro*.
347
348 *MGF505-4R inhibits the induction of the IFN-α/β signaling pathway*
349 Our previous genomic study has identified eight genes of the MGF360 and 505 as being
350 fully (MGF360-12L, -13L, -14L, MGF505-2R, -3R and G_ACD_00520) or partially
351 (MGF505-1R and -4R) deleted in the ASFV-989 attenuated strain compared to its parental
352 Georgia 2007/1 (Figure 3A). As a first approach to understand the possible correlation between
353 attenuation of ASFV-989 and its inability to control the IFN-α/β response in infected PAMs,
354 we individually tested the ability of these eight ASFV proteins to modulate the IFN-α/β
355 pathway using luciferase gene reporter assays. HEK-293T cells were transfected with an IFN-
356 β-luciferase reporter gene in the presence of MGF360-12L, -13L, -14L, MGF505-1R, -2R, -
357 3R, -4R or G_ACD_00520 and stimulated with poly(dA:dT), which mimics viral double-
358 stranded DNA. As shown in Figure 3B, significant inhibition of IFN-β promoter activity was
359 observed only in cells expressing the viral proteins MGF360-13L and MGF505-4R. However,
360 none of the ASFV proteins has shown any antagonism effect on ISRE-luciferase gene
361 expression (Figure 3C) in IFN-β-stimulated cells. Although we have no explanation for this
362 phenomenon, it should be noted that MGF505-2R positively impacted (2.5-fold increase,
363 relative to the positive control, empty vector + IFN-β). MGF360-13L has been recently
364 described to inhibit the IFN-α/β response (43). In contrast, the inhibition of the IFN-α/β

induction pathway by MGF505-4R had not yet been identified and suggest a new function for this viral protein that we have decided to investigate.

As MGF505-4R was partially deleted in the ASFV-989 strain, we tested separately the conserved (MGF505-4R$^{109-506}$) and deleted region (MGF505-4R$^{1-108}$) in ASFV-989 using our IFN-β-luciferase reporter assay (Figure 3D). Inhibition of IFN-α/β signaling was observed with MGF505-4R$^{1-108}$, but was only partial when compared with full-length MGF505-4R. Surprisingly, MGF505-4R$^{109-506}$ was unable to block the IFN-β promoter activity. This may account for the high productions of IFN-α and IFN-β in PAMs infected with the ASFV-989 strain, and for the attenuation phenotype of that strain.

MGF505-4R inhibits IFN-α/β signaling downstream of RIG-I and MAVS

To further decipher at which stage of the IFN-α/β signaling pathway MGF505-4R acts, we overexpressed NΔRIG-I (constitutively active N-terminal CARDs of RIG-I), MAVS, TBK1, or IRF3-5D (a constitutively active form of IRF3) to activate the IFN-β promoter. As shown in Figures 4A and 4B, MGF505-4R was able to efficiently reduce the stimulating effect of NΔRIG-I or MAVS. However, this inhibitory effect was lost after overexpression of TBK1, or IRF3-5D (Figures 4C and 4D) suggesting that MGF505-4R interferes at least with the signal transduction upstream of the TBK1/IKKε complex after activation of RIG-I and MAVS. Similar to what is seen with poly(dA:dT) stimulation, the MGF505-4R$^{1-108}$ region conserved its partial inhibitory effects on IFN-α/β signaling downstream of RIG-I and MAVS whereas MGF505-4R$^{109-506}$ was unable to do so (Figures 4A and 4B).

MGF505-4R interacts with TRAF3

To better understand how MGF505-4R inhibits the IFN-α/β induction pathway at the molecular level, we designed a NanoLuciferase two-hybrid (N2H) assay to screen a swine IFN-

α/β response-dedicated library, which contains a set of proteins involved in the induction of IFN-α/β signaling: MDA5, TRAF3, IRF3, TBK1, PKR, NEMO, STING, TRIF, IKKε, IKKα, IRF7, MAVS and RIG-I. Our N2H system is based on the reconstitution of the NanoLuciferase where MGF505-4R and cellular proteins were expressed in fusion with the N1 or N2 fragment of the NanoLuciferase, respectively. The heterodimer STAT1/STAT2 was used as positive control while the negative control corresponded to the condition where the N1-MGF505-4R construct was co-transfected with the N2 empty vector. As shown in Figure 5A, only the interaction between MGF505-4R and TRAF3 exhibited a luminescence score equivalent (8.5) to the positive control (7.2). To validate this interaction, 3×FLAG-tagged TRAF3 was co-expressed in HEK-293T with GST-tagged MGF-505-4R and purified with glutathion-sepharose beads. As shown in Figure 5B, MGF505-4R co-purified with both human and swine TRAF3. To evaluate how the interaction between MGF-505-4R and TRAF3 might influence their respective subcellular localizations, we conducted fluorescence microscopy experiments using HeLa cells. TRAF3 was co-expressed in fusion downstream of the red fluorescent protein Cherry with MGF505-4R tagged with GFP. When expressed independently, both TRAF3 and MGF505-4R exhibited a punctiform distribution within the cytoplasm. Upon co-transfection, Cherry-tagged TRAF3 colocalized with GFP-tagged MGF505-4R in the cytoplasm, displaying similar distribution patterns (Figure 5C). TRAF3 plays a central role in regulating the IFN-α/β signaling, notably by acting as a platform for mitochondrial antiviral signaling (MAVS), NF-κB essential modulator (NEMO) and TANK-binding kinase/the IκB kinaseε (TBK1/IKKε) kinase complex. Therefore, binding to TRAF3 represents a potential molecular mechanism underlying the inhibition of the IFN-α/β pathway by MGF505-4R (Figure 6).

412 **Discussion**

413

414 ASFV clinical manifestations are highly variable, ranging from asymptomatic infections
415 to lethal hemorrhagic fevers. This variability is due to several factors related both to the infected
416 host and the viral strains. Highly virulent ASFV strains lead to severe disease, often
417 accompanied by mortality rates nearing 100%. On the other hand, attenuated ASFV isolates
418 induce only mild disease with few, mostly unspecific, symptoms. These diverse clinical
419 outcomes may arise from variations in the immune responses to ASFV, themselves relying on
420 the activation of the IFN-α/β signaling pathway (26). In contrast to the Georgia 2007/1 virulent
421 strain, we have demonstrated *in vitro* that macrophages infected with the ASFV-989 attenuated
422 strain induced elevated levels of IFN-α and IFN-β transcripts at 72h p.i.. While increases in
423 *IFN-α/β* gene expression occur at a late stage, our findings are reminiscent to what has been
424 observed by others, showing the same significant difference in IFN-α/β production between
425 avirulent/low virulent and high virulent ASFV strains (15,21,28,44,45). This delayed induction
426 of *IFN-α* and *IFN-β* gene expression could be attributed to the variation in the numbers and
427 identities of MGF360 and 505 genes that are absent in different attenuated ASFV strains.
428 Moreover, the same gene deletions might contribute to potential variations in the kinetics of
429 viral replication and the IFN-α/β response, depending on the strains and/or genotypes.
430 Intriguingly, pigs infected with Georgia 2007/1 showed higher IFN-α levels than those infected
431 by ASFV-989, in contrast to our *in vitro* observations. One possible explanation could be that
432 the high levels of IFN-α at day 5 clearly coincided with its important viral replication at day 3
433 (Figure 1C), as previously suggested by Golding *et al* (20). This may also reflect the potential
434 differences between the types of macrophages that ASFV infects *in vivo* and the PAM *in vitro*
435 model. In response to ASFV infection *in vivo*, IFN-α may also be alternatively secreted by other

436 mononuclear phagocytes of the myeloid lineage, such as monocytes and dendritic cells (46–
437 48).

438 The differential impact of these two ASFV strains on IFN-α/β production led us to
439 subsequently investigate whether proteins encoded by the eight genes deleted in ASFV-989
440 play a role in modulating the IFN-α/β signaling pathway. While the expression of some viral
441 genes, such as MGF360-12L, -14L, MGF505-1R, -2R, -3R and G_ACD_00520 seems to have
442 no effect on the induction of IFN-α/β signaling downstream of poly(dA:dT) stimulation,
443 MGF360-13L and MGF505-4R significantly inhibit this pathway. MGF360-13L has recently
444 been described as an inhibitor of the cGAS-STING-mediated IFN-α/β pathway (43).
445 Nevertheless, the absence of cGAS and STING in HEK-293T (49) implies that the inhibition
446 we observed for MGF360-13L is independent of the cGAS-STING axis. Intriguingly, other
447 studies have shown that MGF360-14L and MGF360-12L can also block IFN-α/β production
448 by promoting IRF3 degradation (50) and modulating the NF-κB signaling pathway (51,52),
449 respectively. Moreover, the deletion of MGF360-12L from Georgia 2007/1 virus from which
450 the K145R viral gene was also deleted led to a higher level of IFN-I production *in vitro*
451 compared to the parental strain (53). However, these findings do not necessarily contradict our
452 current data as the experimental conditions were not identical. Unexpectedly, MGF505-4R was
453 found to inhibit the IFN-α/β induction pathway, revealing a novel function for this viral protein
454 in immune evasion.

455 Next, we identified by NanoLuciferase two-hybrid assays and validated by co-affinity
456 purification experiments the interaction between MGF505-4R and TRAF3. The latter plays a
457 crucial role in the regulation of the IFN-α/β induction pathway mediated by Toll-like (TLR)
458 receptors and RIG-I-like receptors (RLR) families (54,55). Upon activation of RIG-I, TRAF3
459 is recruited by MAVS, then promotes the ubiquitination of K63, providing a platform for NF-
460 kappa-B essential modulator (NEMO) and TBK1/IKKε complex to activate IRF3 and initiates

IFN-α/β expression (56–59). As demonstrated in a recent study by Ran *et al* (31), the AT-rich DNA genome of ASFV can trigger IFN-α/β signaling through the RNA Polymerase III-RIG-I pathway. Moreover, ASFV-I267L was reported in this article to disrupt this pathway by preventing the activation of RIG-I. The interaction of MGF505-4R with TRAF3 is thus consistent with the fact that MGF505-4R is able to inhibit the IFN-α/β induction downstream of RIG-I and MAVS but not TBK1 and IRF3. Therefore, this interaction represents another mechanism developed by ASFV to interfere with the RNA Polymerase III-RIG-I axis. As TRAF3 is essential for virus-induced activation of the IFN-α/β system, some viruses have evolved to gain multiples strategies in order to control the IFN-α/β pathway by directly targeting TRAF3. The M proteins of Severe acute respiratory syndrome coronavirus 1 (SARS-CoV-1) and Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) as well as the X protein from hepatitis B virus and VP3 from *Avibirnavirus* have been reported to bind TRAF3, disrupting the TRAF3–TBK1 association and subsequently suppressing IFN-α/β production (60–64). Influenza A NS1 protein was found to interact with TRAF3 preventing its activation and association with MAVS (65,66). Other viruses such as Epstein-Barr virus or human papillomavirus have also been shown to target TRAF3 but the possible contribution to the IFN-α/β immune evasion remains to be established (67,68). In the future, it will be essential to elucidate the molecular mechanisms through which the interaction of MGF505-4R with TRAF3 could alter the MAVS-TRAF3-TBK1 complex.

The cGAS-STING-mediated IFN-α/β signaling is currently the most studied pathway for understanding the detection and immune evasion of ASFV. However, some studies have indicated a potential role of TRAF3 in the cGAS-STING-mediated IFN-α/β signaling pathway, as evidenced by its interaction with STING (69–71). A noteworthy study examining the ability of human enterovirus A71 to control this pathway proposed the significance of TRAF3 in facilitating the STING-TBK1 interaction and subsequent activation of TBK1 via

phosphorylation (70). Consequently, further investigations are warranted to determine whether MGF505-4R can potentially counteract cGAS-STING-mediated IFN-α/β signaling through its interaction with TRAF3.

Interestingly, our findings indicate that MGF505-4R$^{1-108}$ retained the ability to only partially inhibit IFN-α/β induction in comparison to the full-length MGF505-4R protein. However, the conserved fragment (MGF505-4R$^{109-506}$) in the ASFV-989 attenuated strain was observed to compromise the inhibitory function of MGF505-4R. In addition to other deletions within the MGF360 and 505 regions, MGF505-4R has also been partially deleted in the genome of the ASFV isolate Benin 97/1, from which higher levels of IFN-β mRNA were observed compared to its parental virulent strain (21). The identification of MGF505-4R as a novel IFN antagonist, coupled with the loss-of-function phenotype of MGF505-4R$^{109-506}$, provide molecular basis underlying the attenuation of ASFV-989.

While an increasing number of reports have illustrated how ASFV has evolved various mechanisms to counteract IFN-α/β signaling (16,17,25,27,72–74), this marks the first description of ASFV targeting TRAF3. Altogether, this emphasizes the evolution of ASFV to encode numerous viral proteins with redundant functions in immune evasion. Collectively, deciphering molecular virus-host protein interactions and mechanisms underlying the control of the innate immune response by ASFV will constitute an important theoretical basis to reveal new factors of virulence and develop future rationally designed ASFV vaccines (75).

Funding

This work was supported by research grants from European Commission, Horizon 2020 Framework Program European Union ERA-NET project ASFVInt, grant agreement 862605, and made possible by co-funding, under the grant codes: ANR-21-ICRD-0001-01 for ANSES and ANR-21-ICRD-0001-02 for INRAE. J.D. was supported by a Ph.D. fellowship from ANSES and INRAE.

512 **Acknowledgements**

513

514 We would like to thank Yves Jacob, Yves Janin and Linda Dixon for kindly providing
515 us the pDESTN2H-N1 and -N2 vectors, the Z103 substrate and the Georgia 2007/1 strain,
516 respectively.

517

518 **References**

519

520 1. Guinat C, Gogin A, Blome S, Keil G, Pollin R, Pfeiffer DU, et al. Transmission routes
521 of African swine fever virus to domestic pigs: current knowledge and future research
522 directions. Vet Rec. 2016;178(11):262-7.
523 2. Davies K, Goatley LC, Guinat C, Netherton CL, Gubbins S, Dixon LK, et al. Survival
524 of African Swine Fever Virus in Excretions from Pigs Experimentally Infected with the
525 Georgia 2007/1 Isolate. Transbound Emerg Dis. avr 2017;64(2):425-31.
526 3. Olesen AS, Lohse L, Boklund A, Halasa T, Gallardo C, Pejsak Z, et al. Transmission
527 of African swine fever virus from infected pigs by direct contact and aerosol routes. Vet
528 Microbiol. nov 2017;211:92-102.
529 4. Boinas FS, Wilson AJ, Hutchings GH, Martins C, Dixon LJ. The Persistence of
530 African Swine Fever Virus in Field-Infected Ornithodoros erraticus during the ASF Endemic
531 Period in Portugal. PLOS ONE. 31 mai 2011;6(5):e20383.
532 5. Diaz AV, Netherton CL, Dixon LK, Wilson AJ. African Swine Fever Virus Strain
533 Georgia 2007/1 in Ornithodoros erraticus Ticks. Emerg Infect Dis. juin 2012;18(6):1026-8.
534 6. Pereira De Oliveira R, Hutet E, Lancelot R, Paboeuf F, Duhayon M, Boinas F, et al.
535 Differential vector competence of Ornithodoros soft ticks for African swine fever virus: What
536 if it involves more than just crossing organic barriers in ticks? Parasit Vectors. 9 déc
537 2020;13:618.
538 7. Anderson EC, Hutchings GH, Mukarati N, Wilkinson PJ. African swine fever virus
539 infection of the bushpig (Potamochoerus porcus) and its significance in the epidemiology of
540 the disease. Vet Microbiol. 30 avr 1998;62(1):1-15.
541 8. Oura CAL, Powell PP, Anderson E, Parkhouse RME. The pathogenesis of African
542 swine fever in the resistant bushpig. J Gen Virol. 1998;79(6):1439-43.
543 9. Thomson GR (Gavin). The epidemiology of African swine fever: the role of free-
544 living hosts in Africa. 1985 [cité 20 nov 2023]; Disponible sur:
545 https://repository.up.ac.za/handle/2263/44383
546 10. Thomson GR (Gavin), Gainaru MD, Van Dellen AF. Experimental infection of
547 warthog (Phacochoerus aethiopicus) with African swine fever virus. Infection experimental
548 du Phacochere (Phacochoerus Aethiopicus) avec le virus de la fievre porcine Africaine
549 [Internet]. 1980 [cité 20 nov 2023]; Disponible sur:
550 https://repository.up.ac.za/handle/2263/53873
551 11. Penrith ML, Bastos AD, Etter EMC, Beltrán-Alcrudo D. Epidemiology of African
552 swine fever in Africa today: Sylvatic cycle versus socio-economic imperatives. Transbound
553 Emerg Dis. 2019;66(2):672-86.
554 12. Rowlands RJ, Michaud V, Heath L, Hutchings G, Oura C, Vosloo W, et al. African
555 Swine Fever Virus Isolate, Georgia, 2007. Emerg Infect Dis. déc 2008;14(12):1870-4.
556 13. Gavier-Widén D, Ståhl K, Dixon L. No hasty solutions for African swine fever.
557 Science. 7 févr 2020;367(6478):622-4.
558 14. Chapman DAG, Tcherepanov V, Upton C, Dixon LK. Comparison of the genome
559 sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates. J Gen Virol.
560 2008;89(2):397-408.
561 15. Afonso CL, Piccone ME, Zaffuto KM, Neilan J, Kutish GF, Lu Z, et al. African Swine
562 Fever Virus Multigene Family 360 and 530 Genes Affect Host Interferon Response. J Virol.
563 févr 2004;78(4):1858-64.
564 16. Zheng X, Nie S, Feng WH. Regulation of antiviral immune response by African swine
565 fever virus (ASFV). Virol Sin. 9 mars 2022;37(2):157-67.

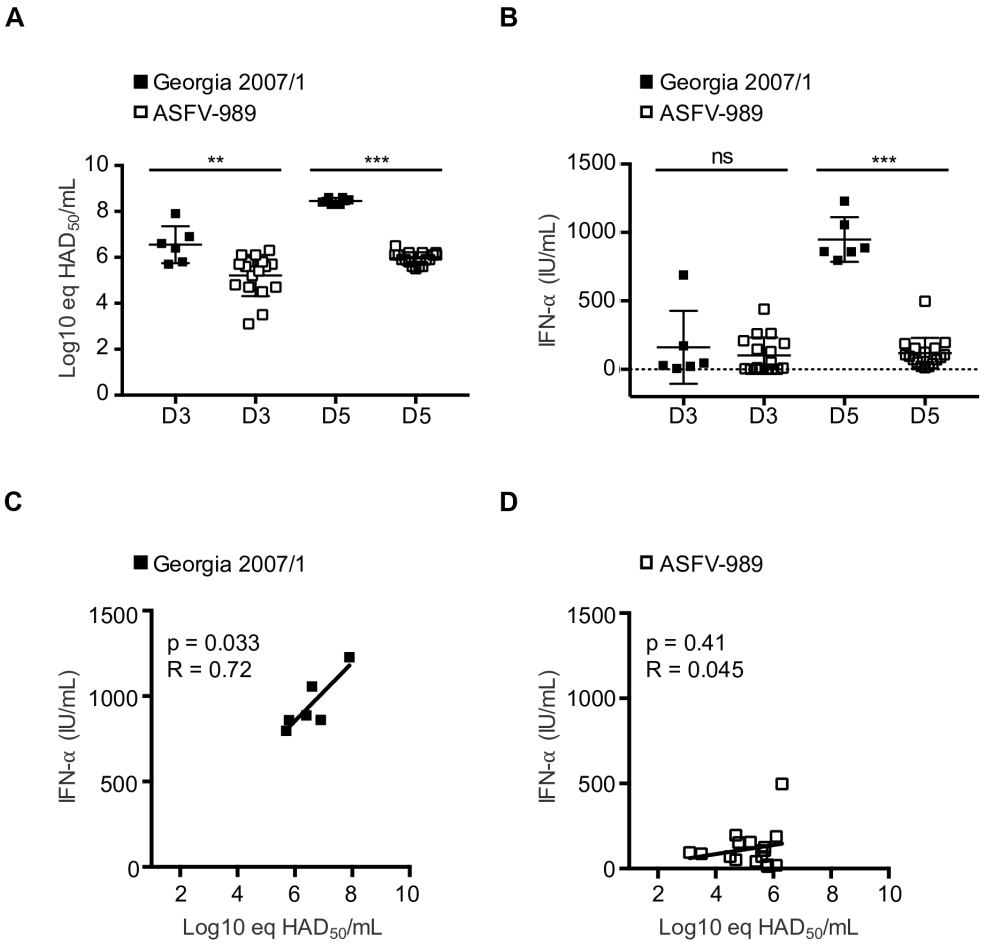
17. Yu L, Zhu Z, Deng J, Tian K, Li X. Antagonisms of ASFV towards Host Defense Mechanisms: Knowledge Gaps in Viral Immune Evasion and Pathogenesis. Viruses [Internet]. févr 2023 [cité 28 nov 2023];15(2). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9963191/
18. Portugal R, Coelho J, Höper D, Little NS, Smithson C, Upton C, et al. Related strains of African swine fever virus with different virulence: genome comparison and analysis. J Gen Virol. 2015;96(2):408-19.
19. Franzoni G, Razzuoli E, Dei Giudici S, Carta T, Galleri G, Zinellu S, et al. Comparison of Macrophage Responses to African Swine Fever Viruses Reveals that the NH/P68 Strain is Associated with Enhanced Sensitivity to Type I IFN and Cytokine Responses from Classically Activated Macrophages. Pathogens. 12 mars 2020;9(3):209.
20. Golding JP, Goatley L, Goodbourn S, Dixon LK, Taylor G, Netherton CL. Sensitivity of African swine fever virus to type I interferon is linked to genes within multigene families 360 and 505. Virology. juin 2016;493:154-61.
21. Reis AL, Abrams CC, Goatley LC, Netherton C, Chapman DG, Sanchez-Cordon P, et al. Deletion of African swine fever virus interferon inhibitors from the genome of a virulent isolate reduces virulence in domestic pigs and induces a protective response. Vaccine. 7 sept 2016;34(39):4698-705.
22. Randall RE, Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. J Gen Virol. 2008;89(1):1-47.
23. Fan W, Jiao P, Zhang H, Chen T, Zhou X, Qi Y, et al. Inhibition of African Swine Fever Virus Replication by Porcine Type I and Type II Interferons. Front Microbiol [Internet]. 2020 [cité 15 déc 2023];11. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.01203
24. Jiao P, Wang S, Fan W, Zhang H, Yin H, Shang Y, et al. Recombinant porcine interferon cocktail delays the onset and lessens the severity of African swine fever. Antiviral Res. 1 juill 2023;215:105644.
25. He WR, Yuan J, Ma YH, Zhao CY, Yang ZY, Zhang Y, et al. Modulation of Host Antiviral Innate Immunity by African Swine Fever Virus: A Review. Anim Open Access J MDPI [Internet]. nov 2022 [cité 21 nov 2023];12(21). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9653632/
26. Ayanwale A, Trapp S, Guabiraba R, Caballero I, Roesch F. New Insights in the Interplay Between African Swine Fever Virus and Innate Immunity and Its Impact on Viral Pathogenicity. Front Microbiol [Internet]. 2022 [cité 21 nov 2023];13. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9298521/
27. Afe AE, Shen ZJ, Guo X, Zhou R, Li K. African Swine Fever Virus Interaction with Host Innate Immune Factors. Viruses. juin 2023;15(6):1220.
28. García-Belmonte R, Pérez-Núñez D, Pittau M, Richt JA, Revilla Y. African Swine Fever Virus Armenia/07 Virulent Strain Controls Interferon Beta Production through the cGAS-STING Pathway. J Virol [Internet]. 6 juin 2019 [cité 21 nov 2023];93(12). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6613762/
29. Hopfner KP, Hornung V. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS–STING signalling. Nat Rev Mol Cell Biol. sept 2020;21(9):501-21.
30. Chiu YH, MacMillan JB, Chen ZJ. RNA Polymerase III Detects Cytosolic DNA and Induces Type I Interferons through the RIG-I Pathway. Cell. 7 août 2009;138(3):576-91.
31. Ran Y, Li D, Xiong MG, Liu HN, Feng T, Shi ZW, et al. African swine fever virus I267L acts as an important virulence factor by inhibiting RNA polymerase III-RIG-I-mediated innate immunity. PLoS Pathog. 28 janv 2022;18(1):e1010270.
32. Bourry O, Hutet E, Le Dimna M, Lucas P, Blanchard Y, Chastagner A, et al. Oronasal or Intramuscular Immunization with a Thermo-Attenuated ASFV Strain Provides Full

616 Clinical Protection against Georgia 2007/1 Challenge. Viruses. 13 déc 2022;14(12):2777.
617 33. Tignon M, Gallardo C, Iscaro C, Hutet E, Van der Stede Y, Kolbasov D, et al.
618 Development and inter-laboratory validation study of an improved new real-time PCR assay
619 with internal control for detection and laboratory diagnosis of African swine fever virus. J
620 Virol Methods. 1 déc 2011;178(1):161-70.
621 34. Jamin A, Gorin S, Le Potier MF, Kuntz-Simon G. Characterization of conventional
622 and plasmacytoid dendritic cells in swine secondary lymphoid organs and blood. Vet
623 Immunol Immunopathol. 15 déc 2006;114(3):224-37.
624 35. Carrascosa AL, Bustos MJ, de Leon P. Methods for Growing and Titrating African
625 Swine Fever Virus: Field and Laboratory Samples. Curr Protoc Cell Biol. 2011;53(1):26.14.1-
626 26.14.25.
627 36. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-
628 Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. Methods. 1 déc 2001;25(4):402-8.
629 37. Mendoza JA, Jacob Y, Cassonnet P, Favre M. Human Papillomavirus Type 5 E6
630 Oncoprotein Represses the Transforming Growth Factor β Signaling Pathway by Binding to
631 SMAD3. J Virol. déc 2006;80(24):12420-4.
632 38. Vitour D, Dabo S, Ahmadi Pour M, Vilasco M, Vidalain PO, Jacob Y, et al. Polo-like
633 Kinase 1 (PLK1) Regulates Interferon (IFN) Induction by MAVS. J Biol Chem. 14 août
634 2009;284(33):21797-809.
635 39. Heylbroeck C, Balachandran S, Servant MJ, DeLuca C, Barber GN, Lin R, et al. The
636 IRF-3 Transcription Factor Mediates Sendai Virus-Induced Apoptosis. J Virol. 15 avr
637 2000;74(8):3781-92.
638 40. Choi SG, Olivet J, Cassonnet P, Vidalain PO, Luck K, Lambourne L, et al.
639 Maximizing binary interactome mapping with a minimal number of assays. Nat Commun. 29
640 août 2019;10:3907.
641 41. Gram-scale synthesis of luciferins derived from coelenterazine and original insights
642 into their bioluminescence properties. Org Biomol Chem. 21 avr 2019;17(15):3709-13.
643 42. Coutant EP, Gagnot G, Hervin V, Baatallah R, Goyard S, Jacob Y, et al.
644 Bioluminescence Profiling of NanoKAZ/NanoLuc Luciferase Using a Chemical Library of
645 Coelenterazine Analogues. Chem – Eur J. 2020;26(4):948-58.
646 43. Luo J, Cheng M, Duan Y, Xing X, Lu M, Sun Y, et al. African swine fever virus
647 encoded protein MGF360-13L inhibits cGAS-STING-mediated IFN-I signaling pathway.
648 Gene. 20 juill 2023;874:147490.
649 44. Gil S, Sepúlveda N, Albina E, Leitão A, Martins C. The low-virulent African swine
650 fever virus (ASFV/NH/P68) induces enhanced expression and production of relevant
651 regulatory cytokines (IFNα, TNFα and IL12p40) on porcine macrophages in comparison to
652 the highly virulent ASFV/L60. Arch Virol. oct 2008;153(10):1845-54.
653 45. Zhang F, Hopwood P, Abrams CC, Downing A, Murray F, Talbot R, et al.
654 Macrophage Transcriptional Responses following In Vitro Infection with a Highly Virulent
655 African Swine Fever Virus Isolate. J Virol. nov 2006;80(21):10514-21.
656 46. Franzoni G, Graham SP, Dei Giudici S, Oggiano A. Porcine Dendritic Cells and
657 Viruses: An Update. Viruses. 16 mai 2019;11(5):445.
658 47. Franzoni G, Dei Giudici S, Oggiano A. Infection, modulation and responses of
659 antigen-presenting cells to African swine fever viruses. Virus Res. 15 oct 2018;258:73-80.
660 48. Franzoni G, Graham SP, Sanna G, Angioi P, Fiori MS, Anfossi A, et al. Interaction of
661 porcine monocyte-derived dendritic cells with African swine fever viruses of diverse
662 virulence. Vet Microbiol. 1 mars 2018;216:190-7.
663 49. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic
664 DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway. Science. 15 févr
665 2013;339(6121):786-91.

50. Wang Y, Cui S, Xin T, Wang X, Yu H, Chen S, et al. African Swine Fever Virus MGF360-14L Negatively Regulates Type I Interferon Signaling by Targeting IRF3. Front Cell Infect Microbiol. 12 janv 2022;11:818969.
51. Chen Q, Wang XX, Jiang SW, Gao XT, Huang SY, Liang Y, et al. MGF360-12L of ASFV-SY18 is an immune-evasion protein that inhibits host type I IFN, NF-κB, and JAK/STAT pathways. Pol J Vet Sci. mars 2023;26(1):119-30.
52. Zhuo Y, Guo Z, Ba T, Zhang C, He L, Zeng C, et al. African Swine Fever Virus MGF360-12L Inhibits Type I Interferon Production by Blocking the Interaction of Importin α and NF-κB Signaling Pathway. Virol Sin. 3 nov 2020;36(2):176-86.
53. Rathakrishnan A, Connell S, Petrovan V, Moffat K, Goatley LC, Jabbar T, et al. Differential Effect of Deleting Members of African Swine Fever Virus Multigene Families 360 and 505 from the Genotype II Georgia 2007/1 Isolate on Virus Replication, Virulence, and Induction of Protection. J Virol. 96(6):e01899-21.
54. Lin M, Ji X, Lv Y, Cui D, Xie J. The Roles of TRAF3 in Immune Responses. Dis Markers. 16 févr 2023;2023:e7787803.
55. Häcker H, Tseng PH, Karin M. Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator. Nat Rev Immunol. juill 2011;11(7):457-68.
56. Yoneyama M, Onomoto K, Jogi M, Akaboshi T, Fujita T. Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. Curr Opin Immunol. 1 févr 2015;32:48-53.
57. Fitzgerald ME, Rawling DC, Vela A, Pyle AM. An evolving arsenal: viral RNA detection by RIG-I-like receptors. Curr Opin Microbiol. 1 août 2014;20:76-81.
58. Errett JS, Gale M. Emerging complexity and new roles for the RIG-I-like receptors in innate antiviral immunity. Virol Sin. 1 juin 2015;30(3):163-73.
59. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. Nat Immunol. juill 2004;5(7):730-7.
60. Siu KL, Chan CP, Kok KH, Chiu-Yat Woo P, Jin DY. Suppression of innate antiviral response by severe acute respiratory syndrome coronavirus M protein is mediated through the first transmembrane domain. Cell Mol Immunol. mars 2014;11(2):141-9.
61. Lui PY, Wong LYR, Fung CL, Siu KL, Yeung ML, Yuen KS, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus M protein suppresses type I interferon expression through the inhibition of TBK1-dependent phosphorylation of IRF3. Emerg Microbes Infect. avr 2016;5(4):e39.
62. Siu KL, Kok KH, Ng MHJ, Poon VKM, Yuen KY, Zheng BJ, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus M Protein Inhibits Type I Interferon Production by Impeding the Formation of TRAF3·TANK·TBK1/IKKε Complex*. J Biol Chem. 12 juin 2009;284(24):16202-9.
63. Jiang J, Tang H. Mechanism of inhibiting type I interferon induction by hepatitis B virus X protein. Protein Cell. déc 2010;1(12):1106-17.
64. Deng T, Hu B, Wang X, Lin L, Zhou J, Xu Y, et al. Inhibition of Antiviral Innate Immunity by Avibirnavirus VP3 via Blocking TBK1-TRAF3 Complex Formation and IRF3 Activation. mSystems. 11 mai 2021;6(3):e00016-21.
65. Qian W, Wei X, Guo K, Li Y, Lin X, Zou Z, et al. The C-Terminal Effector Domain of Non-Structural Protein 1 of Influenza A Virus Blocks IFN-β Production by Targeting TNF Receptor-Associated Factor 3. Front Immunol. 3 juill 2017;8:779.
66. Lin CY, Shih MC, Chang HC, Lin KJ, Chen LF, Huang SW, et al. Influenza a virus NS1 resembles a TRAF3-interacting motif to target the RNA sensing-TRAF3-type I IFN axis and impair antiviral innate immunity. J Biomed Sci. 5 oct 2021;28:66.
67. Calderwood MA, Venkatesan K, Xing L, Chase MR, Vazquez A, Holthaus AM, et al. Epstein–Barr virus and virus human protein interaction maps. Proc Natl Acad Sci. mai

716 2007;104(18):7606-11.
717 68. Poirson J, Biquand E, Straub ML, Cassonnet P, Nominé Y, Jones L, et al. Mapping the
718 interactome of HPV E6 and E7 oncoproteins with the ubiquitin-proteasome system. FEBS J.
719 2017;284(19):3171-201.
720 69. Zhong B, Yang Y, Li S, Wang YY, Li Y, Diao F, et al. The Adaptor Protein MITA
721 Links Virus-Sensing Receptors to IRF3 Transcription Factor Activation. Immunity. 17 oct
722 2008;29(4):538-50.
723 70. Zheng W, Zhou Z, Rui Y, Ye R, Xia F, Guo F, et al. TRAF3 activates STING-
724 mediated suppression of EV-A71 and target of viral evasion. Signal Transduct Target Ther.
725 24 févr 2023;8:79.
726 71. Chen X, Yang X, Zheng Y, Yang Y, Xing Y, Chen Z. SARS coronavirus papain-like
727 protease inhibits the type I interferon signaling pathway through interaction with the STING-
728 TRAF3-TBK1 complex. Protein Cell. mai 2014;5(5):369-81.
729 72. Dixon LK, Islam M, Nash R, Reis AL. African swine fever virus evasion of host
730 defences. Virus Res. 1 juin 2019;266:25-33.
731 73. Dupré J, Le Potier MF, Vitour D, Caignard G. Modulation of the innate immune
732 response by African swine fever virus. Virologie. 1 sept 2022;26(5):387-400.
733 74. Riera E, Pérez-Núñez D, García-Belmonte R, Miorin L, García-Sastre A, Revilla Y.
734 African Swine Fever Virus Induces STAT1 and STAT2 Degradation to Counteract IFN-I
735 Signaling. Front Microbiol [Internet]. 2021 [cité 18 déc 2023];12. Disponible sur:
736 https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.722952
737 75. Dolata KM, Pei G, Netherton CL, Karger A. Functional Landscape of African Swine
738 Fever Virus–Host and Virus–Virus Protein Interactions. Viruses. 27 juill 2023;15(8):1634.
739

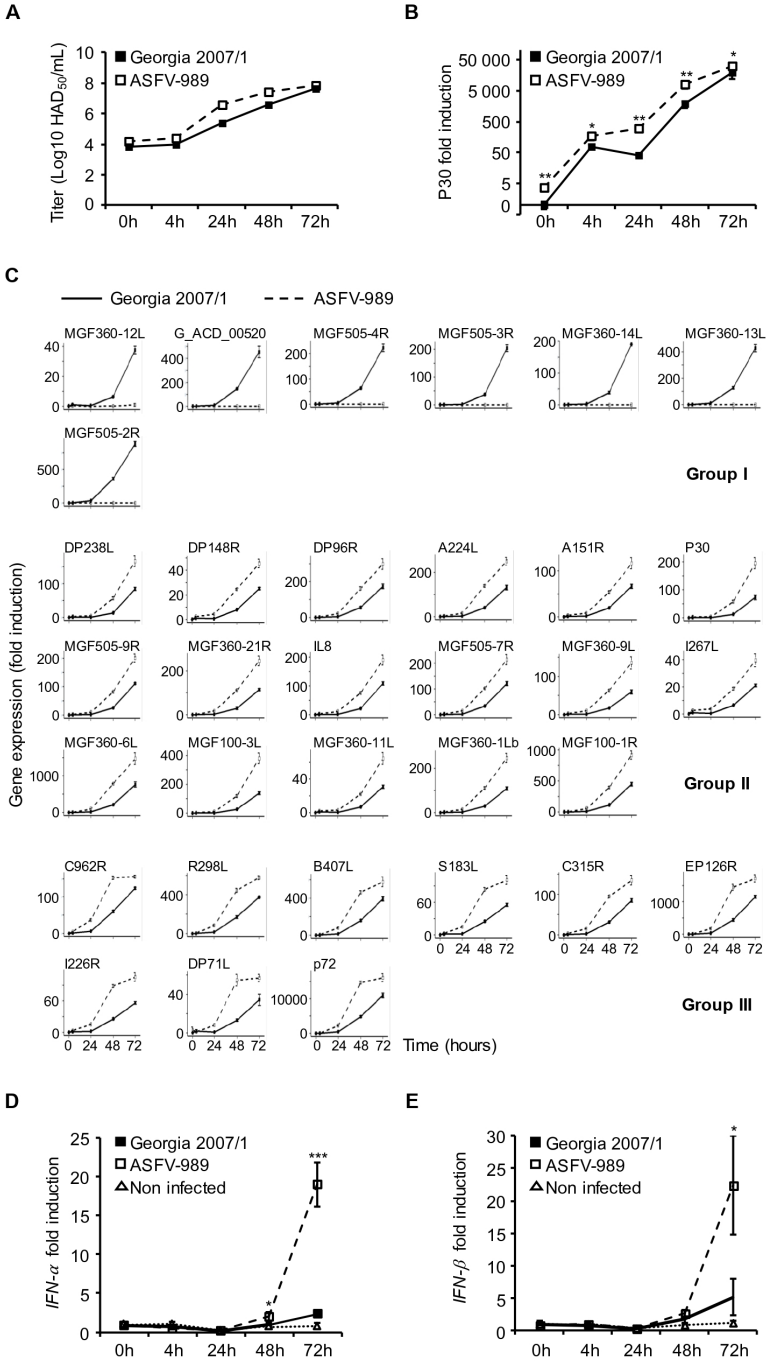
740 **Figure**



741

742 **Figure 1. Assessment of IFN-α levels in pigs infected with Georgia 2007/1 and ASFV-989.**
743 SPF pigs were i.m. infected with 1 x 10^3 HAD_{50} of the Georgia 2007/1 (black squares, n = 6)
744 and ASFV-989 strains (white squares, n = 17). (A) At the indicated days post-infection (D3 and
745 D5), blood samples were collected and ASFV viremia (Log10 eq HAD50/mL) was measured
746 using a qPCR test (33) that detect both Georgia 2007/1 and ASFV-989 strains. (B) The protein
747 levels of IFN-α were quantified in the sera by ELISA and expressed as units/ml (IU/ml).
748 Correlations were determined by comparing P72 levels at D3 and the IFN-α levels at day D5
749 (C, Georgia 2007/1 and D, ASFV-989 . *, p-value (p) < 0.05, **, p < 0.005, ***, p < 0.0005
750 and "ns" for non significant.
751

752



753

754 **Figure 2. The attenuated ASFV-989 strain showed increased replication and elevated**
755 **IFN-α and IFN-β in porcine alveolar macrophages.** PAMs were infected with Georgia
756 2007/1 or ASFV-989 at a MOI of 2. Black and white squares correspond to Georgia 2007/1 and
757 ASFV-989, respectively, while white triangles correspond to non-infected PAMs (D, E). (A)

At the indicated times, the supernatants were collected and used to evaluate the virus titers. (B) The expression level of the P30 viral gene was measured by RT-qPCR and normalized to that of *GAPDH*. Data are presented as a fold increase relative to PAMs infected with Georgia 2007/1 at 0h p.i.. (C) Expressions levels of 33 viral genes were measured and shown as a fold increase relative to the Georgia 2007/1 at 4h p.i. The expression levels of *IFN-α* (D) and *IFN-β* (E) were evaluated by RT-qPCR. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.005$ and ***, $p < 0.0005$. Data are representative of three independent experiments.

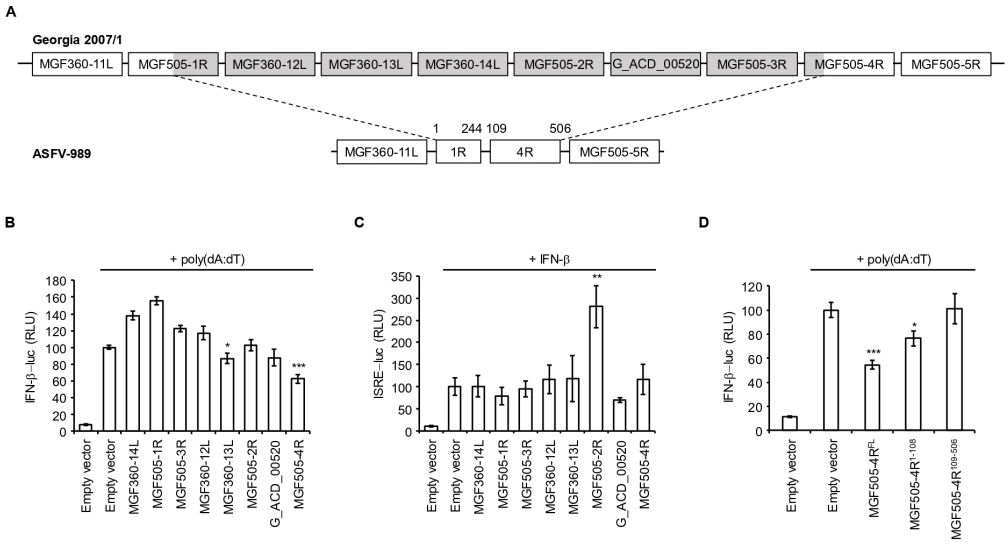
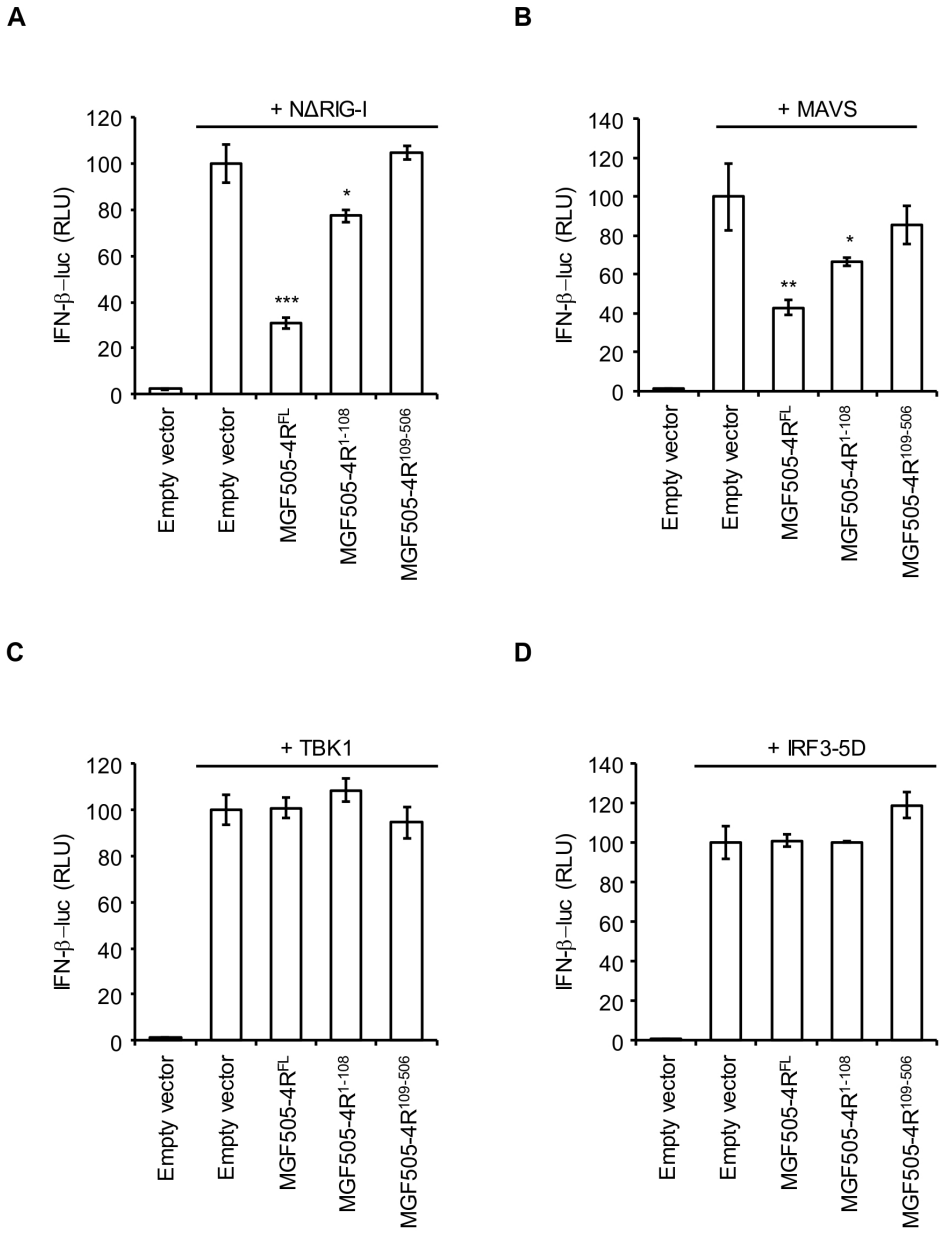
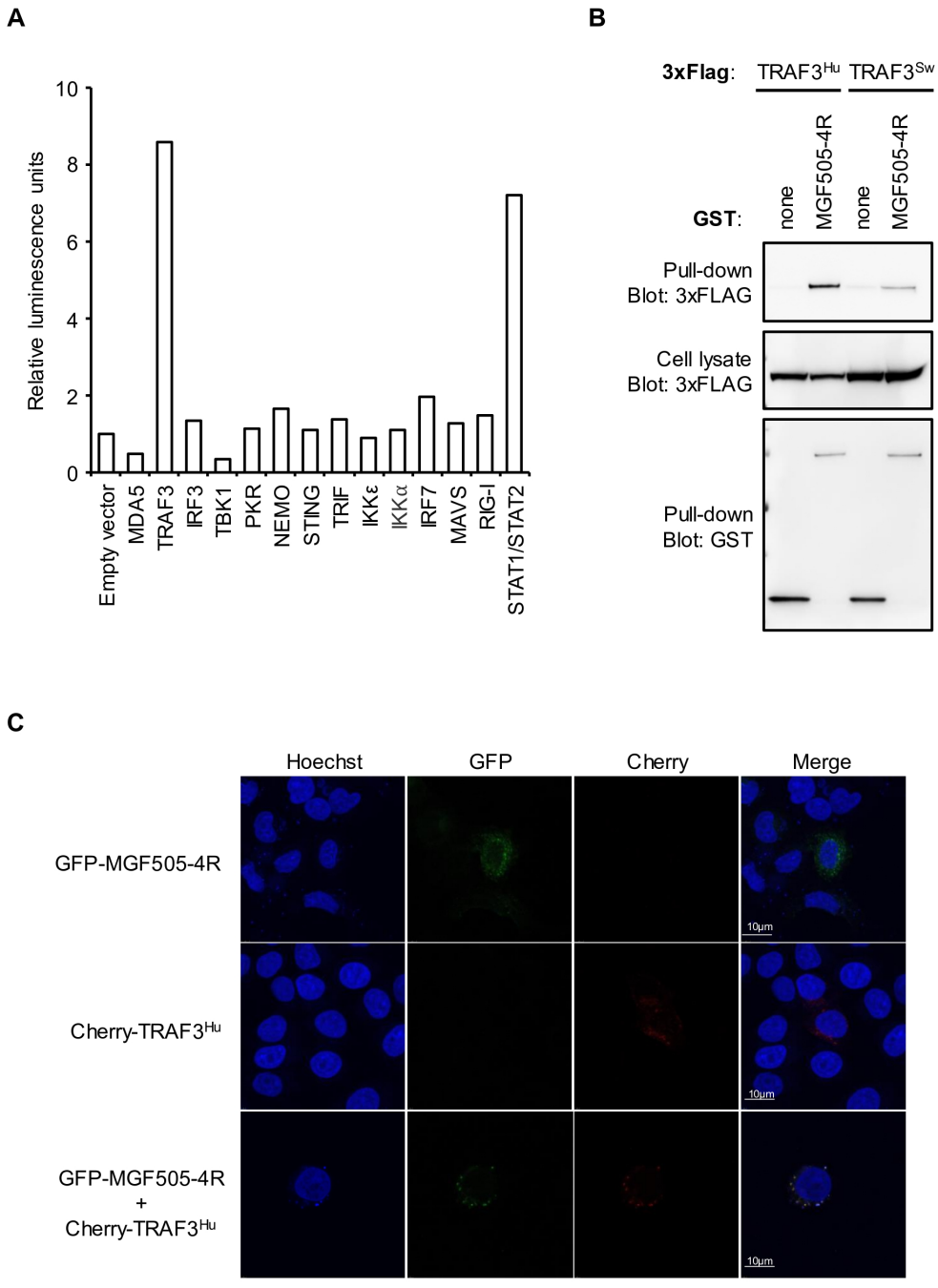


Figure 3. Activation of the IFN-β and ISRE promoters in cells expressing ASFV proteins. (A) Schematic representation of the ASFV genes at the site of the deletion. The numbers indicate amino acids (aa) positions. (B) HEK-293T cells were co-transfected with IFN-β-pGL3 and pRL-CMV reference plasmids, poly(dA:dT) and pCI-neo-3×FLAG expression vectors encoding 3×FLAG alone or fused to the indicated ASFV ORFs. After 48h, the relative luciferase activity was determined. (C) Same experiment as (B) except that transfected cells were stimulated after 24h with 1000 IU/ml of IFN-β and expression of the luciferase reporter construct controlled by ISRE repeats (pISRE-Luc) was quantified 24h later. (D) Same experiment as (B) but cells were co-transfected with full-length (FL) or the indicated fragments of MGF505-4R. All experiments were achieved in triplicate. Data represent means ± SD and are representative of three independent experiments. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.005$ and ***, $p < 0.0005$.



781

782 **Figure 4. Effects of MGF505-4R on IFN-β promoter upon activation with different**
783 **components of the IFN-α/β induction pathway.** HEK-293T cells were co-transfected with
784 IFN-β-pGL3 and pRL-CMV reference plasmids and pCI-neo-3×FLAG expression vectors
785 encoding 3×FLAG alone or fused to MGF505-4R^{FL}, MGF505-4R$^{1-108}$ or MGF505-4R$^{109-506}$.
786 The IFN-β promoter was activated by overexpressing NΔRIG-I (A), MAVS (B), TBK1 (C) or
787 IRF3-5D (D). All experiments were achieved in triplicate. Data represent means ± SD and are
788 representative of three independent experiments. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.005$ and ***, $p < 0.0005$.



789

790 **Figure 5. MGF505-4R interaction with TRAF3.** (A) HEK-293T cells were co-transfected
791 with pDESTN2H-N1 encoding the fragment N1 of the NanoLuciferase (aa1-aa65) fused to
792 MGF505-4R and pDESTN2H-N2 encoding the fragment N2 of the NanoLuciferase (aa66-
793 aa171) alone or fused to the indicated swine cellular protein. STAT1/STAT2 interaction was

used as positive control. In this condition, STAT1 and STAT2 were expressed in pDESTN2H-N1 and pDESTN2H-N2, respectively. After 48h, cells were lysed, the bioluminescence was measured and data are presented as a fold increase relative to the condition where pDESTN2H-N1-MGF505-4R and pDESTN2H-N2 empty vector were co-transfected. (B) HEK-293T cells were transfected with expression vectors encoding GST alone or fused to MG505-4R and tested for the interaction with either human or swine TRAF3. Total cell lysates were prepared 48h post-transfection (cell lysate; middle panel), and co-purifications of indicated cellular proteins were assayed by pull-down using glutathione-sepharose beads (pull-down; upper panel). GST-tagged MG505-4R was detected by immunoblotting using anti-GST antibody (pull-down; lower panel), while TRAF3 was detected with an anti-3xFLAG antibody. (C) HeLa cells were co-transfected with pCherry-C1 and pEGFP-C1 plasmids encoding human TRAF3 and MG505-4R, respectively. 24 h after, cells were fixed and labeled with the dye Hoechst 33258 to stain nuclei. Intracellular localization of Hoechst-stained nuclei (blue), TRAF3 (red) and MG505-4R (green) were visualized by confocal fluorescence microscopy (×40 magnification). Scale bars represent 10 µM.

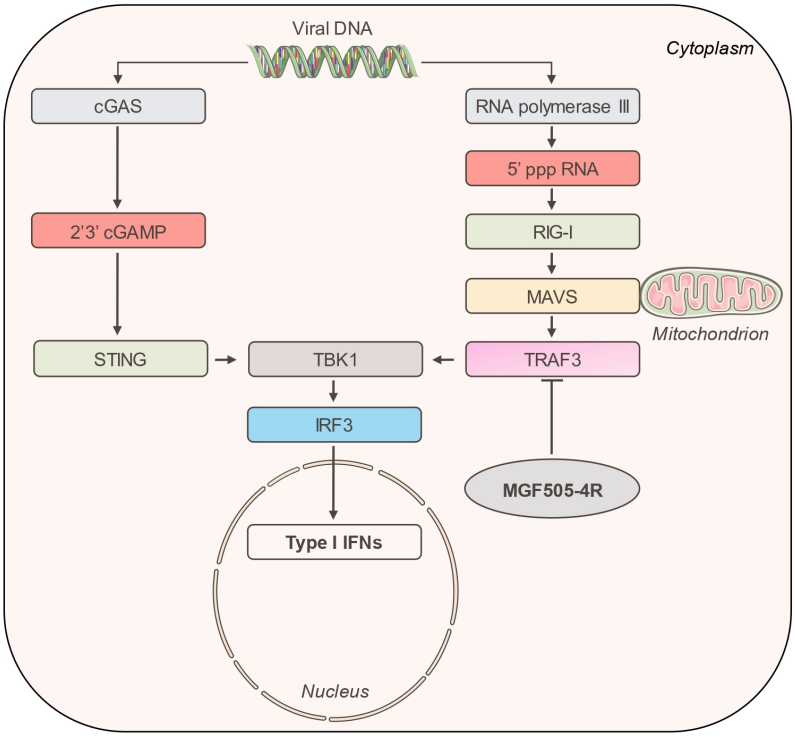


Figure 6. Schematic representation of the induction of IFN-α/β signaling upon the recognition of ds viral DNA.

III. Conclusions

L'identification des interactions moléculaires impliquées dans le processus d'atténuation est particulièrement importante pour comprendre les mécanismes induisant l'échappement immunitaire, la pathogénicité et les diverses stratégies de contrôle du virus. Nous avons pu montrer que la protéine virale MGF505-4R, comme de nombreuses autres protéines de la famille des MGF est capable d'inhiber la réponse IFN-I. Au sein de la famille multigénique MGF505, plusieurs autres protéines ont déjà été décrites dans la littérature comme capables d'inhiber la voie IFN-I, comme les protéines MGF505-11R, -7R et -3R (263, 267, 269). Pourtant, ces dernières ont été décrites comme inhibant la voie en aval de cGAS-STING et non pas celle impliquant RIG-I. Nous avons donc montré pour la première fois qu'une protéine de la famille des MGF est capable d'inhiber en aval de la voie induite par RIG-I. Parmi les protéines de l'ASFV, seule une autre protéine appelée I267L avait été décrite comme capable de pirater cette voie (188). Ainsi, cette famille multigénique est composée de nombreux modulateurs de la voie IFN-I, généralement non essentiels à la réplication virale, permettant ainsi la synthèse de virus recombinants mutants grâce à des délétions. Aujourd'hui, de très nombreuses protéines de l'ASFV ont pu être montrées comme étant impliquées dans l'échappement immunitaire, montrant la complexité de ce processus, illustrant également une redondance et/ou des actions synergiques entre protéines virales, d'où l'importance de connaitre les mécanismes sous-jacents liés à ces inhibitions. Pourtant, nous avons seulement pu montrer que la protéine MGF505-4R interagit avec TRAF3, sans pour autant prouver que cette interaction soit bien responsable de l'inhibition de la voie IFN-I induite par MGF505-4R. Nous souhaitons maintenant caractériser cette interaction afin de comprendre les mécanismes moléculaires expliquant potentiellement cette inhibition. MGF505-4R induit-elle une inhibition, une dégradation, une relocalisation, etc de TRAF3 ? Il serait aussi particulièrement intéressant d'avoir un virus délété seulement du gène codant pour MGF505-4R (GeorgiaΔMGF505-4R) pour savoir si MGF505-4R est bien responsable du phénotype observé *in vitro* sur l'IFN-I.

En plus d'induire une bonne protection des animaux vaccinés, cette souche atténuée ASFV 989 est potentiellement utilisable en DIVA par voies intramusculaire et oronasale (370) ce qui fait d'elle un candidat vaccin particulièrement prometteur, notamment dans l'optique d'une stratégie de vaccination des animaux sauvages (sangliers). Il serait maintenant particulièrement intéressant de pouvoir répliquer cette souche vaccinale sur des lignées cellulaires, et pas seulement sur macrophages alvéolaires primaires.

CONCLUSION GÉNÉRALE

La Peste Porcine Africaine est considérée de nos jours comme la principale menace pour les élevages porcins. Son incidence a augmenté de façon exponentielle au cours de ces dix dernières années se propageant maintenant à presque tous les continents, entraînant une charge socio-économique élevée ainsi qu'un véritable impact sur la santé animale. Sans vaccin ni antiviraux efficaces, seules des stratégies de contrôle de la maladie (mesures de biosécurité, abattages systématiques des animaux infectés, etc) sont utilisées pour le moment. Le développement de stratégies antivirales constitue ainsi un véritable défi. La caractérisation des fonctions des protéines virales et le décryptage des interactions du virus avec les protéines de l'hôte est une condition préalable et essentielle au développement rationnel de vaccins vivants atténués. Nous avons pu dévoiler une petite partie de l'interactome de l'ASFV permettant d'identifier quelques voies de signalisation et modules fonctionnels de la cellule manipulés par le virus à son profit. Cependant, nous sommes loin d'avoir atteint la complexité du réseau d'interactions entre l'ASFV et son hôte porcin.

L'ASFV semble coder pour de multiples facteurs de virulence et de pathogénicité permettant l'échappement immunitaire. Cette inhibition de la réponse immunitaire innée de l'hôte crée des conditions favorables à la réplication virale. Cependant, malgré l'engouement de ces dernières années pour ce virus, encore peu de mécanismes explicatifs ont été mis à jour et malgré certaines redondances des fonctions des protéines virales de nombreuses zones d'ombres persistent. La nature de la réponse immunitaire anti-ASFV semble complexe et parfois controversée, les études d'infections expérimentales *in vivo* et *in vitro* donnant parfois des résultats différents. Des facteurs inhérents à l'hôte (types cellulaires, statuts immunologiques des porcs) et aux virus (variabilité génétique des souches) peuvent rendre difficile la généralisation de certains résultats. Il serait maintenant particulièrement intéressant d'investiguer les interactions hôtes-ASFV ainsi que la réponse antivirale chez deux hôtes très peu étudiés dans le cadre de l'infection par l'ASFV : la tique molle du genre *Ornithodoros* et le phacochère, hôte naturellement infecté par l'ASFV mais résistant.

Publications

Mes travaux de thèse sont en train d'être valorisés au travers :

- Une publication soumise à *Frontiers Immunology*, correspondant au chapitre II de mon manuscrit de thèse.
- Une revue publiée dans Virologie (372), Annexe 7. **Dupré J**, Le Potier M-F, Vitour D, Caignard G. 2022. *Modulation of the innate immune response by African swine fever virus*. Virol Montrouge Fr 26:387–400.
- Un manuscrit en cours de rédaction, écrit en collaboration avec l'équipe du FLI sur A151R-MGF360-21R & BANF1.

De plus, j'ai pu contribuer à d'autres projets au cours de ma thèse, aboutissant à différentes publications :

- Dolata KM, Fuchs W, Caignard G, **Dupré J**, Pannhorst K, Blome S, Mettenleiter TC, Karger A. 2023. *CP204L Is a Multifunctional Protein of African Swine Fever Virus That Interacts with the VPS39 Subunit of the Homotypic Fusion and Vacuole Protein Sorting Complex and Promotes Lysosome Clustering*. J Virol 97:e0194322. (373). Annexe 8.
- Fablet A, Kundlacz C, **Dupré J**, Hirchaud E, Postic L, Sailleau C, Bréard E, Zientara S, Vitour D, Caignard G. 2022. *Comparative Virus-Host Protein Interactions of the Bluetongue Virus NS4 Virulence Factor*. *Viruses* 14:182. (374).
- Sarry M, Caignard G, **Dupré J,** Zientara S, Vitour D, Bakkali Kassimi L, Blaise-Boisseau S. 2023. *Host-Specific Interplay between Foot-and-Mouth Disease Virus 3D Polymerase and the Type-I Interferon Pathway*. *Viruses* 15:666. (375).

Communications orales et affichées

- **ANSES scientific and doctoral days (JSDA 2023),** Maisons-Alfort-France - Communication orale
- **XXVème Journées francophones de virologie (JFV 2023),** Paris – France – Communication orale
- **Journées d'animation scientifiques du département Santé Animale INRAE (JAS 2022),** Anglet-France. Communication orale.
- **ANSES scientific and doctoral days (JSDA 2022),** Maisons-Alfort-France. Communication affichée.
- **12th European Society for Veterinary Virology (ESVV, 2022),** Ghent-Belgique. Communication affichée.
- **Journées de la Recherche à l'ENVA (2022),** Maisons-Alfort-France. Communication orale.
- **14th EPIZONE Annual Meeting (2022),** Barcelone-Espagne. Communication orale.
- **XXIVème Journées francophones de virologie (JFV 2022),** Strasbourg-France. Communication affichée.

ANNEXES

Annexe 1 : Séquences des amorces utilisées en RT-qPCR

	Amorces sens	Amorces anti-sens
IFNb-porc	AGTTGCCTGGGACTCCTCAA	CCTCAGGGACCTCAAAGTTCAT
IFNb-hum	TGCATTACCTGAAGGCCAAG	AAGCAATTGTCCAGTCCCA
IFNa-porc	GGCTCTGGTGCATGAGATGC	CAGCCAGGATGGAGTCCTCC
BANF1-hum	CAAAAGCACCGAGACTTCGT	CCCGGAAGAGGTCTTCATCT
GAPDH-hum	ATG GCA AAT TCC ATG GCA CC	AGC ATC GCC CCA CTT GAT TT
GAPDH-porc	ACATGGCCTCCAAGGAGTAAGA	GATCGAGTTGGGGCTGTGACT
B2M-porc	CAAGATAGTTAAGTGGGATCGAGAC	TGGTAACATCAATACGATTTCTGA
p30	ATGAAAATGGAGGTCATCTTCAAAAC	AAGTTTAATGACCATGAGTCTTACC

Annexe 2 : Résultats complets des cribles Y2H effectués avec la banque humaine.

Appâts	Nombre de clones	Appâts	Nombre de clones
R298L	1335	**DP96R**	0
MGF360-13L	159	**A238L**	0
MGF360-9L	152	**I329L**	0
MGF505-3R	187	**A179L**	0
MGF360-12L	139	**MGF360-10L**	0
MGF505-9R	118	**MGF505-1R**	0
MGF360-11L	41	**MGF360-14L**	0
I267L	34	**MGF505-2R**	0
DP148R	13	**G_ACD_00520**	0
DP71L	10	**MGF505-4R**	0
A224L	4	**C962R**	0

Annexe 3 : Résultas complets des cribles Y2H effectués avec la banque porcine.

Appâts	Nombre de clones	Appâts	Nombre de clones	Appâts	Nombre de clones
MGF360-6L	2000	G_ACD_00520	0	B354L	0
MGF360-21R	1000	K78R	0	I7L	0
A151R	978	285L	0	C129R	0
MGF360-9L	487	G_ACD_00320	0	MGF110-4L	0
MGF100-1R	218	MGF100-1L	0	H359L	0
MGF100-3L	170	MGF360-1La	0	MGF505-6R	0
MGF505-9R	35	MGF360-19Ra	0	B263R	0
MGF360-1Lb	34	MGF360-19Rb	0	D205R	0
EP424R	30	MGF360-15R	0	CP475L	0
C315R	26	G_ACD_00350	0	CP80R	0
B407L	19	H233R	0	MGF505-5R	0
I8L	13	G_ACD_00600	0	MGF505-11L	0
DP238L	6	S183L	0	MGF360-16R	0
R298L	5	E111R	0	MGF360-8L	0
MGF505-3R	5	H171R	0	MGF505-4R	0
I226R	5	CP123L	0	MGF360-3L	0
S183L	4	K205R	0	B385R	0
EP296R	2	L60L	0	MGF360-2L	0
MGF360-13L	2	E184L	0	MGF360-4L	0
C962R		E248R	0	B475L	0
A224L	0	061R	0	K145R	0
MGF360-11L	0	A104R	0	I11L	0
MGF360-12L	0	I196L	0	I215L	0
I267L	0	B119L	0	EP364R	0
DP148R	0	F165R	0	B354L	0
DP96R	0	EP153R	0	I9R	0
DP71L	0	MGF110-2L	0	MGF505-10R	0
A238L	0	A137R	0	MGF300-2R	0
I329L	0	MGF110-7L	0	CP204L	0
A179L	0	B125R	0	E146L	0
MGF360-10L	0	CP312R	0	C475L	0
MGF505-1R	0	E301R	0	MGF505-7R	0
MGF360-14L	0	M448R	0		
MGF505-2R	0	E199L	0		

Annexe 4 : Liste des interacteurs trouvés pour chaque appât viral.

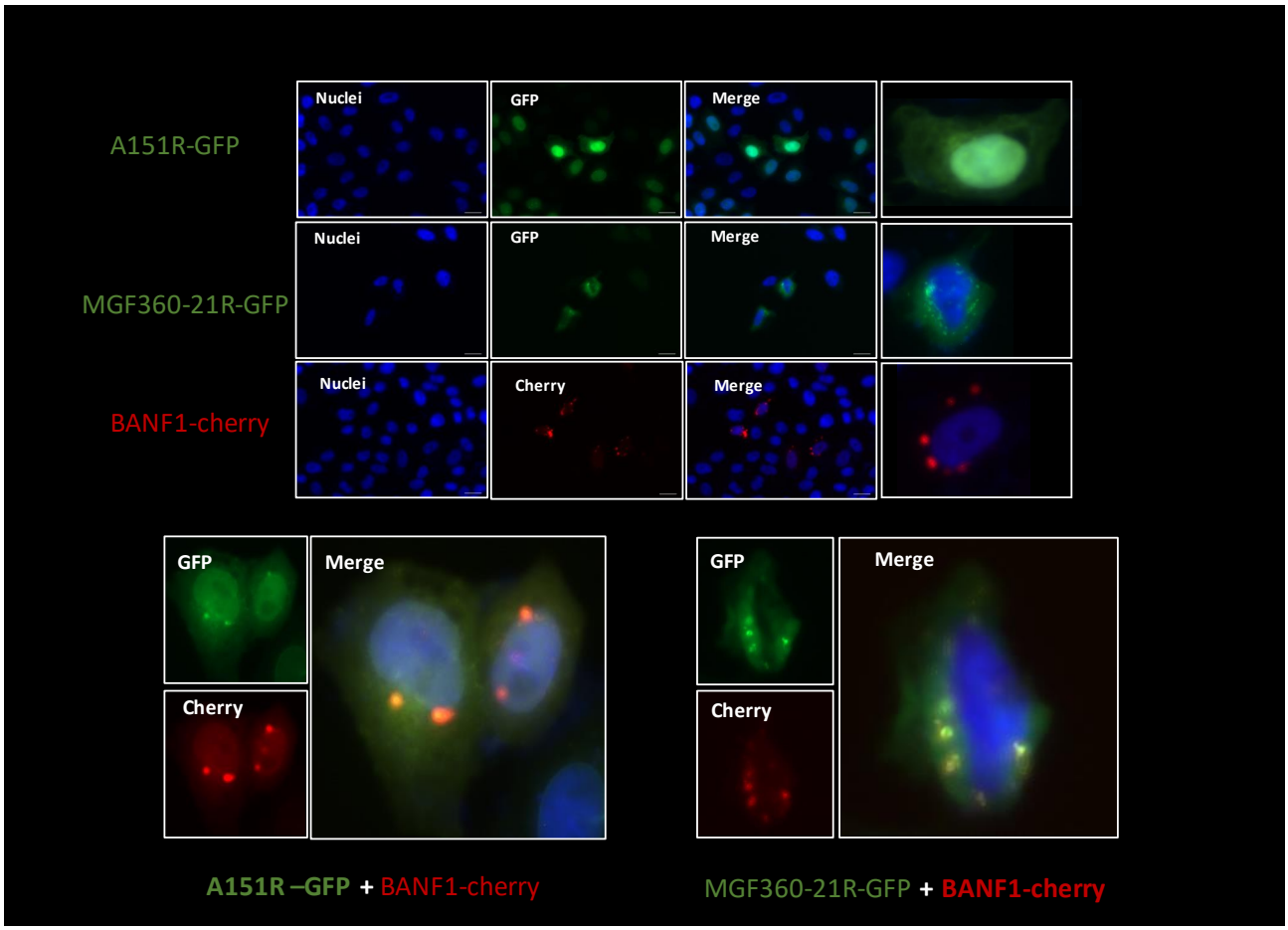
	A151R	B407L	DP148R	DP71L	I267L	I8L	MGF100-1R	MGF100-3L	MGF360_11L	MGF360_12L	MGF360_13L	MGF360_9L	MGF360-21R	MGF360-6L	MGF505_3R	MGF505-3R	MGF505-9R	R298L	S183L	EP296R	total
Total général	**179**	**5**	**11**	**6**	**31**	**10**	**72**	**104**	**31**	**99**	**92**	**198**	**130**	**94**	**89**	**3**	**43**	**151**	**2**		1350
PPP1R12C						5						36		81				62			184
NME2												34						59			93
NME1												8						15			23
CLTC												2						5			7
NME1-NME2												2						3			5
VIM																		3			3
FTH1							7	104									4	2			117
CEP55																		2			2
SAT1																	18				18
TPM1																	11				11
MLH1																	4				4
NONO																	3				3
ZC3HAV1																	3				3
TFPT						5							16			3			2		26
UBL7															50						50
COPB1															23						23
EPRS1															14						14
CALCOCO2															2						2
GOLGB1												44									44
FLNB												29									29
MORC4												17									17
KIF15												6									6
TRIM47												5									5
SPAG5												3									3
TNIP2												2									2
CDR2												2									2
CENPF												2									2
EFCAB14												2									2
KRT15												2									2
SF3B2												2									2
GRIPAP1														6							6
S100A12							2							3							5
ATP6							7							2							9
RPL35A														2							2
BANF1	179												114								293
AFDN											36										36
KRT19											15										15
EIF3A											10										10
KANSL2											7										7
R3HDM1											7										7
GSE1											4										4
CEP152											3										3
IGFBP4											3										3
PDLIM7											3										3
IARS1											2										2
RPL22											2										2
RCN2										68											68
UBA3										8											8
MND1										7											7
CBY1										5											5
ACOT9										4											4
SFPQ										3											3
FH										2											2
NUDT5										2											2
TACC1									16												16
PSMC5									10												10

COPA									5												5
COX1							4														4
C1QC							4														4
RPL29							4														4
TMSB10							4														4
S100A9							4														4
CD74							3														3
SMPD1							3														3
AKR7A2							2														2
B2M							2														2
CYTB							2														2
DRAP1							2														2
RPS17							2														2
GSN							2														2
HLA-B							2														2
HLA-DQA1							2														2
MRPL37							2														2
NAA20							2														2
ND1							2														2
PPIA							2														2
RPL37A							2														2
SEMA4F							2														2
SNX5							2														2
UBE2I					31																31
BLOC1S2				3																	3
KLC4				3																	3
TPR			5																		5
TRIM7			4																		4
CHMP5			2																		2
EEF1A1		3																			3
RPS28		2																			2
ATF4																				2	2

GO biological process complete	Nombre gènes dans ce terme (Homos sapiens)	Nombre de gènes présents dans le crible	Nombre de gènes attendus	Fold Enrichment	P-value	Interacteurs
peptide antigen assembly with MHC class II protein complex (GO:0002503)	16	3	.07	42.42	7.59E-05	B2M, HLA-DQA1
regulation of spindle assembly (GO:0090169)	34	4	.15	26.62	2.31E-05	CHMP5, TPR, KIF15, SPAG5
immunoglobulin production involved in immunoglobulin-mediated immune response (GO:0002381)	46	4	.20	19.67	6.92E-05	MLH1 B2M, HLA-DQA1, HLA-B
cytoplasmic translation (GO:0002181)	124	7	.55	12.77	1.81E-06	RPS28, RPL29, RPL22, EIF3A, RPL37A, RPS17, RPL35A
negative regulation of viral process (GO:0048525)	95	5	.42	11.91	8.00E-05	ZC3HAV1, CD74, BANF1, PPIA, GSN
antigen processing and presentation (GO:0019882)	96	5	.42	11.78	8.39E-05	B2M, HLA-DQA1, CD74, HLA-B, HLA-B
response to interferon-gamma (GO:0034341)	130	6	.57	10.44	3.05E-05	FLNB, CALCOCO2, CD74, EPRS1, VIM, GSN
regulation of viral process (GO:0050792)	164	6	.72	8.28	1.06E-04	ZC3HAV1, CD74, SMPD1, BANF1, PPIA, GSN
translation (GO:0006412)	379	12	1.68	7.16	1.45E-07	RPS28, EEF1A1, RPL29, RPL22, EIF3A, RPL37A, RPS17, RPL35A, EPRS1, MRPL37, IARS, EIF3A
peptide biosynthetic process (GO:0043043)	408	12	1.80	6.65	3.12E-07	RPS28, EEF1A1, RPL29, RPL22, EIF3A, RPL37A, RPS17, RPL35A, EPRS1, MRPL37, IARS1, EIF3A
innate immune response (GO:0045087)	832	15	3.68	4.08	4.06E-06	S100A12, SFPQ, FNLB, C1QC, ZC3HAV1, CALCOCO, B2M, CD74, EPRS1, SMPD1, HLAB, VIM, S100A9, GSN, NONO
mitotic cell cycle (GO:0000278)	627	11	2.77	3.97	1.12E-04	UBA3, CENPF, TACC1, CHMP5, TPR, KIF15, UBE21, SPAG5, CLTC, CEP55, BANF1
organonitrogen compound biosynthetic process (GO:1901566)	1333	21	5.89	3.56	3.11E-07	RPS28, SAT1, EEF1A1, RPL29, RPL22, EIF3A, RPL37A, RPS17, RPL35A, EPRS1, MRPL37, IARS1, EIF3A, SMPD1, ND1, FH, NME1, NME2, ATP6, SAT1, SAT1
cellular nitrogen compound biosynthetic process (GO:0044271)	1588	23	7.02	3.28	3.28E-07	DRAP1, CENPF, RPS28, SAT1, EEF1A1, RPL29, RPL22, EIF3A, RPL37A, RPS17, RPL35A, EPRS1, MRPL37, IARS1, EIF3A, SMPD1, ND1, FH, NME1, NME2, ATP6, SAT1, ATF4
defense response to other organism (GO:0098542)	1068	15	4.72	3.18	7.20E-05	S100A12, SFPQ, FNLB, C1QC, ZC3HAV1, CALCOCO, B2M, CD74, EPRS1, SMPD1, HLAB, VIM, S100A9, GSN, NONO
response to external biotic stimulus (GO:0043207)	1432	19	6.33	3.00	1.48E-05	S100A12, CHMP5, SFPQ, FNLB, C1QC, ZC3HAV1, CALCOCO, MLH1, B2M, CD74, EPRS1, SMPD1, HLA-B, VIM, S100A9, GSN, NONO, BANF1, TNIP2
response to biotic stimulus (GO:0009607)	1478	19	6.53	2.91	2.29E-05	S100A12, EEF1A1, CHMP5, SFPQ, FNLB, C1QC, ZC3HAV1, CALCOCO, MLH1, B2M, CD74, EPRS1, SMPD1, HLA-B, VIM, PPIA, S100A9, GSN, NONO, BANF1, TNIP2
protein-containing complex organization (GO:0043933)	1423	18	6.29	2.86	4.82E-05	RPS28, CENPF, AFDN, CHMP5, TPR, EIF3A, BLOC1S2, B2M, HLA-DQA1, CD74, SF3B2, EPRS1ND1, EIF3A, CBY1CLTC, GSN, HLA-DQA1
immune response (GO:0006955)	1621	19	7.16	2.65	7.93E-05	S100A12, SFPQ, FNLB, C1QC, ZC3HAV1, CALCOCO, MLH1, B2M, CD74, HLA-DQA1, EPRS1, SMPD1, HLA-B, VIM, FTH1, S100A9, GSN, NONO
cellular biosynthetic process (GO:0044249)	2464	25	10.89	2.30	5.86E-05	DRAP1, CENPF, RPS28, SAT1, EEF1A1, RPL29, RPL22, EIF3A, RPL37A, RPS17, RPL35A, EPRS1, MRPL37, IARS1, EIF3A, SMPD1, ND1, FH, NME1, NME2, ATP6, SAT1, ATF4, CD74, SAT1
cellular component organization (GO:0016043)	5523	42	24.41	1.72	7.76E-05	RPS28, CENPF, GOLFB1, TACC1, AFDN, TMSB10, CHMP5, TPR, SFPQ, FLNB, KRT19, C1QC, UBE21, SPAG5, KRT15, MLH1, BLOC1S2, EIF3A, NUDT5, B2M, HLA-DQA1, CD74, TMP1, SF3B2, EPRS1, SMPD1, ND1, TFPT, EIF3A, CBY1

Annexe 5 : Analyse de GO terms

Annexe 6 : Colocalisation A151R-BANF1 et MGF360-21R-BANF1 en cellules HeLa



Revue

Virologie

Virologie 2022, 26 (5) : 387-400

Modulation de la réponse immunitaire innée par le virus de la peste porcine africaine

Modulation of the innate immune response by African swine fever virus

Juliette Dupré[1]
Marie-Frédérique Le Potier[2]
Damien Vitour[1]
Grégory Caignard[1],

[1] UMR Virologie, Inrae, École nationale vétérinaire d'Alfort, Anses, Laboratoire de Santé animale, Université Paris-Est, 94700 Maisons-Alfort, France
[2] Unité de Virologie immunologie porcine, Laboratoire de Ploufragan/Plouzané/Niort, Anses, France

Article accepté le 29 septembre 2022

Résumé. La peste porcine africaine (PPA) est une maladie hautement pathogène causant une fièvre hémorragique chez les suidés domestiques et sauvages. Elle est responsable de nombreuses épizooties notamment en Europe et en Asie, causant de grandes pertes économiques pour la filière porcine. Le virus de la peste porcine africaine (ASFV) est l'agent étiologique responsable de cette maladie. C'est un virus avec un génome à ADN double brin de grande taille, codant pour plus de 150 protéines. Différents travaux ont montré qu'il existe une étroite relation entre la capacité de certaines protéines virales à inhiber la réponse interféron de type I (IFN-I) et les processus d'atténuation et de virulence pour l'ASFV. Cette revue décrit les mécanismes d'inhibition de la réponse IFN-I par les protéines d'ASFV permettant d'expliquer sur le plan moléculaire l'échappement à la réponse immunitaire innée.

Mots clés : virus de la peste porcine africaine, IFN, apoptose

Abstract. African swine fever (ASF) is a highly pathogenic disease causing haemorrhagic fever in domestic and wild swine. It is responsible for numerous epizootics, particularly in Europe and Asia, causing major economic losses for the pig industry. African Swine Fever virus (ASFV) is the etiological agent responsible for this disease. It is a very large double-stranded DNA virus, encoding for over 150 proteins. Various studies have shown that there is a close relationship between the ability of some viral proteins to inhibit the type I interferon (IFN-I) response and the attenuation and virulence processes of ASFV. This review describes the mechanisms of inhibition of the IFN-I response by ASFV proteins, which provide a molecular explanation of how ASFV escapes the innate immune response.

Key words: African swine fever virus, IFN, apoptosis

Pathogénèse, taxonomie et épidémiologie

La peste porcine africaine (PPA) a été décrite pour la première fois au Kenya au début du xxe siècle [1]. C'est une maladie virale contagieuse, soumise à déclaration obligatoire à l'Organisation mondiale de la santé animale (OMSA), touchant uniquement les suidés sauvages et domestiques. La PPA induit un très haut taux de mortalité et est ainsi une véritable menace pour l'industrie du porc. Elle provoque une fièvre hémorragique chez les porcs et les sangliers, tandis que les phacochères *(Phacochoerus africanus)* et les potamochères *(Potamochoerus larvatus)* ne semblent pas y être sensibles ; seule une virémie transitoire est observée chez les jeunes phacochères [2]. Il existe plusieurs formes de la maladie avec des signes cliniques très différents qui dépendent notamment des souches virales et de l'hôte infecté [3]. Les souches les plus virulentes induisent une forme aiguë avec près de 100 % de mortalité chez les porcs et les sangliers tandis que les souches modérément virulentes et non virulentes provoquent respectivement des formes subaiguës et chroniques [4]. Chez le porc domestique *(Sus scrofa)*, les formes virulentes entraînent de la fièvre, une anorexie, un dépérissement, diverses lésions dues à des hémorragies ainsi qu'une

Correspondance : J. Dupré, G. Caignard
<juliettedupre96@gmail.com>
<gregory.caignard@vet-alfort.fr>

doi:10.1684/vir.2022.0974

Pour citer cet article : Dupré J, Le Potier MF, Vitour D, Caignard G. Modulation de la réponse immunitaire innée par le virus de la peste porcine africaine. *Virologie* 2022; 26(5) : 387-400 doi:10.1684/vir.2022.0974

© John Libbey Eurotext, 2022

lymphopénie alors que les formes chroniques peuvent entraîner une inflammation des articulations [5].

Le virus de la peste porcine africaine, ou *African Swine Fever virus* (ASFV) est l'agent étiologique responsable de la PPA. L'ASFV est un virus enveloppé d'environ 250 nm de diamètre possédant un génome composé d'ADN double brin (db) linéaire. C'est le seul représentant de la famille des *Asfaviridae*. Le séquençage du génome de l'ASFV semble montrer qu'il partage des similitudes avec certains virus géants infectant les amibes, comme le Pacmanvirus [6] ou le Faustovirus [7]. En effet, 35 gènes sont conservés entre les Pacmanvirus, Faustovirus et Asfavirus [6], suggérant ainsi un ancêtre commun à ces différents virus. Il existe actuellement vingt-quatre génotypes décrits d'ASFV à travers le monde qui se distinguent par la séquence primaire de leur protéine majeure de capside p72 (gène B646L), une des protéines d'ASFV les plus conservées. Tous ces génotypes sont présents sur le continent africain [8], tandis que seuls deux génotypes (I et II) sont présents en Europe.

Il y a eu tout au long du xxe siècle différentes introductions de la peste porcine africaine en Europe. La présence de la PPA était limitée au continent africain jusqu'en 1957 où le génotype I est apparu une première fois au Portugal. Après l'éradication rapide de ce foyer, une nouvelle introduction en 1960 a permis la diffusion de la PPA en France, Belgique, Malte, Pays Bas, et en Italie, ainsi que dans plusieurs pays d'Amérique du Sud et des Caraïbes. Ces foyers sporadiques ont été éradiqués rapidement, à l'exception de la Péninsule ibérique où la PPA est restée endémique jusqu'aux années 1990, notamment à cause de la présence de la tique *Ornithodoros erraticus* qui joue un rôle de réservoir [9, 10]. La PPA est endémique en Sardaigne depuis son introduction sur l'île en 1978 dans les populations de porcs en liberté. En revanche, l'interdiction de l'élevage extensif et les mesures de dépopulation des porcs sauvages semblent permettre une nette amélioration de la situation [11]. En 2007, une souche très virulente du génotype II est apparue en Europe, *via* la Géorgie [12], puis s'est peu à peu propagée dans le Caucase et en Russie dans les populations de sangliers et de porcs domestiques. En 2014, la PPA atteint l'Union européenne, avec la Pologne et les pays Baltes, et en 2018 la maladie se propage en République tchèque, en Hongrie, Roumanie et Bulgarie. Cette même année, la PPA fait un saut de plusieurs milliers de kilomètres pour atteindre les Ardennes belges, à proximité de la frontière franco-belge, où de nombreux sangliers ont été testés positifs. La Belgique a retrouvé son statut indemne depuis 2020. La PPA a également émergé en Chine durant l'été 2018 et s'est peu à peu propagée dans la grande majorité des pays d'Asie du Sud-Est (Vietnam, Mongolie, Indonésie, Philippines…) touchant majoritairement les populations de porcs domestiques, décimant ainsi une majeure partie du cheptel. Au total, 43,46 millions de porcs chinois sont morts en lien avec la PPA, tués directement par cette maladie ou abattus pour éviter sa propagation [13]. En septembre 2020, des premiers cas de sangliers positifs ont été retrouvés dans l'est de l'Allemagne, en bordure des forêts polonaises où les populations de sangliers sont également infectées. Une des conséquences a été l'apparition de plusieurs foyers de PPA chez des sangliers et dans des élevages de porc domestiques dans l'est de l'Allemagne, avec plus de 3467 cas de sangliers déclarés positifs pour l'ASFV dans ce pays depuis septembre 2020 (source : *Animal Disease Information System,* ADIS, Commission européenne, 11/4/2022) (*figure 1*). Plus récemment, au mois de mai 2022, un élevage de porcs en plein air a été touché dans le *land* du Bade-Wurtemberg à seulement 6,5 km de la frontière française, mais à plus de 500 km des autres foyers de l'est de l'Allemagne, sans que l'origine de ce cas soit à ce jour connue. La PPA est aussi apparue aux Caraïbes en 2021, touchant notamment la République dominicaine et Haïti. En 2022, des cas de sangliers contaminés ont aussi été également retrouvés en Italie continentale, comme en périphérie de Rome ainsi que dans les régions de la Ligurie et du Piémont. Ces cas d'ASFV sont avérés issus de souches de génotype II, excluant de fait une contamination venant de la Sardaigne où seul le génotype I circule.

Mode de transmission, organisation génomique et cycle viral

La PPA peut être transmise par contact direct entre animaux infectés et sains [14] mais aussi par l'intermédiaire de matériel contaminé ou de viande infectée [15]. En effet, l'ASFV est un virus très résistant au sein d'un environnement protéique comme la matière organique. La PPA peut être aussi transmise par les tiques molles du genre *Ornithodoros* [16] de la famille des *Argasidae*. Plusieurs espèces d'*Ornithodoros* sont compétentes pour l'ASFV, notamment *l'Ornithodoros moubata* en Afrique [17], ou l'*Ornithodoros erraticus* dont la présence est limitée à la péninsule ibérique. Cette dernière a d'ailleurs joué un rôle de réservoir lors de l'épidémie touchant l'Espagne et le Portugal à la fin du xxe siècle [10, 18]. Ces tiques étant endophiles, elles sont impliquées dans la transmission et dans le maintien de la maladie au sein des terriers où un cycle sylvatique est établi entre les phacochères et les tiques en Afrique de l'Est et en Afrique du Sud [2] (*figure 2*). Le virus peut se répliquer au sein des tiques *Ornithodoros* [19] et se transmettre de tique en tique par voie transtadiale, trans-ovarienne ou sexuelle [17, 20, 21]. L'ASFV est donc le seul arbovirus à génome à ADN double brin (ADNdb) pouvant se répliquer à la fois chez des hôtes mam-

© John Libbey Eurotext, 2022

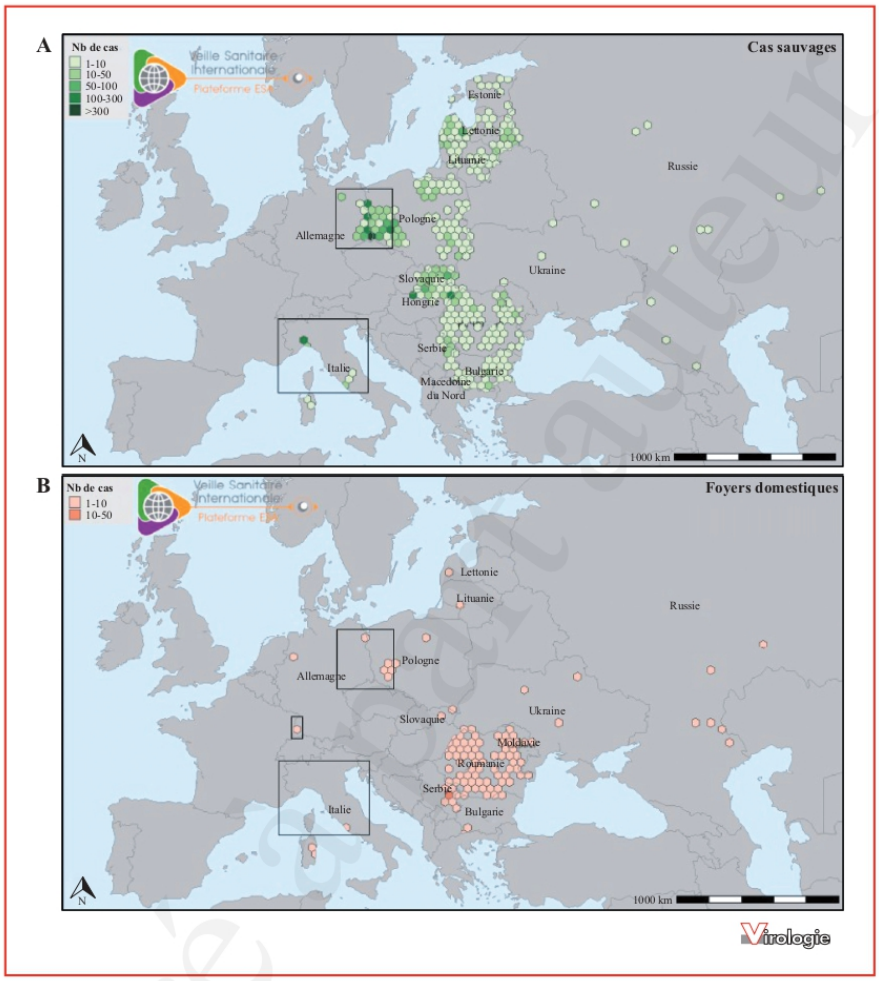


Figure 1. Nombre de cas de peste porcine africaine en Europe entre le 7/7/2021 et 12/6/2022. *A :* chez les sangliers. *B :* chez les porcs domestiques.
© *https://www.plateforme-esa.fr*

mifères et arthropodes. Cependant, toutes les souches ne se répliquent pas avec la même efficacité selon les différentes espèces de tiques. La réplication et la dissémination du virus chez la tique sont notamment deux facteurs permettant une transmission horizontale ou verticale de l'ASFV [22].

Le génome de l'ASFV a une taille comprise entre 170 et 193 kb et code pour 150 à 167 protéines [23]. Les différences de taille du génome sont notamment dues à un nombre variable de gènes de la famille des MGFs (*Multigenes Families*), qui ont évolué par des phénomènes de duplication de gènes [24, 25]. Le nombre de copies des gènes de la famille des MGF360 peut ainsi varier entre 11 et 18 suivant les différentes souches [26]. La particule virale mature a un diamètre d'environ 250 nm. Elle est composée d'une enveloppe lipidique externe, d'une capside à symétrie icosaédrique, d'une membrane et d'un core interne [27] (*figure 3*). L'ASFV fait partie des NCDLV (*nucleocytoplasmic large DNA viruses*), un groupe de virus qui se caractérise par un grand génome à ADNdb et une réplication nucléocytoplasmique. La réplication de l'ASFV est prin-

© John Libbey Eurotext, 2022

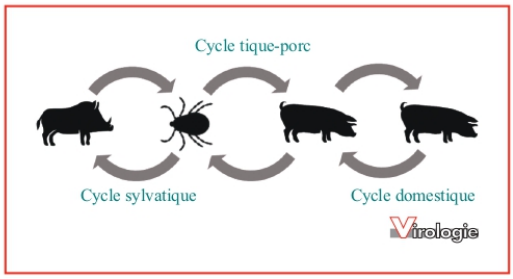


Figure 2. Modes de transmission du virus de la peste porcine africaine.

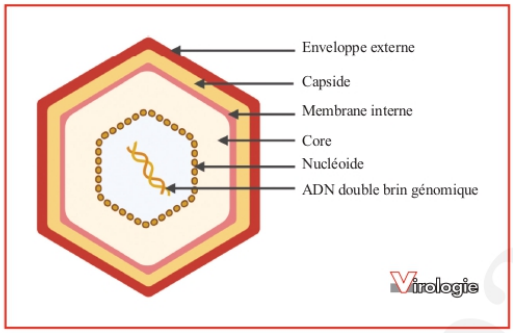


Figure 3. Structure du virus de la peste porcine africaine.

cipalement cytoplasmique bien qu'une synthèse d'ADN viral semble également possible dans le noyau au cours des phases précoces de réplication [28, 29].

Les cellules cibles de l'ASFV chez les vertébrés sont les macrophages et les monocytes même s'il semble que d'autres types cellulaires puissent être aussi infectés durant les stades plus avancés de la maladie [30]. L'entrée virale s'effectue par un mécanisme de macropinocytose ou d'endocytose dépendante de la clathrine et de la dynamine. En revanche, le récepteur d'entrée reste à ce jour inconnu [28]. La protéine CD163 a été pendant un temps considérée comme le récepteur d'entrée de l'ASFV [31], bien qu'il a été montré par la suite *in vivo* que son absence n'induisait pas de résistance des porcs face au virus [32]. Le virus progresse au sein de la cellule en utilisant la voie des endosomes. Au niveau des compartiments endosomaux matures, l'acidification induit la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane endosomale conduisant ensuite à la décapsidation du virus [33]. Après la libération de l'ADN viral dans le cytoplasme, la synthèse des ARNm précoces commence, en utilisant notamment les enzymes présentes dans le core du virus. La réplication du virus se fait à proximité des usines virales, dans lesquelles les nouveaux virions sont ensuite assemblés. Ils bourgeonnent alors au niveau de la membrane plasmique par exocytose ou par la formation de corps apoptotiques [28].

La réplication virale au sein des macrophages constitue un véritable défi pour l'ASFV. En effet, il a été montré que ces cellules, lorsqu'elles sont infectées, produisent différents facteurs de la famille des ROS (*reactive oxygen species*) [34]. Ces derniers sont impliqués dans le déclenchement du stress oxydatif et conduisent à la mise en place d'un environnement très oxydant et défavorable à la réplication virale [35]. Ces facteurs peuvent induire des dommages à l'ADN et des mutations et ainsi altérer la réplication virale [36]. Pour maintenir l'intégrité de son génome, l'ASFV a ainsi évolué pour coder différentes enzymes impliquées dans les systèmes de réparation de l'ADN, comme une ADN polymérase X faisant partie d'un système de réparation par excision de base, une ADN ligase de type I, ainsi qu'une endonucléase de type AP (apurinic/apyrimidinic) [37]. De plus, l'ASFV code pour la protéine A238L, qui est capable d'inhiber la génération de ROS lors de l'infection virale [38].

Les vaccins

Il n'existe actuellement aucun traitement antiviral efficace contre l'ASFV. Les mesures sanitaires drastiques constituent le seul moyen de contrôle pour freiner la propagation du virus. Néanmoins, plusieurs équipes de recherche tentent de mettre au point de nouvelles approches vaccinales contre l'ASFV. À l'inverse des vaccins vivants atténués [39], les vaccins inactivés [40, 41], les vaccins sous-unitaires exprimant les protéines p72, p54, p30 et p12, et les vaccins vectorisés utilisant les adénovirus ou poxvirus [42] se sont révélés relativement inefficaces pour protéger les porcs de la maladie. Les vaccins vivants peuvent être obtenus à partir de souches naturellement atténuées ou à partir de souches virulentes atténuées artificiellement, conduisant principalement à des délétions de gènes impliqués dans la virulence (*tableau 1*). Différentes souches naturellement atténuées ont été isolées chez des animaux infectés, comme la souche OURT88/3 isolée chez une tique *Ornithodoros erraticus* au Portugal, la souche NH/P68 isolée à partir d'un porc infecté de façon chronique ou la souche Lv17/WB/Rie1, isolée en Lettonie [43] et dérivée d'une souche virulente d'origine géorgienne. Si ces vaccins semblent se montrer relativement efficaces, il n'existe aucune protection croisée entre les différentes souches d'ASFV. De plus, certains animaux peuvent développer une forme chronique de la maladie à la suite d'une vaccination par des souches naturellement atténuées [44, 45]. Enfin, certaines souches trop

© John Libbey Eurotext, 2022

Tableau 1 La délétion de certains facteurs de virulence entraîne une atténuation de la souche. Ces souches atténuées confèrent une protection chez le porc lors d'une épreuve virulente.

Gène délété	Fonction du gène délété	Souche parentale	Souche du challenge	Protection chez porc	Référence
I177L	Inconnue	Georgia 2007/1	Georgia 2007/1	Oui	[55, 57]
9GL				Partielle	[65]
		Malawi Lil-20/1	Malawi Lil-20/1	Oui	[101]
A137R	Inhibition voie IFN	Georgia 2007/1	Georgia 2007/1		[102]
DP71L	Phosphatase	Malawi Lil-20/1 Pretoriuskop/96/4	/	Non	[103]
MGF505-1R-2R-3R / MGF360-12L-13L-14L	Inhibition voie IFN	Georgia 2007/1	Georgia 2007/1	Oui	[65]
I226R		SY18	SY18		[104]
L7L-L8L-L10L-L11L	Inconnue				[105]
MGF505-1R/2R/3R-MGF360-12L/13/14L-EP402R	Inhibition voie IFN / Hémadsorption	HLJ/18	HLJ/18		[106]
DP96R / DP71L / 9GL	Inhibition voie IFN / Inconnue	Georgia 2007/1	/	Non	[107]
EP402R	Hémadsorption	Ba71V	Ba71V/E75/Georgia 2007	Oui	[108]
		Georgia 2010	Georgia 2010	Non	[109]
DP148R	Inconnue	Benin 97/1	Benin 97/1	Oui	[48]
9GL / DP96R	Inconnue / Inhibition voie IFN	Georgia 2007/1	Georgia 2007/1		[110]
MGF505-1R-2R-3R / MGF360-10L-11L-12L-13L-14L	Inhibition voie IFN	Benin 97/1	Benin 97/1		[64]
A238L	Régulateur NFAT	NH/P68	L60	Oui	[46]
			Armenia 07	Non	
EP153R	Inhibe apoptose		L60	Oui	
			Armenia 07	Non	
A276R	Inhibe voie IFN		Armenia 07	Non	
A224L	Inhibe apoptose		L60	Oui	
			Armenia 07	Partielle	
TK	Thymidine kinase	Georgia 2007 adaptée aux aux cellules Vero	Georgia 2007 adaptée	Non	[111]

atténuées ne sont plus immunogènes ou d'autres retrouvent leur virulence [46, 47]. En résumé, un bon candidat vaccin doit induire une protection croisée pour plusieurs souches, voire plusieurs génotypes, et garder une certaine aptitude à se répliquer pour être immunogène. Or, la délétion d'un même gène ne conduit pas forcément à la même atténuation et/ou n'induit pas la même protection chez les porcs en fonction des souches [39]. Par exemple, la délétion du gène DP148R atténue la souche Benin 97/1 [48] alors qu'elle n'a aucun impact sur la virulence de la souche Georgia 2007 [49].

Une particularité des vaccins notamment vétérinaires est l'existence de vaccins DIVA (*Differentiating infected from vaccinated animals*), permettant la distinction entre animaux simplement vaccinés et animaux infectés. Cette stratégie « DIVA » serait particulièrement intéressante pour le contrôle réglementé de la PPA qui touche des espèces animales sauvages et domestiques. Par exemple, la souche atténuée ASFV-G-ΔE184L serait un bon candidat vaccin DIVA car la délétion du gène E184L pourrait être vérifiée simplement à l'aide d'un test de diagnostic sérologique permettant la distinction entre un animal vacciné et un animal infecté [50].

Enfin, un des critères limitants pour la production de souches vaccinales est le manque de lignées cellulaires essentielles à la production à grande échelle du vaccin, l'ASFV se répliquant uniquement dans des cellules primaires telles que les macrophages alvéolaires porcins. Il semble difficile d'utiliser ces cellules primaires pour la production de vaccins en raison de la grande variabilité des lots, de la difficulté à les extraire et du bien-être animal [51]. Certaines souches d'ASFV ont été adaptées à une culture sur cellules Vero et HEK-293 mais ces souches se sont révélées trop atténuées et peu immunogènes pour induire une protection efficace chez les porcs [52, 53]. Cependant, il a été récemment montré que le candidat vaccin issu de la souche virulente Georgia 2010 délétée du gène I177L (ASFV-G-ΔI177L/ΔLVR) semble pouvoir se répliquer efficacement dans une lignée cellulaire porcine PIPEC *(Plum Island porcine epithelial cells)* [54].

En juin 2022, les autorités vietnamiennes ont annoncé avoir autorisé la mise sur le marché du premier vaccin contre la PPA. Ce vaccin vivant atténué est dérivé de la souche Georgia 2007 et se caractérise par une délétion du gène I177L (ASFV-G-ΔI177L). Il a été montré que ce vaccin induisait une protection efficace chez le porc contre une infection

© John Libbey Eurotext, 2022

par la souche parentale [55] mais aussi contre des souches circulant en Europe et au Vietnam [56]. Il est aussi efficace après une administration par voie intramusculaire ou oronasale [57] et serait stable génétiquement [58]. Paradoxalement, la fonction du gène I177L reste méconnue. À l'avenir, il serait donc intéressant d'étudier à la fonction de ce gène et comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de cette atténuation.

La réponse interféron de type I

L'immunité innée constitue la première ligne de défense contre l'intrusion d'un pathogène, notamment lors d'une infection virale, et repose principalement sur le déclenchement de la réponse interféron de type I (IFN-I). Elle s'appuie sur la reconnaissance de motifs moléculaires spécifiques, les PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*), par des récepteurs membranaires ou des senseurs cytoplasmiques appelés PRRs (*pattern recognition receptors*). En réponse à une infection virale, cette reconnaissance aboutit à une production de glycoprotéines immunomodulatrices appelés IFN-I (principalement IFN-α/β). Il existe différents types de PRRs qui se distinguent par leur capacité à identifier des motifs peptidiques ou nucléiques particuliers. Parmi ceux-ci, le facteur cellulaire cGAS, qui reconnaît les ADNdb présents dans le cytosol, représente l'un des principaux senseurs activés en réponse à l'infection par l'ASFV [59]. Son activation est déclenchée par la reconnaissance d'un ADNdb cytosolique par cGAS qui, s'autoactive et synthétise un messager secondaire appelé 2'3'-cGAMP. Ce dernier va alors se fixer sur l'adaptateur STING qui est ancré au niveau du réticulum endoplasmique. STING change alors de conformation et recrute différentes kinases telles que IKKε et TBK1 qui phosphorylent le facteur de transcription IRF3. Cela aboutit *in fine* à la translocation nucléaire de ce dernier. De plus, le complexe IKK composé d'IKKα, IKKβ et NEMO, phosphoryle IkBα pour induire sa dégradation et la translocation nucléaire subséquente du facteur de transcription NFkB. Tous ces événements aboutissent à la synthèse d'IFNα/β mais également de cytokines pro-inflammatoires.

Les IFNα/β diffusent dans le milieu extracellulaire et vont à leur tour se lier à leur récepteur IFNAR alors à l'état monomérique. Cette liaison entraîne la dimérisation de celui-ci en hétérodimère IFNAR-1 et IFNAR-2, ainsi qu'un changement conformationnel aboutissant à l'activation des protéines kinases TYK2 et JAK1. Celles-ci vont alors phosphoryler les protéines STAT-1 et STAT-2, provoquant leur dimérisation. Cela aboutit à la translocation nucléaire de ce complexe protéique associé à la protéine IRF9, qui se fixe sur le promoteur ISRE (*IFN-stimulated response element*) pour induire l'expression de multiples gènes appelés *ISGs* (*Interferon stimulated genes*). Ces ISGs codent pour de nombreux effecteurs antiviraux, des cytokines immunomodulatrices, mais aussi des composants de cette voie de l'IFN-I, ce qui permet alors une amplification de cette réponse.

Échappement de la réponse IFN-I par l'ASFV

Pour assurer leur réplication, les virus ont développé de multiples stratégies pour échapper à la réponse immunitaire innée, notamment en inhibant la voie de l'IFN-I. L'ASFV n'échappe pas à la règle et nous décrirons dans cette revue comment ce virus au travers de ses nombreux facteurs de virulence a évolué pour résister à la réponse IFN-I mise en place par l'hôte. Plusieurs études *in vitro* ont montré que les macrophages infectés par des souches atténuées induisent une expression plus importante d'IFN-I comparée aux souches virulentes [60]. De plus, ces mêmes cellules prétraitées à l'IFNα deviennent moins permissives à l'infection par des souches atténuées mais restent tout à fait sensibles à l'infection par des souches virulentes [61]. Ces dernières semblent donc posséder des facteurs de virulence capables d'inhiber la voie IFN-I. En particulier, les gènes de la famille des MGFs semblent jouer un rôle majeur dans la subversion de cette voie. La souche naturellement atténuée OURT88/3 se distingue d'ailleurs des souches virulentes par l'absence de huit gènes de la famille des MGF360 ou MGF505 (MGF360-10L, 11L, 12L, 13L, 14L, MGF505-1R, 2R, 3R) [62, 63]. D'autres souches décrites comme étant pas ou peu virulentes chez le porc [64, 65] se caractérisent aussi par des délétions de gènes au niveau des MGF360 et MGF505 et leur réplication dans les macrophages est également associée à une importante production d'IFN-I [66, 67]. Par ailleurs, la délétion des gènes de la famille des MGF360 peut être aussi associée à une réduction de la réplication de l'ASFV chez la tique *Ornithodoros porcinus* [68]. En résumé, les gènes MGF codent ainsi pour des protéines multifonctionnelles capables d'inhiber à la fois la réponse IFN-I chez ses hôtes mammifères mais seraient également essentiels pour assurer la réplication virale chez la tique, faisant d'eux des déterminants viraux importants du spectre d'hôtes.

L'ASFV a évolué pour développer de multiples stratégies d'échappement à la réponse IFN-I. Un grand nombre des protéines codées par ce virus ont été montrées dans la littérature pour inhiber les différentes étapes de la voie de l'IFN-I (*figure 4*). L'ensemble des actions portées par ces facteurs de virulence est présenté de manière exhaustive dans le *tableau 2*.

© John Libbey Eurotext, 2022

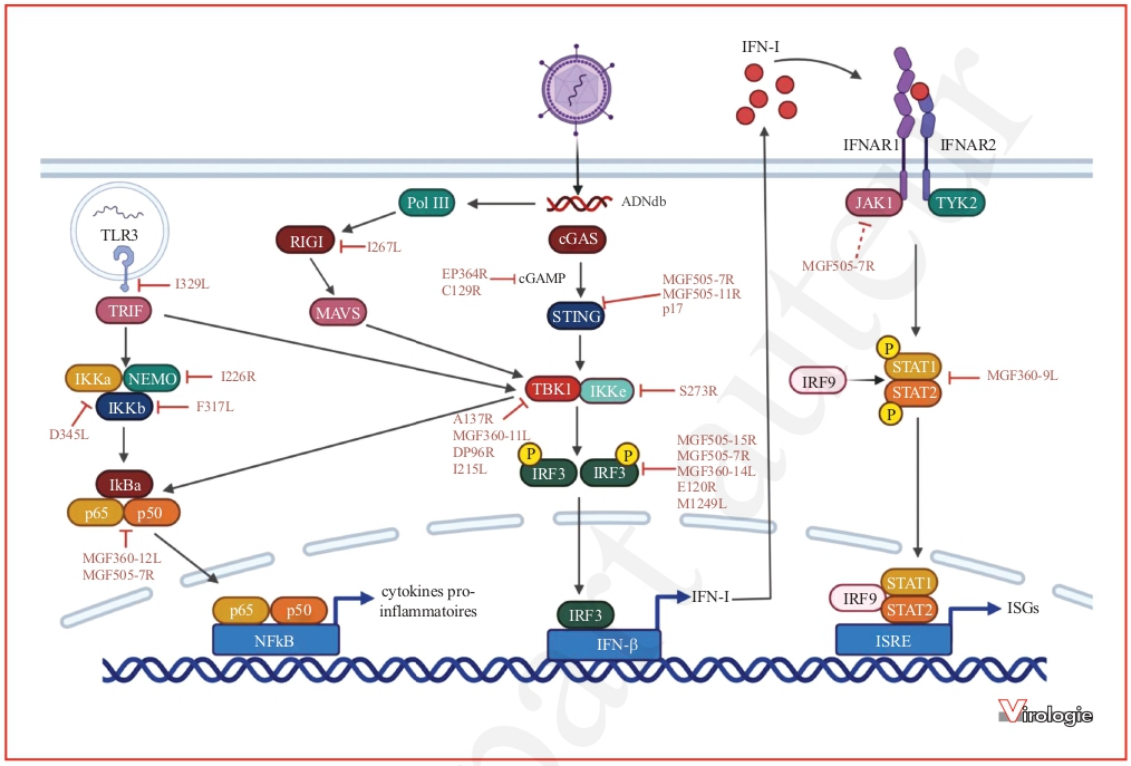


Figure 4. Les protéines d'ASFV inhibent la voie IFN à différents niveaux.

La première stratégie développée par l'ASFV consiste à bloquer l'action des PRRs pour éviter la reconnaissance du génome viral. Le génome de l'ASFV contient certaines régions riches en AT, qui peuvent être reconnus par l'ARN polymérase ADN dépendante III (Pol-III). Les ADNs ainsi transcrits peuvent être ensuite détectés par RIG-I, aboutissant au déclenchement de la synthèse d'IFN-I. Or, il a été montré que la protéine I267L interagit avec l'E3-ubiquitine ligase Riplet, ce qui empêche la polyubiquitination et l'activation subsidiaire de RIG-I par Riplet. Une souche d'ASFV délétée d'I267L induit d'ailleurs un haut niveau d'IFNβ dans les macrophages alvéolaires par rapport à la souche parentale, et atténue la pathogénicité du virus *in vivo* [69]. Une autre protéine d'ASFV, I329L, partage des homologies structurales avec TLR3 (*toll like receptor 3*), un récepteur reconnaissant les ARNs double brin (ARNdb) au sein des endosomes. Une analyse bioinformatique a en effet montré que I329L est une protéine transmembranaire très glycosylée, composée notamment d'un domaine extracellulaire contenant quatre répétitions riches en leucine (LRR, *leucine rich repeats*), une caractéristique conservée au sein des TLRs [70]. Il inhibe l'activation de NFκB et d'IRF3 induite par de l'ARN double brin ou du LPS, induisant une inhibition de l'activation d'IFNβ, tandis que la surexpression de TRIF réverse l'effet inhibiteur d'IRF3 [71]. Actuellement, il n'a pas encore été décrit une inhibition directe de cGAS par l'ASFV, bien que celui-ci soit, à ce jour, le senseur principalement décrit dans la littérature pour détecter une infection par ASFV. Cependant, il a été récemment montré que deux protéines virales, EP364R et C129R sont capables d'inhiber le 2',3'-cGAMP en interagissant avec lui et en le clivant [72]. Il y a notamment, une homologie de séquence entre EP364R et STING correspondant au motif de liaison au 2',3'-cGAMP. EP364R entre donc en compétition avec STING pour se lier au 2',3'-cGAMP [72]. De plus, la protéine MGF505-7R (aussi appelée A528R) est capable d'interagir avec STING, qui a sa fonction étroitement liée à celle de cGAS. En interagissant avec STING et ULK1, une protéine cellulaire impliquée dans l'autophagie, MGF505-7R induit la phosphorylation de STING conduisant *in fine* à sa dégradation *via* l'autophagie [73]. De plus, la protéine virale p17 interagit aussi avec STING, pouvant empêcher ainsi son recrutement par IKKε et TBK1 [74].

© John Libbey Eurotext, 2022

Tableau 2 Les mécanismes d'inhibition de la voie IFN par les protéines de l'ASFV.

Protéine	Voie	Mécanisme d'inhibition	Référence
MGF360-12L	Induction IFN-I	Inhibe translocation nucléaire de NFkB en bloquant son interaction avec l'importine α	[82]
MGF360-15R	Induction IFN-I	Cible IRF3	[112]
MGF505-7R = A528R	Induction IFN-I	Interagit avec IRF3 et inhibe sa translocation nucléaire	[73]
	Induction IFN-I	Interagit avec IKKα et inhibe la formation de NFkB	
	Induction IFN-I	Interagit avec STING et ULK1. ULK1 qui phosphoryle STING et induit sa dégradation par la voie de l'autophagie	
	Induction IFN-I	Cible l'activation et la translocation nucléaire de p65	[113]
	Réponse à l'IFNγ	Interagit avec JAK1 et JAK2. Interagit avec l'E3 ubiquitine ligase RNF125 ce qui induit dégradation de JAK1 ainsi qu'avec le facteur de transcription Hes5 ce qui diminue expression de JAK2	[84]
MGF360-14L	Induction IFN-I	Interagit avec IRF3 et induit son ubiquitination via l'E2 ubiquitine ligase TRIM21	[78]
MGF360-11L	Induction IFN-I	Interagit avec TBK1 et IRF7 et induit leur dégradation via les voies de l'autophagie, du protéasome et des lysosomes	[88]
MGF505-11R	Induction IFN-I	Interagit avec STING et induit sa dégradation via les voies de l'autophagie, du protéasome, et des lysosomes	[89]
MGF360-9L	Réponse à IFN-I	Interagit avec STAT1 et STAT2 et induit leur dégradation via voie ubiquitine-protéasome	[83]
I329L	Induction IFN-I	Homologue TLR3, inhibe l'activation de NFkB et IRF3	[71, 112]
DP96R	Induction IFN-I	Diminue l'expression de TBK1	[114]
E120R	Induction IFN-I	Interagit avec IRF3 et bloque son recrutement par TBK1.	[79]
I215L	Induction IFN-I	Interagit avec l'ubiquitine ligase RNF138 ce qui inhibe la polyubiquitination de TBK1	[76]
A137R	Induction IFN-I	Interagit avec TBK1 et induit sa dégradation via la voie de l'autophagie	[115]
S273R	Induction IFN-I	Interagit avec IKKe et altère sa sumoylation nécessaire à son interaction avec STING	[75]
I267L	Induction IFN-I	Interagit avec l'E3 ubiquitine ligase Riplet, ce qui empêche l'activation de RIGI	[69]
F317L	Induction IFN-I	Interagit avec IKKβ, ce qui empêche sa phosphorylation et induit une accumulation d'IKbα aboutissant et à l'inhibition de la translocation nucléaire de NFkB	[80]
I226R	Induction IFN-I	Induit la dégradation de NEMO par la voie du protéasome	[81]
pD345L	Induction IFN-I	Interagit avec IKKα et IKKβ ce qui inhibe l'activation d'IκBα	[116]
M1249L	Induction IFN-I	Interagit avec IRF3 et induit sa dégradation via la voie des lysosomes	[117]
p17	Induction IFN-I	Interagit avec STING et empêche le recrutement de TBK1 et IKKε	[74]
EP364R	Induction IFN-I	Interagit avec 2', 3'-cGAMP	[72]
C129R	Induction IFN-I	Interagit avec 2', 3'-cGAMP	

En aval des PRRs, il a été montré que plusieurs protéines de l'ASFV sont capables d'inhiber TBK1 et IKKε, deux kinases communément induites en aval de cGAS, TLR3 et RIG-I. Jusqu'à présent, seule la protéine S273R a été décrite pour inhiber IKKε. Cette protéine inhibe la voie cGAS-STING en interagissant avec IKKε et l'empêchant ainsi d'interagir avec STING. L'activité enzymatique de S273R semble ainsi altérer la sumoylation d'IKKε nécessaire à son interaction avec STING [75]. Au contraire d'IKKε, de nombreuses protéines d'ASFV sont connues pour inhiber TBK1

© John Libbey Eurotext, 2022

(A137R, MGF360-11L, DP96R, I215L) et différents mécanismes ont été décrits. Par exemple, I215L interagit avec l'ubiquitine ligase RNF138 pour bloquer la polyubiquitination de TBK1 nécessaire à son activation [76]. L'absence de I215L au sein de la souche HLJ/18 induit une augmentation de la production d'IFNβ aboutissant à une diminution de la réplication virale [76].

Le facteur de transcription IRF3 joue un rôle central dans la régulation de l'expression du gène codant l'IFNβ. De ce fait, il est la cible de nombreuses protéines d'ASFV (MGF505-7R, MGF360-14L, M1249L, E120R, MGF505-15R). Différentes protéines d'ASFV ont à ce jour été montrées comme capables de cibler IRF3, l'inhibant avec différents mécanismes. Par exemple, MGF505-7R interagit avec IRF3 et bloque sa translocation nucléaire, [77]. MGF360-14L interagit aussi avec IRF3 et promeut son ubiquitination grâce à l'E3 ubiquitine ligase TRIM21 [78]. IRF3 est aussi la cible de E120R, une protéine structurale associée à la capside virale qui, au travers de cette interaction portée par ses résidus 72 et 73, bloque le recrutement d'IRF3 par TBK1. En contexte infectieux (souche CN/GS/2018), la délétion de ces résidus au sein de E120R induit une perte de l'interaction avec IRF3, augmente la production d'IFNβ et l'expression de plusieurs ISGs dans les macrophages alvéolaires infectés [79].

L'ASFV est aussi capable d'inhiber un autre facteur de transcription, NFκB, impliqué également dans la régulation de l'expression du gène codant l'IFNβ mais aussi de plusieurs cytokines pro-inflammatoires. Différents mécanismes ont été décrits, ciblant soit le complexe tripartite IKKα/IKKβ/NEMO, IκBα ou directement NFκB. Par exemple, la protéine F317L interagit avec IKKβ pour empêcher son activation au travers de sa phosphorylation. Ce blocage a pour conséquence directe de stabiliser et d'accumuler IkBα au niveau de NFκB, empêchant ainsi sa translocation nucléaire [80]. Autres exemples, la protéine I226R est capable d'induire la dégradation de NEMO *via* le protéasome [81] tandis que MGF360-12L inhibe la translocation nucléaire de NFκB en bloquant son interaction avec l'importine α [82].

Très peu de protéines d'ASFV sont capables d'inhiber la voie de réponse à l'IFN-I, en aval des récepteurs IFNAR-1 et -2. L'ASFV a toutefois développé plusieurs stratégies permettant d'éviter la transcription des ISGs, comme ceux responsables de l'amplification de la réponse IFN-I (RIG-I, MDA5, IRF7…) ou d'autres (IFITM, ISG15, MxA…) impliqués directement dans la réponse antivirale. La protéine MGF360-9L par exemple, est la seule protéine décrite à ce jour pour interagir à la fois avec STAT1 et STAT2 et induire leur dégradation par la voie de l'ubiquitine-protéasome [83]. De plus, la protéine MGF505-7R est capable d'interagir avec JAK1 et JAK2, ce qui a pour conséquence d'inhiber la voie de réponse à l'IFNγ [84]. Il reste cependant à démontrer que cette interaction avec JAK1 puisse avoir aussi une action sur la voie de réponse à l'IFN-I. MGF505-7R interagit aussi avec RNF125, une E3 ubiquitine ligase, induisant la dégradation de JAK1 ; ainsi qu'avec le facteur de transcription Hes5 aboutissant à la diminution de l'expression de JAK2 [84].

L'ASFV est sensible aux protéines IFITM (*Interferon-induced transmembrane*) et à la protéine MxA. Les IFITM2 et 3 semblent impacter l'entrée du virus et sa décapsidation [85] tandis que MxA inhibe la réplication de l'ASFV au niveau des sites périnucléaires d'assemblage du virus [86]. Pour échapper à l'action de ces protéines antivirales et éviter la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative efficace, l'ASFV code pour plusieurs protéines capables de bloquer la production d'ISGs et certaines cytokines pro-inflammatoires. Par exemple, l'absence de MGF360-12L au sein de la souche Georgia 2007/1 augmente l'expression de CXCL10 et celle-ci est concomitante avec la réduction de la réplication virale observée dans les macrophages [87]. Enfin, MGF360-11L inhibe la production d'IL-1β et d'IL-6 dans les macrophages alvéolaires infectés [88], tandis que la sur-expression de la protéine MGF505-11R semble inhiber l'ISG15 et l'ISG56 [89]. Cependant, aucun mécanisme explicatif n'a été décrit à ce jour, et ces expressions réduites de certaines de ces ISGs et cytokines pourraient être seulement la résultante d'une inhibition plus globale de la voie de réponse à l'IFN-I.

Modulation de l'apoptose par l'ASFV : une autre stratégie pour échapper à la réponse antivirale de l'hôte

L'apoptose peut être déclenchée en réponse à l'activation de l'immunité innée lors d'une infection. De nombreux virus sont capables de moduler les différentes voies cellulaires responsables de la mort cellulaire programmée, comme l'apoptose, la pyroptose et la nécrose. L'apoptose, notamment, peut être subvertie de différentes façons. La destruction des cellules infectées est l'une des voies majeures de lutte contre les infections, l'inhibition de l'apoptose est donc une étape primordiale du cycle pour de nombreux virus. Cependant, certains virus détournent aussi l'apoptose pour tuer les cellules du système immunitaire ou pour favoriser la lyse des cellules infectées, favorisant ainsi la dissémination virale [90]. Dans le cas de l'ASFV, le virus semble en général pirater l'apoptose pour augmenter la survie cellulaire favorisant ainsi la réplication du virus dans la cellule infectée. À l'inverse, et une fois la réplication effectuée, l'apoptose est induite par l'ASFV

© John Libbey Eurotext, 2022

pour permettre notamment le recrutement des phagocytes, qui sont des cellules cibles du virus [91]. Pourtant, il a été décrit que lors de l'infection par l'ASFV, l'apoptose peut être induite dans les stades précoces de l'entrée virale, sans nécessiter la synthèse protéique ni la réplication du génome [92]. Les mécanismes de déclenchement de l'apoptose sont dépendants à la fois de la voie mitochondriale mais aussi de celle liée au stress du réticulum endoplasmique [93]. Plusieurs protéines de l'ASFV ont été ainsi décrites comme anti-apoptotiques (A179L, A224L, DP71L, E199L et EP153R) tandis que E183L est pro-apoptotique [94].

La protéine A179L partage des homologies structurales avec les protéines cellulaires de la famille des Bcl-2 [95] et celle-ci est très conservée au sein des différentes souches d'ASFV. Elle est capable d'inhiber l'apoptose en se liant à des protéines pro-apoptotiques cellulaires telles que Bid ou Bax grâce à son domaine BH1 [96, 97]. La protéine A224L est un analogue de la famille des inhibiteurs de l'apoptose (IAP, *inhibitor of apoptosis*). Elle inhibe l'activité de la caspase 3 en interagissant avec son fragment protéolytique [98]. De plus, le stress cellulaire induit par une infection virale peut aboutir à la phosphorylation d'eIF2α, aboutissant ainsi à une diminution de la synthèse globale des protéines cellulaires. Son activation provoque également l'induction de l'apoptose et constitue ainsi une forme de défense antivirale contre les infections, puisque cela permet d'éviter que trop de particules virales ne soient produites. Or, la protéine DP71L, codée par le gène *NL*, recrute une phosphatase (PP1), permettant de déphosphoryler le facteur d'initiation de la traduction eIF2α, pour empêcher son activation et restaurer par la même occasion la synthèse protéique globale de la cellule [99]. Au contraire, la protéine virale p54, codée par le gène E183L, interagit avec la DLC8 (*8-kDa light chain cytoplasmic dynein*), induisant ainsi l'activation de la caspase 3 et de la caspase 9, et donc de l'apoptose [100].

Conclusion

ASFV est un grand virus à ADN double brin, qui code pour de nombreux facteurs de virulence pour subvertir la réponse immunitaire innée induite par l'infection. L'ASFV a évolué pour inhiber la réponse de l'hôte à l'aide de multiples stratégies pouvant bloquer la réponse IFN-I à de différents niveaux : au stade des PRRs, au niveau des composants de la voie de l'IFN-I, des facteurs de transcription ou encore les effecteurs antiviraux. Nous avons vu aussi que la modulation de l'apoptose est aussi une stratégie développée par l'ASFV pour échapper à une certaine forme de réponse antivirale. À l'avenir, il serait donc intéressant d'approfondir nos connaissances sur les autres voies de signalisation cellulaires également piratées par l'ASFV et d'évaluer leurs éventuelles conséquences sur la réponse antivirale de l'hôte.

Comme observé pour d'autres virus, plusieurs interacteurs cellulaires sont communément ciblés par différentes protéines d'ASFV, traduisant une pression évolutive sur ce virus, qui la conduit à évoluer pour coder pour plusieurs antagonistes afin d'assurer un blocage optimal de la réponse IFN-I. Un nombre significatif d'entre elles ont notamment été décrites comme interagissant avec TBK1 ou IRF3, suivant des mécanismes parfois distincts. Cette certaine redondance des interactions peut s'expliquer par le fait que TBK1 et IRF3 sont des protéines centrales dans l'activation de la voie IFN-I, que ce soit en aval de cGAS-STING, TLR3 ou de RIG-I. Au contraire, certaines protéines virales ont aussi des actions multiples, comme la protéine virale MGF505-7R (ou A528R) qui est capable d'inhiber la voie de l'IFN-I à différents stades et d'interagir avec de multiples protéines cellulaires (STING, IRF3, p65, JAK1, JAK2). La majorité des mécanismes d'échappement décrits concernent la voie d'induction de l'IFN-I et non celle de réponse à l'IFN-I. Est-ce le reflet de la réalité ou est-ce simplement due au fait que la voie de réponse à l'IFN-I ait moins été étudiée jusqu'à présent ? En dépit du fait qu'il y ait de plus en plus de données dans la littérature, les détails moléculaires sous-jacents expliquant les mécanismes d'échappement à la réponse IFN-I, notamment en termes d'interactions protéines-protéines, restent méconnus. Pourtant, comprendre ces mécanismes est primordial pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et développer de nouvelles voies d'atténuation pour l'ASFV, ce qui permettrait *in fine* de générer de nouveaux vaccins atténués.

Remerciements : Juliette Dupré est financée par une bourse de thèse Anses-Inrae. Ce travail a été soutenu par un financement de l'Icrad, un programme de recherche et d'innovation Horizon 2020 de l'Union européenne (ERA-NET), convention de subvention n° 862605.

Liens d'intérêt : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Montgomery RE. On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony). *J Comp Pathol Ther* 1921 ; 34 : 159-91.

2. Jori F, Vial L, Penrith ML, *et al*. Review of the sylvatic cycle of African swine fever in sub-Saharan Africa and the Indian ocean. *Virus Res* 2013 ; 173(1) : 212-27.

3. Blome S, Gabriel C, Beer M. Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar. *Virus Res* 2013 ; 173(1) : 122-30.

4. Sánchez-Vizcaíno JM, Mur L, Gomez-Villamandos JC, Carrasco L. An update on the epidemiology and pathology of African swine fever. *J Comp Pathol* 2015 ; 152(1) : 9-21.

© John Libbey Eurotext, 2022

5. Salguero FJ. Comparative pathology and pathogenesis of African swine fever infection in swine. *Front Vet Sci* 2020 ; 7 : 282.

6. Andreani J, Khalil JYB, Sevvana M, *et al*. Pacmanvirus, a new giant icosahedral virus at the crossroads between asfarviridae and faustoviruses. *J Virol* 2017 ; 91(14) : e00212-217.

7. Reteno DG, Benamar S, Khalil JB, *et al*. Faustovirus, an asfarvirus-related new lineage of giant viruses infecting amoebae. *J Virol* 2015 ; 89(13) : 6585-94.

8. Mulumba-Mfumu LK, Saegerman C, Dixon LK, *et al*. African swine fever: update on eastern, central and southern Africa. *Transbound Emerg Dis* 2019 ; 66 : 1462-80.

9. Caiado JM, Boinas FS, Louza AC. Epidemiological research of African swine fever (ASF) in Portugal: the role of vectors and virus reservoirs. *Acta Vet Scand* 1988 ; 84 : 136-8.

10. Boinas FS, Wilson AJ, Hutchings GH, Martins C, Dixon LJ. The persistence of African swine fever virus in field-infected Ornithodoros erraticus during the ASF endemic period in Portugal. *PLoS One* 2011 ; 6(5) : e20383.

11. Laddomada A, Rolesu S, Loi F, *et al*. Surveillance and control of African Swine Fever in free-ranging pigs in Sardinia. *Transbound Emerg Dis* 2019 ; 66(3) : 1114-9.

12. Rowlands RJ, Michaud V, Heath L, *et al*. African swine fever virus isolate, Georgia, 2007. *Emerg Infect Dis* 2008 ; 14(12) : 1870-4.

13. You S, Liu T, Zhang M, *et al*. African swine fever outbreaks in China led to gross domestic product and economic losses. *Nat Food* 2021 ; 2(10) : 802-8.

14. Guinat C, Reis AL, Netherton CL, Goatley L, Pfeiffer DU, Dixon L. Dynamics of African swine fever virus shedding and excretion in domestic pigs infected by intramuscular inoculation and contact transmission. *Vet Res* 2014 ; 45 : 93.

15. Guinat C, Gogin A, Blome S, *et al*. Transmission routes of African swine fever virus to domestic pigs: current knowledge and future research directions. *Vet Rec* 2016 ; 178(11) : 262-7.

16. Kleiboeker SB, Scoles GA. Pathogenesis of African swine fever virus in Ornithodoros ticks. *Anim Health Res Rev* 2001 ; 2(2) : 121-8.

17. Plowright W, Perry CT, Peirce MA, Parker J. Experimental infection of the argasid tick, Ornithodoros moubata porcinus, with African swine fever virus. *Arch Gesamte Virusforsch* 1970 ; 31(1) : 33-50.

18. Pérez-Sánchez R, Astigarraga A, Oleaga-Pérez A, Encinas-Grandes A. Relationship between the persistence of African swine fever and the distribution of Ornithodoros erraticus in the province of Salamanca, Spain. *Vet Rec* 1994 ; 135(9) : 207-9.

19. Kleiboeker SB, Burrage TG, Scoles GA, Fish D, Rock DL. African swine fever virus infection in the argasid host, Ornithodoros porcinus porcinus. *J Virol* 1998 ; 72(3) : 1711-24.

20. Plowright W, Perry CT, Greig A. Sexual transmission of African swine fever virus in the tick, Ornithodoros moubata porcinus, Walton. *Res Vet Sci* 1974 ; 17(1) : 106-13.

21. Hess WR, Endris RG, Lousa A, Caiado JM. Clearance of African swine fever virus from infected tick (Acari) colonies. *J Med Entomol* 1989 ; 26(4) : 314-7.

22. Pereira De Oliveira R, Hutet E, Lancelot R, *et al*. Differential vector competence of Ornithodoros soft ticks for African swine fever virus: what if it involves more than just crossing organic barriers in ticks? *Parasit Vectors* 2020 ; 13 : 618.

23. Alonso C, Borca M, Dixon L, Revilla Y, Rodriguez F, Escribano JM, Ictv Report Consortium null. ICTV virus taxonomy profile: asfarviridae. *J Gen Virol* 2018 ; 99(5) : 613-4.

24. Zhu Z, Xiao C-T, Fan Y, *et al*. Homologous recombination shapes the genetic diversity of African swine fever viruses. *Vet Microbiol* 2019 ; 236 : 108380.

25. Netherton CL, Connell S, Benfield CTO, Dixon LK. The genetics of life and death: virus-host interactions underpinning resistance to African swine fever, a viral hemorrhagic disease. *Front Genet* 2019 ; 10 : 402.

26. Chapman DAG, Tcherepanov V, Upton C, Dixon LK. Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates. *J Gen Virol* 2008 ; 89(2) : 397-408.

27. Carrascosa JL, Carazo JM, Carrascosa AL, García N, Santisteban A, Viñuela E. General morphology and capsid fine structure of African swine fever virus particles. *Virology* 1984 ; 132(1) : 160-72.

28. Galindo I, Alonso C. African swine fever virus: a review. *Viruses* 2017 ; 9(5) : 103.

29. Simões M, Martins C, Ferreira F. Early intranuclear replication of African swine fever virus genome modifies the landscape of the host cell nucleus. *Virus Res* 2015 ; 210 : 1-7.

30. Fernandez A, Perez J, Carrasco L, Bautista MJ, Sanchez-Vizcaino JM, Sierra MA. Distribution of ASFV antigens in pig tissues experimentally infected with two different Spanish virus isolates. *Zentralblatt Vet Reihe B J Vet Med Ser B* 1992 ; 39(6) : 393-402.

31. Sánchez-Torres C, Gómez-Puertas P, Gómez-del-Moral M, *et al*. Expression of porcine CD163 on monocytes/macrophages correlates with permissiveness to African swine fever infection. *Arch Virol* 2003 ; 148 : 2307-23.

32. Popescu L, Gaudreault NN, Whitworth KM, *et al*. Genetically edited pigs lacking CD163 show no resistance following infection with the African swine fever virus isolate, Georgia 2007/1. *Virology* 2017 ; 501 : 102-6.

33. Hernáez B, Guerra M, Salas ML, Andrés G. African swine fever virus undergoes outer envelope disruption, capsid disassembly and inner envelope fusion before core release from multivesicular endosomes. *PLoS Pathog* 2016 ; 12(4) : e1005595.

34. Suzuki S, Kameoka M, Nakaya T, *et al*. Superoxide generation by monocytes following infection with human cytomegalovirus. *Immunopharmacology* 1997 ; 37(2-3) : 185-90.

35. Novoa RR, Calderita G, Arranz R, Fontana J, Granzow H, Risco C. Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol Cell* 2005 ; 97(2) : 147-72.

36. Redrejo-Rodríguez M, Salas ML. Repair of base damage and genome maintenance in the nucleo-cytoplasmic large DNA viruses. *Virus Res* 2014 ; 179 : 12-25.

37. Yáñez RJ, Rodríguez JM, Nogal ML, *et al*. Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus. *Virology* 1995 ; 208(1) : 249-78.

38. Granja AG, Sabina P, Salas ML, Fresno M, Revilla Y. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by viral A238L-mediated inhibition of p65/RelA acetylation and p300 transactivation. *J Virol* 2006 ; 80(2) : 10487-96.

39. Gladue DP, Borca MV. Recombinant ASF live attenuated virus strains as experimental vaccine candidates. *Viruses* 2022 ; 14 : 878.

40. Blome S, Gabriel C, Beer M. Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated African swine fever virus vaccine preparation. *Vaccine* 2014 ; 32 : 3879-82.

41. Cadenas-Fernández E, Sánchez-Vizcaíno JM, van den Born E, *et al*. High doses of inactivated african swine fever virus are safe, but do not confer protection against a virulent challenge. *Vaccines* 2021 ; 9 : 242.

42. Gaudreault NN, Richt JA. Subunit vaccine approaches for African swine fever virus. *Vaccines* 2019 ; 7 : E56.

© John Libbey Eurotext, 2022

43. Gallardo C, Soler A, Rodze I, *et al*. Attenuated and non-haemadsorbing (non-HAD) genotype II African swine fever virus (ASFV) isolated in Europe, Latvia 2017. *Transbound Emerg Dis* 2019 ; 66 : 1399-404.

44. Boinas FS, Hutchings GH, Dixon LK, Wilkinson PJ. Characterization of pathogenic and non-pathogenic African swine fever virus isolates from Ornithodoros erraticus inhabiting pig premises in Portugal. *J Gen Virol* 2004 ; 85 : 2177-87.

45. Leitão A, Cartaxeiro C, Coelho R, *et al*. The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for defining the protective anti-virus immune response. *J Gen Virol* 2001 ; 82 : 513-23.

46. Gallardo C, Sánchez EG, Pérez-Núñez D, *et al*. African swine fever virus (ASFV) protection mediated by NH/P68 and NH/P68 recombinant live-attenuated viruses. *Vaccine* 2018 ; 36 : 2694-704.

47. Abrams CC, Goatley L, Fishbourne E, *et al*. Deletion of virulence associated genes from attenuated African swine fever virus isolate OUR T88/3 decreases its ability to protect against challenge with virulent virus. *Virology* 2013 ; 443 : 99-105.

48. Reis AL, Goatley LC, Jabbar T, *et al*. Deletion of the African swine fever virus gene DP148R does not reduce virus replication in culture but reduces virus virulence in pigs and induces high levels of protection against challenge. *J Virol* 2017 ; 91 : e01428-1517.

49. Rathakrishnan A, Reis AL, Goatley LC, Moffat K, Dixon LK. Deletion of the K145R and DP148R genes from the virulent ASFV Georgia 2007/1 isolate delays the onset, but does not reduce severity, of clinical signs in infected pigs. *Viruses* 2021 ; 13 : 1473.

50. Ramirez-Medina E, Vuono E, Rai A, *et al*. Deletion of E184L, a putative DIVA target from the pandemic strain of African swine fever virus, produces a reduction in virulence and protection against virulent challenge. *J Virol* 2022 ; 96 : e0141921.

51. Meloni D, Franzoni G, Oggiano A. Cell lines for the development of African swine fever virus vaccine candidates: an update. *Vaccines* 2022 ; 10 : 707.

52. Krug PW, Holinka LG, O'Donnell V, *et al*. The progressive adaptation of a Georgian isolate of African swine fever virus to vero cells leads to a gradual attenuation of virulence in swine corresponding to major modifications of the viral genome. *J Virol* 2014 ; 89 : 2324-32.

53. Wang T, Wang L, Han Y, *et al*. Adaptation of African swine fever virus to HEK293T cells. *Transbound Emerg Dis* 2021 ; 68(5) : 2853-66.

54. Borca MV, Rai A, Ramirez-Medina E, *et al*. A cell culture-adapted vaccine virus against the current African swine fever virus pandemic strain. *J Virol* 2021 ; 95 : e0012321.

55. Borca MV, Ramirez-Medina E, Silva E, *et al*. Development of a highly effective African swine fever virus vaccine by deletion of the I177L gene results in sterile immunity against the current epidemic eurasia strain. *J Virol* 2020 ; 94 : e02017-2019.

56. Tran XH, Le TTP, Nguyen QH, *et al*. African swine fever virus vaccine candidate ASFV-G-ΔI177L efficiently protects European and native pig breeds against circulating Vietnamese field strain. *Transbound Emerg Dis* 2021 ; 69(4) : e497-504.

57. Borca MV, Ramirez-Medina E, Silva E, *et al*. ASFV-G-ΔI177L as an effective oral nasal vaccine against the eurasia strain of Africa swine fever. *Viruses* 2021 ; 13(5) : 765.

58. Tran XH, Phuong LTT, Huy NQ, *et al*. Evaluation of the safety profile of the ASFV vaccine candidate ASFV-G-ΔI177L. *Viruses* 2022 ; 14(5) : 896.

59. García-Belmonte R, Pérez-Núñez D, Pittau M, Richt JA, Revilla Y. African swine fever virus Armenia/07 virulent strain controls interferon beta production through the cGAS-STING pathway. *J Virol* 2019 ; 93 : e02298-2318.

60. Razzuoli E, Franzoni G, Carta T, *et al*. Modulation of type I interferon system by African swine fever virus. *Pathogens* 2020 ; 9 : 361.

61. Golding JP, Goatley L, Goodbourn S, Dixon LK, Taylor G, Netherton CL. Sensitivity of African swine fever virus to type I interferon is linked to genes within multigene families 360 and 505. *Virology* 2016 ; 493 : 154-61.

62. Chapman DAG, Tcherepanov V, Upton C, Dixon LK. Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates. *J Gen Virol* 2008 ; 89(2) : 397-408.

63. Dixon LK, Chapman DAG, Netherton CL, Upton C. African swine fever virus replication and genomics. *Virus Res* 2013 ; 173(1) : 3-14.

64. Reis AL, Abrams CC, Goatley LC, *et al*. Deletion of African swine fever virus interferon inhibitors from the genome of a virulent isolate reduces virulence in domestic pigs and induces a protective response. *Vaccine* 2016 ; 34 : 4698-705.

65. O'Donnell V, Holinka LG, Gladue DP, *et al*. African swine fever virus Georgia isolate harboring deletions of MGF360 and MGF505 genes is attenuated in swine and confers protection against challenge with virulent parental virus. *J Virol* 2015 ; 89(11) : 6048-56.

66. Afonso CL, Piccone ME, Zaffuto KM, *et al*. African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes affect host interferon response. *J Virol* 2004 ; 78 : 1858-64.

67. Gil S, Sepúlveda N, Albina E, Leitão A, Martins C. The low-virulent African swine fever virus (ASFV/NH/P68) induces enhanced expression and production of relevant regulatory cytokines (IFNα, TNFα and IL12p40) on porcine macrophages in comparison to the highly virulent ASFV/L60. *Arch Virol* 2008 ; 153(10) : 1845-54.

68. Burrage TG, Lu Z, Neilan JG, Rock DL, Zsak L. African swine fever virus multigene family 360 genes affect virus replication and generalization of infection in *Ornithodoros porcinus* ticks. *J Virol* 2004 ; 78(5) : 2445-53.

69. Ran Y, Li D, Xiong M-G, *et al*. African swine fever virus I267L acts as an important virulence factor by inhibiting RNA polymerase III-RIG-I-mediated innate immunity. *PLoS Pathog* 2022 ; 18(1) : e1010270.

70. Henriques ES, Brito RMM, Soares H, Ventura S, de Oliveira VL, Parkhouse RME. Modeling of the toll-like receptor 3 and a putative toll-like receptor 3 antagonist encoded by the African swine fever virus: modeling of TLR3 and a putative TLR3 antagonist. *Protein Sci* 2011 ; 20(2) : 247-55.

71. De Oliveira LV, Almeida SCP, Soares HR, Crespo A, Marshall-Clarke S, Parkhouse RME. A novel TLR3 inhibitor encoded by African swine fever virus (ASFV). *Arch Virol* 2011 ; 156(4) : 597-609.

72. Dodantenna N, Ranathunga L, Chathuranga WAG, *et al*. African swine fever virus EP364R and C129R target cyclic GMP-AMP to inhibit the cGAS-STING signaling pathway. *J Virol* 2022 ; 96(15) : e0102222.

73. Li D, Yang W, Li L, *et al*. African swine fever virus MGF-505-7R negatively regulates cGAS–STING-mediated signaling pathway. *J Immunol* 2021 ; 206(8) : 1844-57.

74. Zheng W, Xia N, Zhang J, *et al*. African swine fever virus structural protein p17 inhibits cGAS-STING signaling pathway through interacting with STING. *Front Immunol* 2022 ; 13 : 941579.

75. Luo J, Zhang J, Ni J, *et al*. The African swine fever virus protease pS273R inhibits DNA sensing cGAS-STING pathway by targeting IKKε. *Virulence* 2022 ; 13(1) : 740-56.

76. Huang L, Xu W, Liu H, *et al*. African swine fever virus pI215L negatively regulates cGAS-STING signaling pathway through recruiting RNF138 to inhibit K63-linked ubiquitination of TBK1. *J Immunol* 2021 ; 207(11) : 2754-69.

© John Libbey Eurotext, 2022

77. Li J, Song J, Kang L, *et al.* pMGF505-7R determines pathogenicity of African swine fever virus infection by inhibiting IL-1β and type I IFN production. *PLoS Pathog* 2021 ; 17 : e1009733.

78. Wang Y, Cui S, Xin T, *et al.* African swine fever virus MGF360-14L negatively regulates type I interferon signaling by targeting IRF3. *Front Cell Infect Microbiol* 2022 ; 11 : 818969.

79. Huisheng L, Zixiang Z, Tao F, *et al*. African swine fever virus E120R protein inhibits interferon beta production by interacting with IRF3 to block its activation. *J Virol* 2021 ; 95(18) : e00824-921.

80. Yang J, Li S, Feng T, *et al.* African swine fever virus F317L protein inhibits NF-κB activation to evade host immune response and promote viral replication. *mSphere* 2021 ; 6(5) : e0065821.

81. Hong J, Chi X, Yuan X, *et al.* I226R protein of African swine fever virus is a suppressor of innate antiviral responses. *Viruses* 2022 ; 14(3) : 575.

82. Zhuo Y, Guo Z, Ba T, *et al*. African swine fever virus MGF360-12L inhibits type I interferon production by blocking the interaction of importin α and NF-κB signaling pathway. *Virol Sin* 2021 ; 36(2) : 176-86.

83. Zhang K, Yang B, Shen C, *et al*. MGF360-9L is a major virulence factor associated with the African Swine fever virus by antagonizing the JAK/STAT signaling pathway. *mBio* 2022 ; 13(1) : e0233021.

84. Li D, Zhang J, Yang W, *et al*. African swine fever virus protein MGF-505-7R promotes virulence and pathogenesis by inhibiting JAK1- and JAK2-mediated signaling. *J Biol Chem* 2021 ; 297(5) : 101190.

85. Muñoz-Moreno R, Cuesta-Geijo MÁ R, Martínez-Romero C, *et al*. Antiviral role of IFITM proteins in African swine fever virus infection. *PLoS One* 2016 ; 11(4) : e0154366.

86. Netherton CL, Simpson J, Haller O, *et al.* Inhibition of a large double-stranded DNA virus by MxA protein. *J Virol* 2009 ; 83(5) : 2310-20.

87. Rathakrishnan A, Reis AL, Goatley LC, Moffat K, Dixon LK. Deletion of the K145R and DP148R genes from the virulent ASFV Georgia 2007/1 isolate delays the onset, but does not reduce severity, of clinical signs in infected pigs. *Viruses* 2021 ; 13(8) : 1473.

88. Yang K, Xue Y, Niu H, *et al.* African swine fever virus MGF360-11L negatively regulates cGAS-STING-mediated inhibition of type I interferon production. *Vet Res* 2022 ; 53(1) : 7.

89. Yang K, Huang Q, Wang R, *et al*. African swine fever virus MGF505-11R inhibits type I interferon production by negatively regulating the cGAS-STING-mediated signaling pathway. *Vet Microbiol* 2021 ; 263 : 109265.

90. Galluzzi L, Brenner C, Morselli E, Touat Z, Kroemer G. Viral control of mitochondrial apoptosis. *PLoS Pathog* 2008 ; 4(5) : e1000018.

91. Reis AL, Netherton C, Dixon LK. Unraveling the armor of a killer: evasion of host defenses by African swine fever virus. *J Virol* 2016 ; 91(6) : e02338-2416.

92. Carrascosa AL, Bustos MJ, Nogal ML, González de Buitrago G, Revilla Y. Apoptosis induced in an early step of African swine fever virus entry into vero cells does not require virus replication. *Virology* 2002 ; 294(2) : 372-82.

93. Galindo I, Hernáez B, Muñoz-Moreno R, Cuesta-Geijo MA, Dalmau-Mena I, Alonso C. The ATF6 branch of unfolded protein response and apoptosis are activated to promote African swine fever virus infection. *Cell Death Dis* 2012 ; 3(7) : e341-1341.

94. Dixon LK, Sánchez-Cordón PJ, Galindo I, Alonso C. Investigations of pro- and anti-apoptotic factors affecting African swine fever virus replication and pathogenesis. *Viruses* 2017 ; 9(9) : 241.

95. Afonso CL, Neilan JG, Kutish GF, Rock DL. An African swine fever virus Bc1-2 homolog, 5-HL, suppresses apoptotic cell death. *J Virol* 1996 ; 70(7) : 4858-63.

96. Revilla Y, Cebrián A, Baixerás E, Martínez C, Viñuela E, Salas ML. Inhibition of apoptosis by the African swine fever virus Bcl-2 homologue: role of the BH1 domain. *Virology* 1997 ; 228 : 400-4.

97. Banjara S, Caria S, Dixon LK, Hinds MG, Kvansakul M. Structural insight into African swine fever virus A179L-mediated inhibition of apoptosis. *J Virol* 2017 ; 91(6) : e02228-2316.

98. Nogal ML, González de Buitrago G, Rodríguez C, *et al*. African swine fever virus IAP homologue inhibits caspase activation and promotes cell survival in mammalian cells. *J Virol* 2001 ; 75(6) : 2535-43.

99. Zhang F, Moon A, Childs K, Goodbourn S, Dixon LK. The African swine fever virus DP71L protein recruits the protein phosphatase 1 catalytic subunit to dephosphorylate eIF2alpha and inhibits CHOP induction but is dispensable for these activities during virus infection. *J Virol* 2010 ; 84(20) : 10681-9.

100. Hernáez B, Díaz-Gil G, García-Gallo M, *et al.* The African swine fever virus dynein-binding protein p54 induces infected cell apoptosis. *FEBS Lett* 2004 ; 569(1-3) : 224-8.

101. Lewis T, Zsak L, Burrage TG, *et al*. An African swine fever virus ERV1-ALR homologue, 9GL, affects virion maturation and viral growth in macrophages and viral virulence in swine. *J Virol* 2000 ; 74(3) : 1275-85.

102. Gladue DP, Ramirez-Medina E, Vuono E, *et al.* Deletion of the A137R gene from the pandemic strain of African swine fever virus attenuates the strain and offers protection against the virulent pandemic virus. *J Virol* 2021 ; 95(21) : e0113921.

103. Afonso CL, Carrillo C, Zsak L, Rock DL, Borca MV. African swine fever virus NL gene is not required for virus virulence. *J Gen Virol* 1998 ; 79(10) : 2543-7.

104. Zhang Y, Ke J, Zhang J, *et al.* African swine fever virus bearing an I226R gene deletion elicits robust immunity in pigs to african swine fever. *J Virol* 2021 ; 95(23) : e0119921.

105. Zhang J, Zhang Y, Chen T, *et al*. Deletion of the L7L-L11L genes attenuates ASFV and induces protection against homologous challenge. *Viruses* 2021 ; 13(2) : 255.

106. Chen W, Zhao D, He X, *et al.* A seven-gene-deleted African swine fever virus is safe and effective as a live attenuated vaccine in pigs. *Sci China Life Sci* 2020 ; 63(5) : 623-34.

107. Ramirez-Medina E, Vuono E, O'Donnell V, *et al.* Differential effect of the deletion of African swine fever virus virulence-associated genes in the induction of attenuation of the highly virulent Georgia strain. *Viruses* 2019 ; 11(7) : 599.

108. Monteagudo PL, Lacasta A, López E, *et al*. BA71ΔCD2: a new recombinant live attenuated African swine fever virus with cross-protective capabilities. *J Virol* 2017 ; 91(21) : e01058-1117.

109. Borca MV, O'Donnell V, Holinka LG, *et al.* Deletion of CD2-like gene from the genome of African swine fever virus strain Georgia does not attenuate virulence in swine. *Sci Rep* 2020 ; 10(1) : 494.

110. O'Donnell V, Risatti Guillermo R, Holinka Lauren G, *et al*. Simultaneous deletion of the 9GL and UK genes from the African swine fever virus Georgia 2007 isolate offers increased safety and protection against homologous challenge. *J Virol* 2016 ; 91(1) : e01760-1816.

111. Sanford B, Holinka LG, O'Donnell V, *et al.* Deletion of the thymidine kinase gene induces complete attenuation of the Georgia isolate of African swine fever virus. *Virus Res* 2016 ; 213 : 165-71.

© John Libbey Eurotext, 2022

112. Correia S, Ventura S, Parkhouse RM. Identification and utility of innate immune system evasion mechanisms of ASFV. *Virus Res* 2013 ; 173(1) : 87-100.

113. Liu X, Ao D, Jiang S, *et al*. African swine fever virus A528R inhibits TLR8 mediated NF-κB activity by targeting p65 activation and nuclear translocation. *Viruses* 2021 ; 13(10) : 2046.

114. Wang X, Wu J, Wu Y, *et al*. Inhibition of cGAS-STING-TBK1 signaling pathway by DP96R of ASFV China 2018/1. *Biochem Biophys Res Commun* 2018 ; 506 : 437-43.

115. Sun M, Yu S, Ge H, *et al*. The A137R protein of African swine fever virus inhibits type I interferon production via the autophagy-mediated lysosomal degradation of TBK1. *J Virol* 2022 ; 96(9) : e0195721.

116. Chen H, Wang Z, Gao X, *et al*. ASFV pD345L protein negatively regulates NF-κB signalling by inhibiting IKK kinase activity. *Vet Res* 2022 ; 53(1) : 32.

117. Cui S, Wang Y, Gao X, *et al*. African swine fever virus M1249L protein antagonizes type I interferon production via suppressing phosphorylation of TBK1 and degrading IRF3. *Virus Res* 2022 ; 319 : 198872.

Tiré à part auteur

© John Libbey Eurotext, 2022

Annexe 8 : Article en collaboration avec le FLI sur la protéine CP204L de l'ASFV.

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY | Journal of Virology®

VIRUS-CELL INTERACTIONS

CP204L Is a Multifunctional Protein of African Swine Fever Virus That Interacts with the VPS39 Subunit of the Homotypic Fusion and Vacuole Protein Sorting Complex and Promotes Lysosome Clustering

Katarzyna Magdalena Dolata,[a] Walter Fuchs,[a] Grégory Caignard,[b] Juliette Dupré,[b] Katrin Pannhorst,[a] Sandra Blome,[c] Thomas C. Mettenleiter,[a] Axel Karger[a]

[a]Institute of Molecular Virology and Cell Biology, Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald-Insel Riems, Germany
[b]UMR Virologie, INRAE, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Laboratoire de Santé Animale d'Alfort, Anses, Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France
[c]Institute of Diagnostic Virology, Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald-Insel Riems, Germany

ABSTRACT Virus replication depends on a complex interplay between viral and host proteins. In the case of African swine fever virus (ASFV), a large DNA virus, only a few virus-host protein-protein interactions have been identified to date. In this study, we demonstrate that the ASFV protein CP204L interacts with the cellular homotypic fusion and protein sorting (HOPS) protein VPS39, blocking its association with the lysosomal HOPS complex, which modulates endolysosomal trafficking and promotes lysosome clustering. Instead, CP204L and VPS39 are targeted to virus factories and localized at the periphery of the virus DNA replication sites. Furthermore, we show that loss of VPS39 reduces the levels of virus proteins synthesized in the early phase of infection and delays ASFV replication but does not completely inhibit it. Collectively, these results identify a novel virus-host protein interaction that modulates host membrane rearrangement during infection and provide evidence that CP204L is a multifunctional protein engaged in distinct steps of the ASFV life cycle.

IMPORTANCE African swine fever virus (ASFV) was first identified over a hundred years ago. Since then, much effort has been made to understand the pathogenesis of ASFV. However, the specific roles of many individual ASFV proteins during the infection remain enigmatic. This study provides evidence that CP204L, one of the most abundant ASFV proteins, modulates endosomal trafficking during virus infection. Through protein-protein interaction, CP204L prevents the recruitment of VPS39 to the endosomal and lysosomal membranes, resulting in their accumulation. Consequently, CP204L and VPS39 become sequestered in the ASFV replication and assembly site, known as the virus factory. These results uncover a novel function of viral protein CP204L and extend our understanding of complex interaction between virus and host.

KEYWORDS African swine fever virus, ASFV, CP204L, VPS39, HOPS complex, virus-host interaction, lysosomes

African swine fever virus (ASFV) causes a contagious and often lethal disease of domestic pigs and wild boars. The disease was first reported in Kenya in 1921 (1) and has remained endemic in Africa. Over the years, sporadic outbreaks were registered outside Africa, but only in 2019 did African swine fever (ASF) reach a pandemic level. There has been no evidence so far of cross-species transmission of ASFV to humans or mammals other than members of the family *Suidae*. Nevertheless, due to high case fatality rates approaching 100% in Eurasian suids and the lack of vaccines, the economic consequences of ASF are very high (2–4).

Editor Derek Walsh, Northwestern University Feinberg School of Medicine

Copyright © 2023 Dolata et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Katarzyna Magdalena Dolata, katarzyna.dolata@fli.de, or Axel Karger, axel.karger@fli.de.

The authors declare no conflict of interest.

Received 18 December 2022
Accepted 6 January 2023
Published 1 February 2023

ASFV is a large double-stranded DNA virus of the family *Asfarviridae* that induces the synthesis of over 100 virus proteins in infected cells (5, 6). About 68 proteins are incorporated into virions (7). The virus replicates mainly in porcine monocytes and macrophages, although other cell types can be infected, especially in the later stages of the disease (8, 9).

ASFV utilizes multiple strategies to enter the host cell, including (i) binding to a hitherto-unknown receptor followed by clathrin-mediated endocytosis (10), (ii) macropinocytosis (11), and (iii) phagocytosis (12). Once internalized, viral particles are trafficked along the endocytic pathway from peripheral early endosomes to late perinuclear endosomes (13). The acidic environment in late endosomes destabilizes the outer viral capsid and exposes its inner membrane, allowing the virus to fuse with the endosomal membrane and release the viral core with the genomic DNA into the cytoplasm (14, 15).

Like several other large DNA viruses, such as poxviruses and iridoviruses, the replication of ASFV is associated with cytoplasmic foci, referred to as virus factories (VFs). ASFV-induced VFs appear as complex and dynamic perinuclear structures close to the microtubule organizing center, surrounded by mitochondria (16) and a vimentin cage (17). ASFV factories are highly compartmentalized to coordinate different steps of the viral life cycle, such as virus DNA replication, transcription and translation, and virion assembly (16, 18). Importantly, VF compartmentalization may protect the virus from degradation by antiviral defense mechanisms of the host cell. Despite their importance, the morphology of VFs and the mechanisms that lead to changes in the cellular organization required to produce complex replication sites are not yet understood.

It is known that ASFV reorganizes endosomal trafficking for its journey toward the perinuclear site, but endosomal membranes are also recruited to early VFs (19). The exact role of endosomal components in ASFV assembly is unknown. It has been suggested that endosomal compartments could be required for virus replication by providing a scaffold and confining the replication process to a specific cytoplasmic location. On the other hand, endosomal membranes may serve as intermediates for virus assembly. The virus-host interaction that leads to endosome accumulation in the early VF must occur in the initial phase of infection (13). Thus, characterizing interactions between host proteins and ASFV early proteins, synthesized before viral DNA replication, could shed light on the mechanism of VF assembly and transport of endosomal membranes into the factory.

The *CP204L* gene is conserved in all ASFV isolates and encodes a highly antigenic viral protein (20) essential for viral replication (21). The CP204L protein (referred to here as CP204L), also known as P30 or P32, is one of the most abundant viral proteins synthesized early during infection (22–24). In infected cells, CP204L is mainly localized in the cytoplasm, but small amounts have also been detected in the nucleus and at the plasma membrane (25). The nuclear CP204L has been reported to interact with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP-K) (26). A recent study by Chen et al. (27) identified seven cellular proteins interacting with CP204L, which are involved in endocytosis and innate immune response. However, the molecular mechanisms by which CP204L interacts with the host and influences virus replication remain unexplored.

This study identified a set of novel cellular and viral protein interactors of ASFV CP204L. In particular, we focused on host vesicular trafficking proteins, which are the key factors mediating ASFV infection progression. We demonstrate that CP204L interacts with VPS39, a component of the homotypic fusion and vacuole protein sorting (HOPS) complex, blocking VPS39 attachment to the HOPS complex and causing lysosome clustering. We discovered that CP204L is recruited to VFs at early times during infection. Moreover, our observations suggest that VPS39 is an important host factor that regulates the early steps of infection but is not essential for ASFV replication.

RESULTS

Identification of the ASFV CP204L interactome. To gain insight into the host protein interactome of CP204L in ASFV-infected and noninfected cells, we employed an affinity tag purification-mass spectrometry (AP-MS) approach (Fig. 1A). We included AP-MS

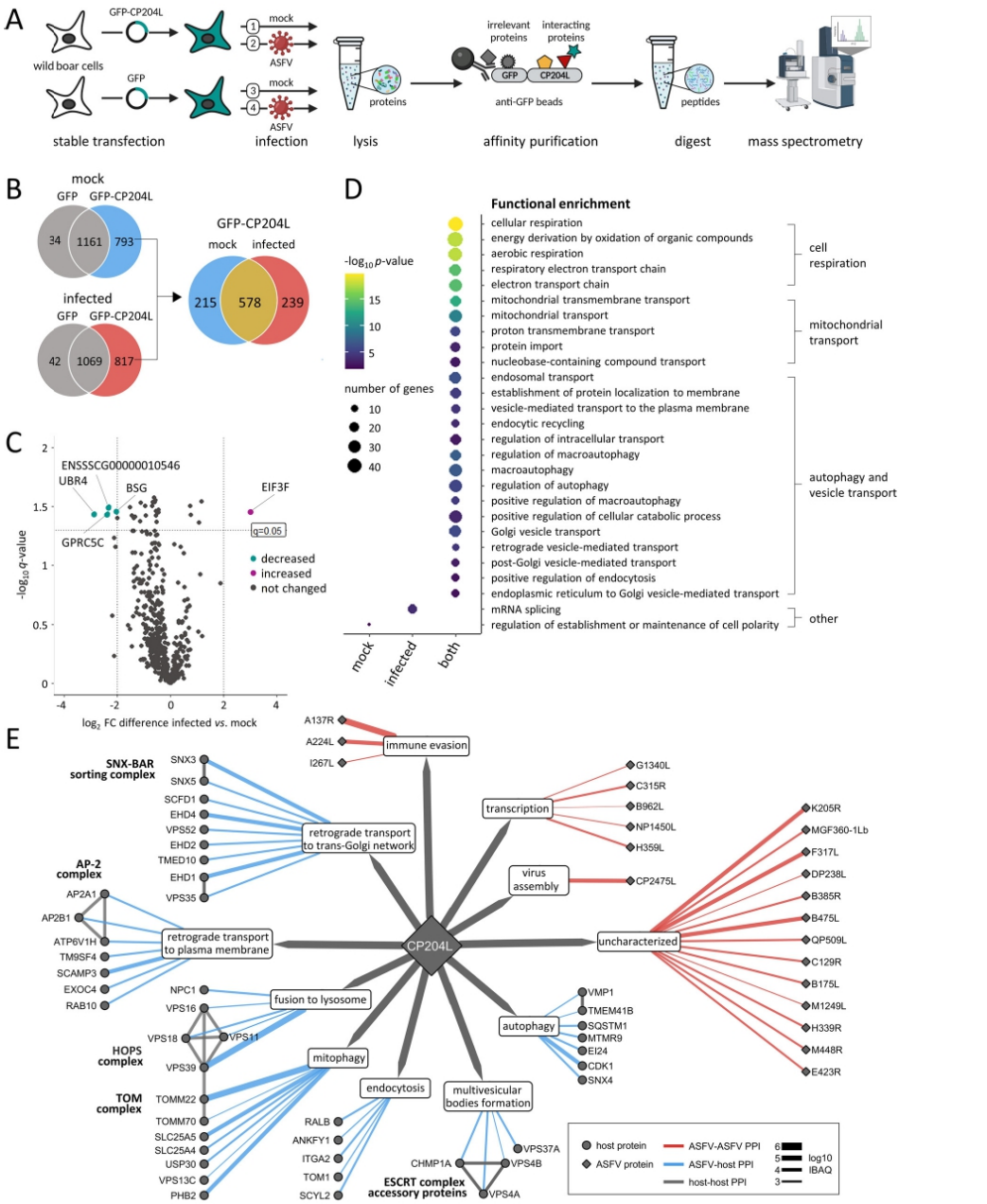


FIG 1 Identification of the ASFV CP204L interactome. (A) AP-MS experimental workflow for identifying interactions between CP204L and host proteins. (B) Venn diagrams demonstrating the overlap between protein interaction partners identified under different conditions. Venn diagrams on the left show GFP background proteins (false-positive hits) (gray) and CP204L-specific proteins identified under two conditions: mock infection (blue) and ASFV infection (red). GFP background proteins were excluded from the list of interacting proteins. The interactors

(Continued on next page)

experiments with infected cells to identify interactions of CP204L with other viral proteins and interactions with host proteins that depend on the presence of other viral proteins or on other conditions found exclusively in the infected cell. The CP204L of the highly virulent ASFV Georgia (28) with a C-terminal green fluorescent protein (GFP) tag was used as bait. The protein was stably expressed in wild boar lung (WSL) cells. GFP-expressing WSL cells were used as a negative control. Proteins were expressed under the following conditions: (i) CP204L-GFP without infection (mock), (ii) CP204L-GFP with ASFV infection, (iii) GFP without infection, and (iv) GFP with ASFV infection. Proteins were affinity purified in biological quadruplicates except for GFP without infection proteins, which was prepared in triplicate. Next, samples were subjected to analysis by mass spectrometry to identify copurifying partners. To minimize the false-positive identifications, host proteins bound to GFP in the absence of bait protein CP204L were excluded from further analysis (Fig. 1B).

Comparing the identified cellular interactors of the CP204L in infected and mock-infected cells revealed an overlap of 578 interactions. Additionally, 239 copurified proteins were identified exclusively in virus-infected cells and 215 in cells without virus infection (see all identified proteins in Data Set S1A in the supplemental material). Among the 578 overlapping proteins, only five showed significant changes in protein levels after infection (Fig. 1C).

To further functionally characterize the CP204L copurifying proteins, we performed a Gene Ontology (GO) enrichment analysis via the traditional overrepresentation statistical method (Fig. 1D). The enrichment analysis of proteins identified exclusively in mock-infected and infected cells revealed their association with mRNA splicing and regulation of cell polarity, respectively. Nevertheless, most enriched proteins were found in the overlapping group, and those robust interactions were analyzed further, as they are more likely to be functionally important. Proteins interacting with the CP204L in mock-infected and infected cells were enriched for several broad terms, such as cellular respiration, mitochondrial transport, and vesicle-mediated transport (Data Set S1B). The latter category included a set of proteins involved in cellular processes critical for virus entry, immune evasion, and cell-to-cell spread, like endocytosis, autophagy, or retrograde trafficking. We therefore constructed a protein interaction subnetwork and looked specifically into interactions between CP204L and host proteins involved in vesicle transport, as well as interactions between CP204L and other ASFV proteins (Fig. 1E). Among the host-virus interactions, one between ASFV CP204L and the swine protein VPS39, a subunit of the HOPS complex, was notable in that it was identified with the highest abundance ($\log_{10}$ iBAQ [(intensity-based absolute quantitation]) (Data Set S1C). The HOPS complex plays a role in endosomal cargo trafficking by mediating endosomal maturation (29) and fusion of lysosomes with late endosomes, phagosomes, or autophagosomes (30, 31). Of the protein-protein interactions (PPIs) among viral proteins, the A137R protein was the most enriched ASFV protein interacting with CP204L (Data Set S1C). Unfortunately, we could not confirm the interaction between CP204L and A137R by an inverted pulldown (Fig. S1). Therefore, we focused on characterizing the interaction of CP204L with VPS39.

FIG 1 Legend (Continued)
of CP204L identified in mock-infected and virus-infected WSL cells overlap in the Venn diagram (yellow) on the right. (C) Volcano plot showing differences in the abundance of CP204L host protein interactors identified in mock-infected and ASFV-infected samples. The *x* axis represents fold change (FC; infected versus mock infected) on a $\log_2$ scale. Dotted vertical and horizontal lines indicate the chosen cutoffs for fold changes [$|\log_2(FC)| > 2$] and *q* values ($q < 0.05$), respectively. Proteins showing significant differences in abundance between mock-infected and virus-infected cells are marked by their gene names. The terms "increased" and "decreased" refer to the indicated proteins with increased or decreased abundances in the mock-infected sample. (D) Selected functional GO terms from overrepresentation analysis are shown for each data set of CP204L interactors: 215 proteins from noninfected ("mock") samples, 239 from ASFV-infected cells ("infected"), and 578 common proteins from noninfected and ASFV-infected cells ("both"). The most enriched terms are related to cell respiration, mitochondrial transport, autophagy, vesicle transport, and others. The color scale indicates significance, expressed as $-\log_{10}$ *P* value, and the size of the dots reflects the number of input genes associated with the respective GO term. (E) Network illustrating the interactions of CP204L with other ASFV proteins and host proteins involved in vesicle transport in the cell. Each node represents a protein (circles, host proteins; diamonds, ASFV proteins). Each edge is colored according to the type of interaction (blue, ASFV-host PPIs; red, ASFV-ASFV PPIs). Edge thickness is proportional to the $\log_{10}$ iBAQ value. Physical interactions among host proteins and their specific cellular functions were curated from the literature (Data Set S1C). All CP204L-host interactions shown were identified in mock-infected and virus-infected cells. CP204L-virus interactions were identified only in infected cells.

CP204L interacts with the amino acid region from position 271 to 541 of the VPS39 subunit of the HOPS complex. We performed a coimmunoprecipitation (co-IP) experiment with anti-GFP agarose beads in the presence of GFP-tagged CP204L or GFP alone as a control. Endogenous VPS39 coprecipitated with CP204L-GFP in uninfected and infected cells, whereas no interaction was observed between VPS39 and GFP (Fig. 2A). Reverse co-IP experiments with GFP-tagged VPS39 in infected cells further confirmed the interaction between CP204L and VPS39 (Fig. 2B). Finally, we confirmed the interaction of endogenous VPS39 and CP204L in infected WSL cells (Fig. 2C). The IP assays were carried out with anti-VPS39 antibody or nonspecific IgG bound to protein G-conjugated magnetic beads. Beads alone were used as an additional control.

To determine whether the CP204L-VPS39 interaction is mutual, we applied a yeast two-hybrid (Y2H) assay. For this purpose, VPS39 and CP204L were fused to either the Gal4 DNA-binding domain (DBD) or the Gal4 activation domain (AD), and fusion proteins were expressed in yeast as bait or prey, respectively. Physical interaction between CP204L-AD and VPS39-DBD proteins was confirmed by the Y2H assay (Fig. 2D). Moreover, both proteins showed the ability to form homodimers using the Y2H system. To further map the region of VPS39 required for the interaction with CP204L, gap repair cloning was applied. Forward and reverse primers were designed for every 270 nucleotides along the VPS39 sequence (corresponding to 90 amino acids) and every 60 nucleotides along the CP204L sequence (corresponding to 20 amino acids). Fragments of VPS39 or CP204L were introduced into the Gal4-DBD vector and coexpressed in yeast cells grown on a selective medium with CP204L or VPS39 fused to Gal4-AD, respectively.

The results of this experiment indicated a 270-residue region encompassing amino acid positions 271 to 541 of VPS39 protein to be critical for the interaction with CP204L (Fig. 2E). We could also demonstrate that the middle region of CP204L is required for interaction with VPS39; however, the minimum interacting domain could not be specified. According to the InterPro (32) prediction, the CP204L binding region of VPS39 contains a clathrin heavy-chain repeat (CHCR) domain. It also overlaps with a citron homology (CNH) domain located at the N terminus and with a transforming growth factor beta receptor-associated domain 1 (Fig. 2F). Furthermore, an intrinsically disordered region is situated within the CP204L binding domain between amino acids 440 and 460 of VPS39, as predicted by IUPred2A (33). Finally, to validate the CP204L binding domain, glutathione *S*-transferase (GST)-tagged CP204L protein was coexpressed with 3×FLAG-tagged VPS39$^{271–541}$ in HEK-293T cells, and total lysates were purified 48 h later with glutathione-Sepharose beads. In agreement with data obtained by Y2H, we confirmed that the 271–541 fragment of VPS39 is sufficient to bind CP204L (Fig. 2G).

CP204L and VPS39 colocalize and aggregate at the virus factory. We next performed colocalization analyses by confocal immunofluorescence microscopy. To improve the detection of the host protein, we used WSL cells stably expressing GFP-tagged VPS39.

Cells were mock or virus infected and stained with anti-CP204L antibody after 24 h. In the context of ASFV infection, both proteins colocalized in large cytoplasmic aggregates (Fig. 3A), whereas no VPS39 aggregates were detected in the absence of ASFV. A transfection experiment with a CP204L expression plasmid was performed to exclude the possibility of other virus proteins or infection-dependent mechanisms mediating the formation of VPS39-CP204L aggregates. This experiment confirmed that transiently expressed CP204L alone promotes VPS39 aggregation (Fig. 3B). Interestingly, the VPS39-CP204L complex formed large aggregates in the perinuclear region with smaller and more uniformly distributed granules.

This observation led to the question of whether CP204L is targeted to a specific cellular structure in virus-infected cells in the absence of overexpressed VPS39. To address this question, WSL cells were infected with ASFV, and CP204L was visualized by indirect immunofluorescence 24 h postinfection. We noticed that CP204L exhibited distinct distribution patterns in infected cells. In addition to an even distribution in the cytoplasm, which has been described in previous studies (17, 24), it accumulated at the site of

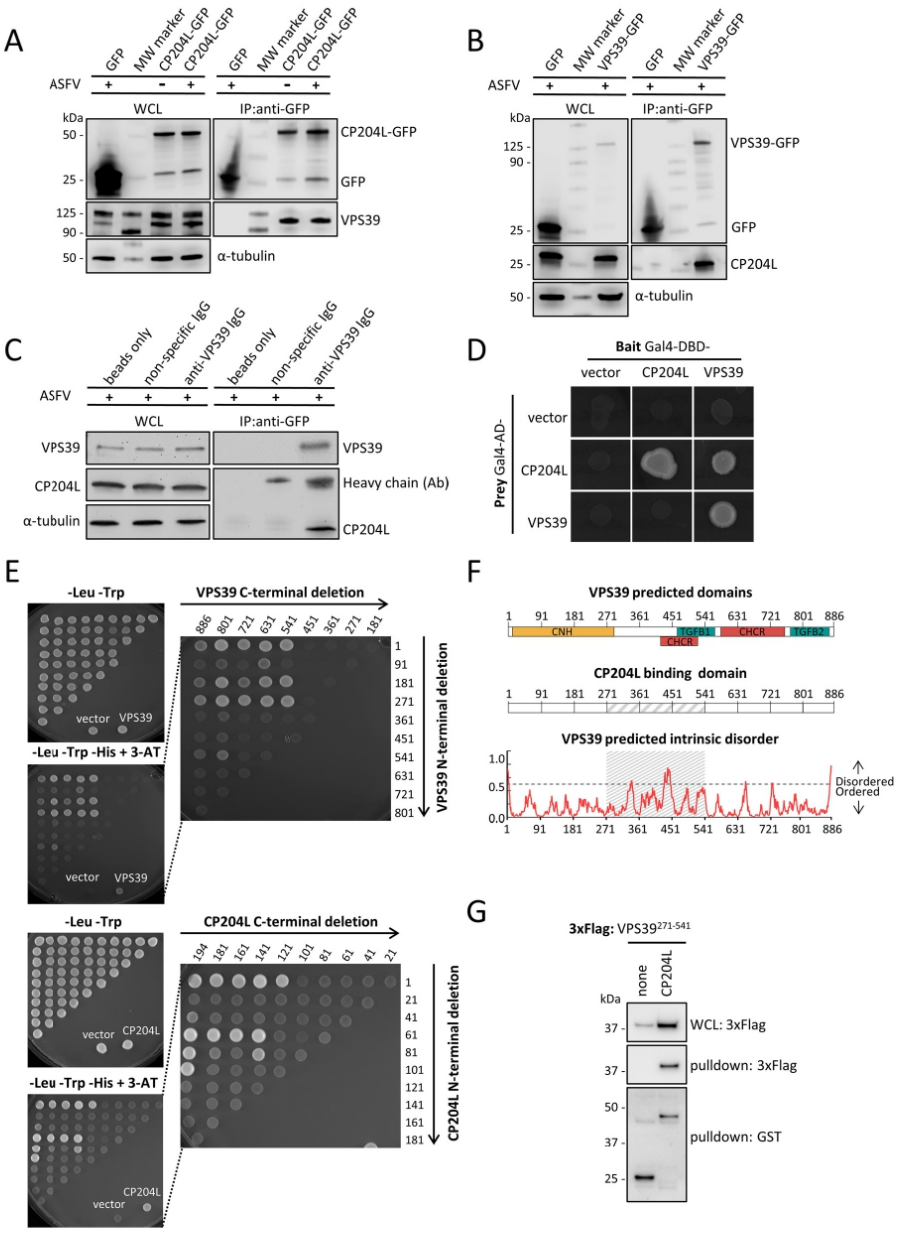


FIG 2 Interaction between ASFV CP204L and porcine VPS39. (A) Coimmunoprecipitation of GFP-tagged CP204L with endogenous VPS39. GFP was immunoprecipitated in lysates from mock-infected and virus-infected cells stably expressing CP204L-GFP or GFP alone. Representative immunoblots of whole-cell lysates (WCLs) and GFP immunoprecipitates (IPs) are shown. α-Tubulin was used as a loading control in WCLs. (B) Reverse coimmunoprecipitation of VPS39-GFP with CP204L in virus-infected cells. (C) WSL cells were infected with ASFV at an MOI of 2 for 24 h. Lysates were prepared and immunoprecipitated with rabbit anti-VPS39 antibody, a nonspecific rabbit IgG control, or beads only, followed by immunoblotting. (D) Interaction between CP204L and VPS39 was tested in

(Continued on next page)

virus factories that are enclosed in characteristic vimentin cages (Fig. 3C). Z-stack sectioning and imaging of infected cells showed the accumulation of CP204L around the sites of virus DNA replication (Fig. 3D). As expected, we could also confirm that VPS39 aggregates together with CP204L at the periphery of the virus DNA replication sites (Fig. 3E). The localization of CP204L changes during infection, and its accumulations are significantly larger in early VFs than the late ones (Fig. 4A). VPS39 starts aggregating in the perinuclear area as early as 4 h postinfection. However, the colocalization with CP204L in the VF could be observed earliest at 8 h postinfection (Fig. 4B). Whereas VPS39 remains concentrated in the VF throughout the infection, some CP204L in the late stage of infection (after 24 h) showed cytoplasmic distribution.

CP204L blocks VPS39 interaction with the HOPS complex and promotes lysosomal clustering. Having established that both CP204L and VPS39 interact and aggregate at the virus factory, we sought to determine whether this interaction could impair VPS39 function in late endosomal trafficking (34). The WSL cells expressing VPS39-GFP were transfected with a vector for CP204L expression or infected with ASFV. Cells expressing an empty vector were used as a control. After 24 h, the colocalization of VPS39 with lysosome-associated membrane protein 1 (LAMP1) was examined by immunofluorescence microscopy. Control cells exhibited the characteristic cytoplasmic and juxtanuclear distribution of lysosomes, and LAMP1 puncta colocalized with VPS39 (Fig. 5A). In the cells expressing CP204L after transfection or after infection, VPS39 aggregates were largely separated from LAMP1-marked lysosomes, which concentrated in the area near the nucleus. When CP204L was present, colocalization between the LAMP1-marked lysosomes and VPS39 was significantly reduced (Fig. 5B). Similarly, CP204L expression altered the colocalization between VPS39 and Rab7-marked late endosomes (Fig. S2). Moreover, the expression of CP204L was accompanied by reduced numbers of LAMP1-positive puncta and a significant increase in the size of accumulated lysosomes, suggesting lysosomal enlargement through coalescence (Fig. 5C).

Finally, to test if the interaction with CP204L prevents the recruitment of VPS39 to the HOPS complex, we evaluated the colocalization of VPS39 with the subunit VPS11, which anchors VPS39 to the HOPS complex (35). Unlike in uninfected cells, no colocalization between VPS39 and VPS11 was observed in virus-infected cells (Fig. 5D). However, a clear colocalization between viral DNA (Hoechst staining) and VPS11 was detected, suggesting that VPS11 is targeted to the ASFV replication site independent of VPS39. Together, these observations indicate that CP204L inhibits the integration of VPS39 into the HOPS complex, thus interfering with VPS39 function to associate with endosomal and lysosomal membranes and leading to the clustering of lysosomes in the infected cells.

ASFV replication and protein synthesis are delayed in cells lacking VPS39. Next, we studied the role of the CP204L-VPS39 interaction in establishing the ASFV infection. CRISPR-Cas9 technology was used to generate a VPS39 knockout (KO) in the WSL cell line. The *VPS39* gene of the selected WSL cell clones exhibited a single nucleotide (A) insertion inducing a frameshift behind codon 202 (VPS39-KO1) and 101 (VPS39-KO2), leading to premature termination at positions 224 and 103, respectively. Both cell clones were homozygous with respect to these mutations and unable to express the

FIG 2 Legend (Continued)
a yeast two-hybrid assay. CP204L and VPS39 were expressed as fusion proteins with the DBD or AD domain of Gal4. The empty vector is shown as a negative control. (E) Yeast two-hybrid mapping of the CP204L-binding region in VPS39 and the VPS39-binding region in CP204L. Various combinations of VPS39 truncations and CP204L were cotransformed into the pPC86 vector. The transformants were spotted on control plates (−Leu −Trp) and selective plates (−Leu −Trp −His +3-AT [5 mM]). Cotransfection with interacting protein fragments was indicated by growth on the selective medium. Vertical and horizontal axes indicate the first and the last amino acid residues of each tested fragment, respectively. (F) (Top) Predicted domain organization of porcine VPS39. CNH, citron homology domain; CHCR, clathrin heavy-chain repeat; TGFB1 and TGFB2, transforming growth factor beta receptor-associated domains 1 and 2. (Middle) CP204L-binding region between amino acids 271 and 541 of VPS39. (Bottom) Degree of order predicted by IUPred2A. The cutoff was set to a 0.5 probability score. (G) HEK-293T cells were transfected with expression vectors encoding GST alone or fused to CP204L and tested for interaction with 3×FLAG-tagged VPS39$^{271–541}$. WCLs were prepared at 48 h posttransfection (top), and copurifications of VPS39$^{271–541}$ were assayed by pulldown using glutathione-Sepharose beads (middle and bottom).

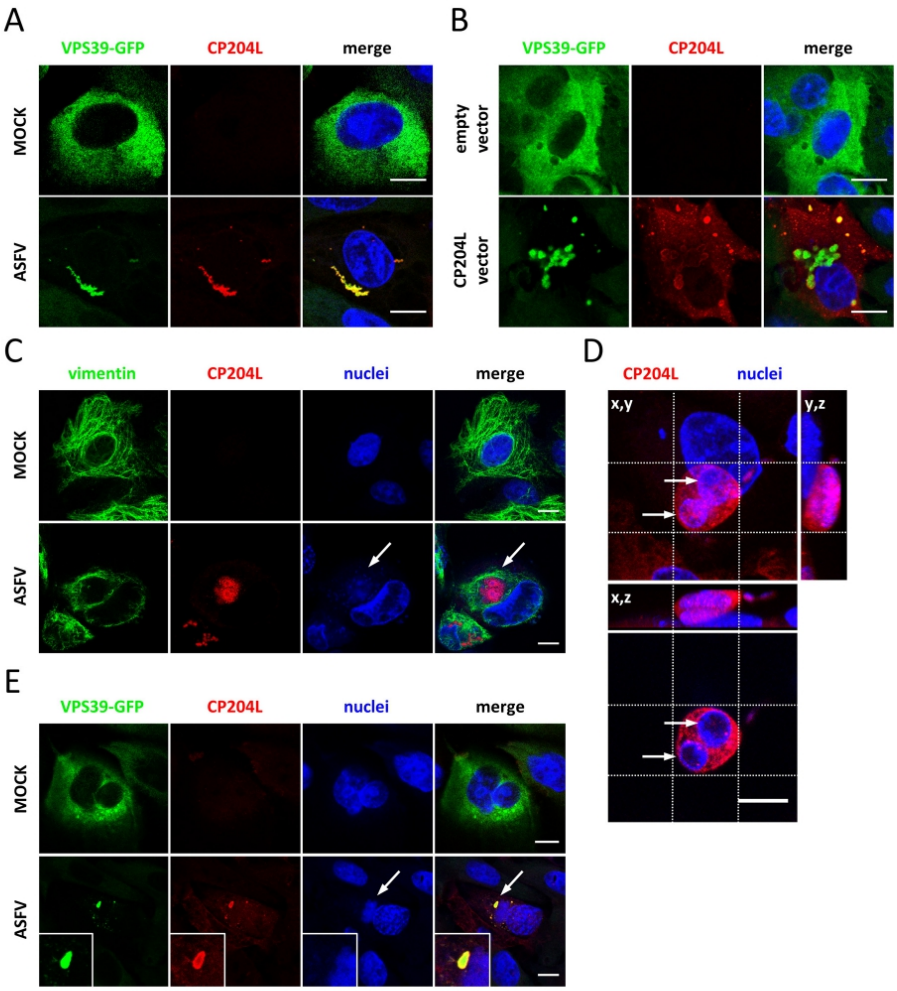


FIG 3 During infection, CP204L and VPS39 form aggregates and localize to the virus factory. Colocalization and aggregate formation between CP204L and VPS39 in WSL-VPS39-GFP cells (A) 24 h after ASFV infection and (B) CP204L plasmid transfection. Empty vector and mock-infected cells were used as negative controls. (C) Subcellular localization of CP204L in infected WSL cells (12 h after infection). Indirect immunofluorescence shows localization of CP204L (red) to virus replication sites (arrows) surrounded by a vimentin cage (green). (D) (Top) Representative image of a WSL cell infected with ASFV (24 h postinfection). The image shows a Z-stack projection (64 slices across 12.8 μm) of the cell nucleus and virus factories (blue) and the CP204L protein (red). The crosshairs were positioned to indicate virus DNA. (Bottom) Cross-section through the replication compartment and the CP204L accumulation at its periphery. (E) Protein VPS39 (green) and CP204L (red) colocalization at the periphery of the virus replication site in infected WSL-VPS39-GFP cells. Hoechst dye was used to stain cellular and virus DNA (blue). Arrows indicate virus factories. Bars, 10 μm.

CP204L binding domain localized between amino acids 271 and 541 of VPS39. The absence of VPS39 was confirmed in the VPS39-KO cells by mass spectrometry, where no peptides corresponding to the VPS39 protein were detected in VPS39-KO1 and VPS39-KO2 (Fig. 6A; Data Set S1D). Importantly, VPS39 deficiency in WSL cells did not reduce the cell viability compared to empty vector control cells (CTRL-KO) (Fig. 6B). The moderately reduced viability of all knockout cells, compared to wild-type cells, could be an unspecific deleterious effect of Cas9 nuclease, which was also abundantly expressed in the CTRL-KO cells.

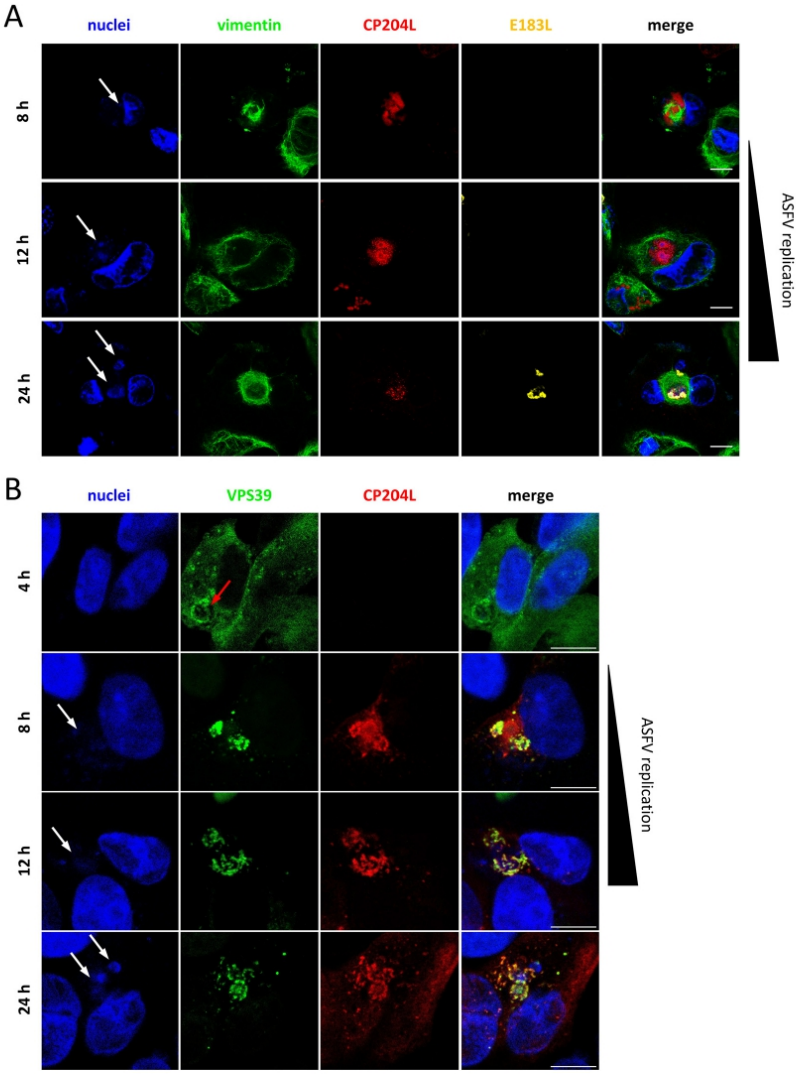


FIG 4 CP204L and VPS39 accumulate at the virus factory early during infection. (A) Virus factories in WSL cells infected with ASFV were monitored by immunofluorescence at 8, 12, and 24 h postinfection. Representative images show the accumulation of CP204L (red) in early VFs and dispersion from late VFs, which are marked by the presence of late virus protein E183L (P54) (yellow). Virus factories (white arrows) are labeled by DNA staining (blue) and staining of vimentin cages (green). Bars, 10 μm. (B) Colocalization of CP204L and VPS39 in ASFV-infected WSL-VPS39-GFP cells was monitored at 4, 8, 12, and 24 h postinfection. The aggregation of VPS39-GFP near the nucleus was observed 4 h postinfection (red arrow).

Next, KO cells were infected with ASFV at a multiplicity of infection (MOI) of 1 and incubated for 8, 24, or 48 h. Progeny virus titers were reduced by 1.5-$\log_{10}$ in VPS39-KO compared to control cell supernatant 24 h after infection (Fig. 6C). However, final ASFV titers in VPS39-KO cells at 72 h were not different from those in WT or CTRL-KO cells, suggesting that ASFV can replicate in the absence of VPS39, but with delayed kinetics.

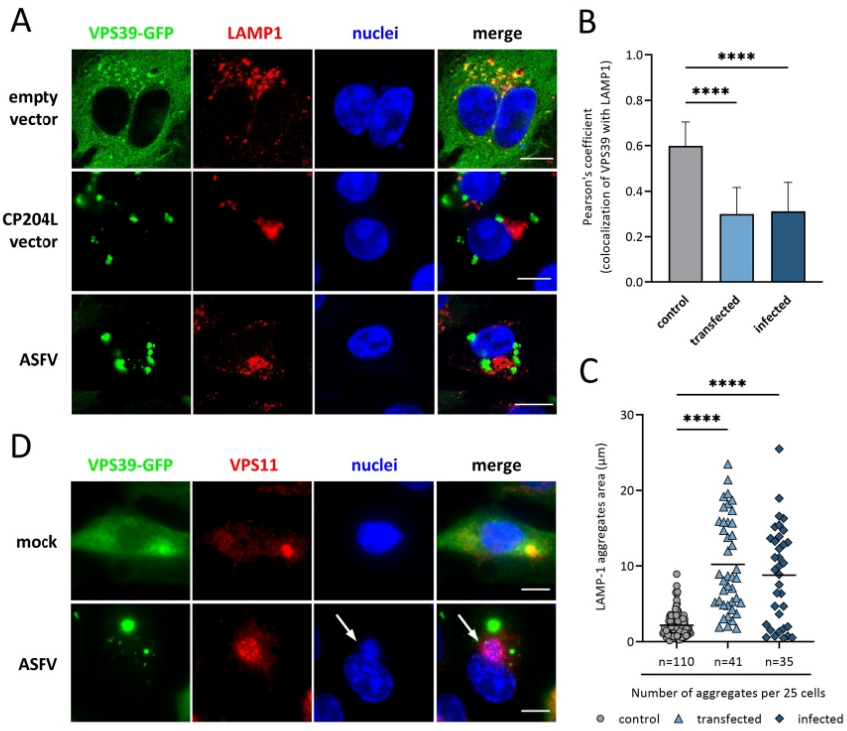


FIG 5 CP204L promotes lysosomal clustering and blocks VPS39 integration into the HOPS complex. (A) WSL cells stably expressing VPS39-GFP were analyzed by confocal fluorescence microscopy after transfection with a CP204L expression plasmid or infection with ASFV. Cells were stained for the lysosomal marker anti-LAMP1. (B) Quantification of the colocalization of VPS39 with lysosomes labeled by LAMP1. Pearson's coefficient (mean ± standard error of the mean [SEM]) from 25 cells in each group. (C) Quantification of the number and area of lysosomal and late endosomal aggregates per cell (n = 25 cells in each group). ****, $P < 0.0001$. (D) VPS11 staining shows a loss of colocalization between VPS39 and VPS11 in virus-infected cells. Arrows indicate virus factories. Bars, 10 μm.

Additionally, the lysates of KO cells infected with ASFV for 8, 24, or 48 h were harvested for Western blotting to examine the expression of early (CP204L) and late (B646L) virus proteins. While the expression of capsid protein B646L (P72) was similar in CTRL-KO and VPS39-KO cells, CP204L expression appeared to be delayed in cells lacking VPS39 (Fig. 6D). This observation raised the question of whether the synthesis of other early virus proteins expressed before the onset of virus DNA replication is also affected by the lack of VPS39.

To answer this question, we first analyzed the changes in virus protein levels in CTRL-KO and VPS39-KO cells 8 h after ASFV infection by quantitative MS. Among 46 virus proteins identified in all three cell lines, 22 were significantly downregulated in cells lacking VPS39 (Fig. 7A). In particular, we observed a decrease in levels of virus proteins implicated in RNA transcription (i.e., ASFV RNA polymerase subunits: D205R, EP1242L, I243L, and D339L) and DNA replication (i.e., ribonucleotide reductase: F334L, F778R, and dUTPase E165R) (Fig. 7B). We further analyzed the dynamics of viral protein synthesis in VPS39-KO cells across the indicated time points (Fig. 7C; Data Set S1D). As expected based on ASFV growth kinetics, the most profound changes were observed at 8 h after infection, whereas at later stages of infection, the levels of viral proteins in VPS39-KO cells stabilized and were comparable with those observed in CTRL-KO cells. These results suggest that although a loss of VPS39 markedly delays the synthesis of

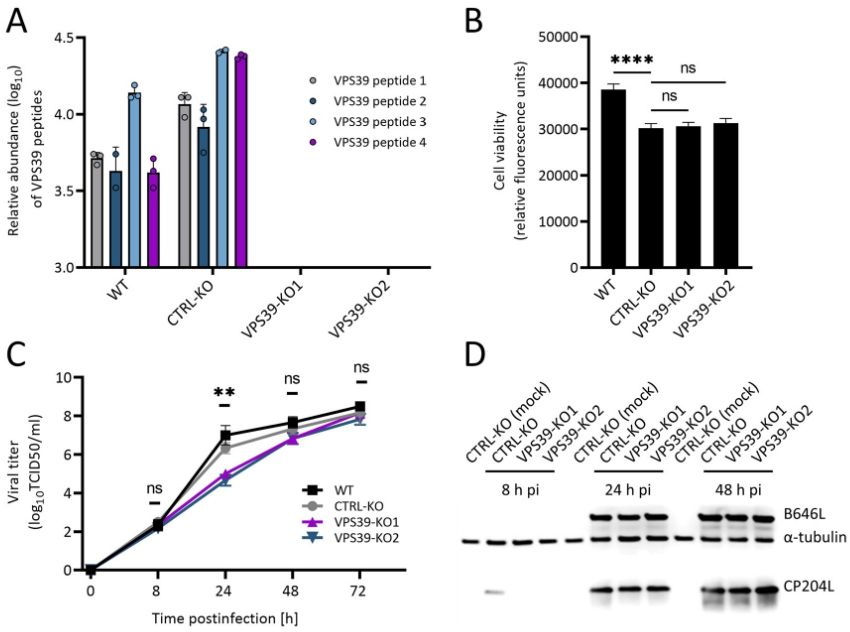


FIG 6 Absence of VPS39 delays ASFV growth and CP204L synthesis. (A) The absence of VPS39 in WSL KO cells was confirmed by mass spectrometry (Data Set S1D). VPS39 was identified based on four unique peptides in wild-type (WT) WSL cells and control knockout (CTRL-KO) cells. In VPS39-KO cells, no peptides of VPS39 were detected. The log_{10} relative abundance is presented for each peptide identified from three independent experiments. (B) Cell viability of WSL WT, CTRL-KO, and VPS39-KO cell lines was quantitated with a resazurin-based assay (PrestoBlue). ****, $P < 0.0001$. (C) Growth curves of ASFV after infection of VPS39-KO and control cells at an MOI of 1 ($n = 3$ wells/cell line/time point). The culture medium was collected at the indicated times, and the yields of the cell-free virus were expressed as $TCID_{50}$ per milliliter and were plotted as means of results from three independent replicates and standard deviations. **, $P < 0.01$. (D) Expression of CP204L and B646L virus proteins in VPS39-KO and CTRL-KO cells. Mock-infected CTRL-KO cells were used as controls. The α-tubulin-specific monoclonal antibody was used as a loading control.

CP204L and other early proteins, VPS39 is not essential, and ASFV replication can proceed in its absence.

DISCUSSION

Protein interaction networks yield critical insights into the virus-host interrelationships and mechanisms of viral protein function. In this study, the protein interaction network derived from AP-MS data provided new information about the molecular hijacking strategies of ASFV and the role of virus protein CP204L. We found it particularly interesting that CP204L establishes a rich network of interactions with host vesicle trafficking proteins.

Vesicular trafficking is a directed cellular process of transporting cargo to target locations inside or outside the cell. It is, therefore, not surprising that viruses usurp this pathway to achieve efficient transport within the host cell. However, the role of host trafficking vesicles extends beyond virus movement, as the formation of virus-modified endosomal membranes supports viral replication, reported especially for RNA viruses (reviewed in reference 36). It has been proposed that the cholesterol-rich endosomes can provide lipids for ASFV nucleic acid replication and virus assembly, structural scaffolding for viral factories, and protection from antiviral host responses (19, 37). However, the precise contributions of cellular factors and mechanisms underlying endosomal recruitment and accumulation at the ASFV replication site remain largely

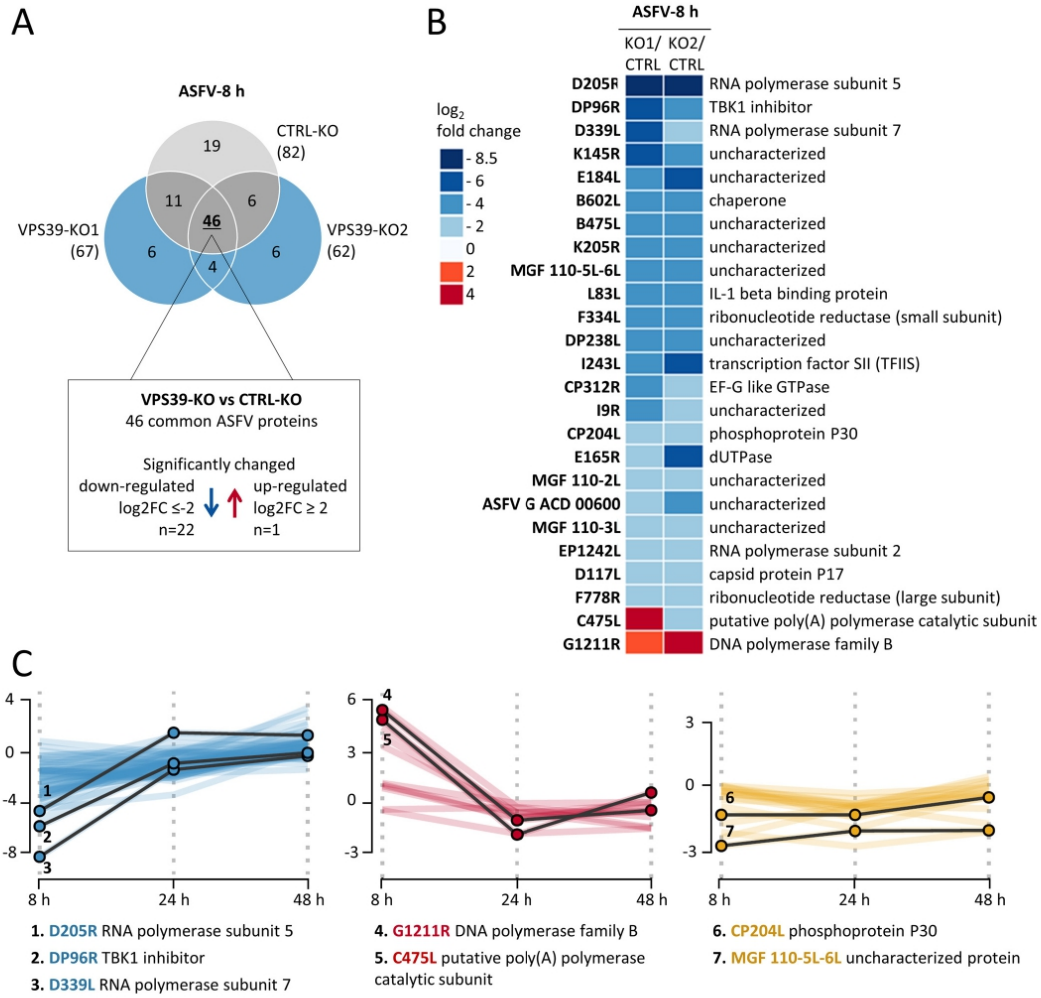


FIG 7 Loss of VPS39 affects the synthesis of ASFV proteins during the early phase of infection. (A) Overview of identified ASFV proteins 8 h after infection in CTRL-KO and VPS39-KO cells. The number of proteins exhibiting reduced or increased amounts in VPS39-KO cells was determined. (B) Heat map of viral proteins identified at 8 h depicts changes in protein expression levels between CTRL-KO and VPS39-KO cells. (C) Line plots showing fold changes in ASFV proteins expressed in VPS39-KO cells compared to controls. Three clusters with similar profiles of protein were distinguished: downregulated (or unchanged) at 8 h and increasing over time (blue); upregulated (or unchanged) at 8 h and decreasing over time (red); and continuously downregulated during infection in VPS39-KO cells (yellow). Selected ASFV protein profiles are depicted with solid black lines. Mass-spectrometric data can be found in Data Set S1D.

enigmatic. Our study sheds new light on the mechanism of endosomal membrane redistribution during ASFV infection by identifying novel viral and cellular proteins involved in this process.

Protein A137R was the most enriched among all viral proteins detected by AP-MS analysis. However, the reverse pulldown failed to confirm the interaction between CP204L and A137R (Fig. S1). Sun et al. (38) found that A137R inhibits type I interferon production by interacting with TANK-binding kinase 1 (TBK1) and promotes its lysosomal degradation by a yet-unknown mechanism. As both proteins, A137R and CP204L,

are involved in the endocytic pathway, they may interact directly or indirectly by sharing interaction partners. The ectopic expression of A137R-GFP fusion protein or structural changes induced by the protein fusion may interfere with binding to certain ligands, e.g., CP204L. Further experiments are necessary to characterize the nature of CP204L and A137R interaction.

The important initial observation of this study was that the CP204L-host interactome is significantly enriched in proteins associated with vesicle transport and mitochondria (Fig. 1D). Within these two functional groups, VPS39, a subunit of the vacuolar HOPS tethering complex, and TOMM22, a subunit of the translocase of the outer membrane (TOM) mitochondrial complex, were the most abundant host interactors of ASFV CP204L (Fig. 1E). Interestingly, the interaction between the TOM complex and VPS39 was previously reported to be essential for the formation of membrane contact sites (MCSs) between cellular vesicles (e.g., endosomes and lysosomes) and mitochondria (39, 40). Only recently have MCSs emerged as important host cell structures that enable viruses to reorganize the cellular membranes and channel cell lipids to the growing replication centers (41, 42). Therefore, it is tempting to speculate that the interaction between VPS39, TOMM22, and CP204L could play a role in establishing MCSs in ASFV-infected cells. However, to focus specifically on the mechanism by which ASFV exploits the endocytic pathway, this study solely investigated the interaction between VPS39 and CP204L.

Interestingly, VPS39 was not identified as a CP204L interactor in the Y2H screen performed by Chen et al. (27), and none of the 7 interactors identified in their study appeared as a specific interactor in our data set. However, it is unclear whether VPS39 was present in the cDNA library derived from porcine alveolar macrophages and used by Chen et al. (27). Nevertheless, a similar conclusion was reached by Chen et al. and us, i.e., that CP204L plays a role in vesicle trafficking by interacting with proteins involved in the endocytic pathway.

The VPS39 subunit was identified as the most confident interactor of CP204L by the PPI screen (Fig. 1E). Nonetheless, other subunits of the HOPS complex, such as VPS11, VPS16, and VPS18, but not VPS41 and VPS33, were also detected. For now, we ascribe this to the indirect binding of those proteins to the complex formed by the bait and to their oligomerization properties (43) rather than to a specific and direct binding to the CP204L. Our data show that CP204L individually targets the VPS39 subunit, blocking its attachment to the HOPS complex via VPS11. However, we cannot exclude the possibility that CP204L could also sequester other HOPS complex subunits. We showed that CP204L binds VPS39, and the binding site could be mapped to amino acids 271 and 541 of VPS39 (Fig. 2). We could also confirm the formation of homo-oligomer for both proteins, CP204L (44) and VPS39 (45). Oligomerized CP204L is present in infected cells mostly as hexamers, and the existing dimers are suggested to serve as assembly units for the final oligomerization (44). While oligomerization is a common feature of many viral proteins, the specific mechanism and role of the CP204L oligomerization are not clear. In this context, it is interesting that, e.g., Ebola virus VP40 (46), influenza virus matrix protein M1 (47), and Dengue virus NS1 (48) undergo oligomerization when binding to cellular membranes. The formation of oligomers and the presence of intrinsically disordered regions in viral proteins enhance diverse interactions with host proteins, resulting in protein multifunctionality (49).

Previously, Hernaez et al. (26) showed that a small portion of CP204L is present in the nucleus, interacting with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP-K) and causing its retention in the nucleus. To date, CP204L has been described as a predominantly cytoplasmic ASFV protein. In this study, we show that CP204L localizes to VFs, specific intracellular sites of virus replication (Fig. 3). The localization of CP204L varies during infection, and its accumulation at the VFs occurs at early times, before ASFV late protein synthesis (Fig. 4). We suggest that the difference in CP204L protein sequence between ASFV isolates may modulate its targeting to the VF. Previously, cytoplasmic localization of CP204L was reported in Vero cells infected with the BA71V isolate of ASFV. It has been reported that the protein CP204L of BA71V has a 10-amino-

acid extension at the C terminus (50), which is not present in CP204L of the ASFV isolate used in this work. Moreover, the polyclonal antibody used in our study can likely recognize different epitopes than the monoclonal antibodies used previously. Thus, different forms of CP204L, such as monomer, dimer, hexamer, etc., could be localized by our antibody. Furthermore, we also detected a considerable proportion of CP204L dispersed throughout the cytoplasm during the late phase of infection.

Interestingly, immunofluorescence analysis revealed that CP204L localized within VFs is clearly separated from viral DNA, suggesting its possible role in viral protein transcription and translation rather than virus replication. Also, the fact that a large number of ASFV proteins were found to coimmunoprecipitate with CP204L (Fig. 1E) supports its possible role in the process of viral protein synthesis. On the other hand, it is also possible that CP204L interacts with proteins of membrane-bound organelles such as mitochondria, the endoplasmic reticulum, or endosomes/lysosomes, which are all recruited to the area next to the virus DNA replication site.

Recently, Miao et al. (51) and Zhang et al. (52) reported interaction of SARS-CoV-2 protein ORF3a with the HOPS component VPS39. In this case, late-endosome-localized ORF3a sequesters VPS39 and, consequently, inhibits autophagy by blocking the fusion of autophagosomes with lysosomes. Our results indicate that the mechanism by which ASFV protein CP204L interacts with VPS39 differs from the one used by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). First, CP204L prevents VPS39 from binding to endosomal/lysosomal membranes (Fig. 5A). Second, CP204L expression inhibits VPS39 binding to VPS11 and its integration into the HOPS complex (Fig. 5D), while SARS-CoV-2 ORF3a expression does not affect the formation of the VPS39-containing HOPS complex (51). Third, the expression of CP204L leads to clustering of lysosomes (Fig. 5C) and accumulation of CP204L-VPS39 aggregates near ASFV VFs (Fig. 3E).

CP204L interacts with VPS39 within its clathrin heavy-chain repeat (CHCR), which is required for association with endosomal membranes via binding to Rab7-interacting lysosomal protein (RILP), and homooligomerization of VPS39 (53). Rab7 was already shown to be essential for ASFV replication (13). Therefore, the significant decrease in VPS39-lysosome colocalization during ASFV infection can be explained by a simple competition model wherein highly abundant CP204L competes with host RILP for binding to VPS39 in the cytosol. The loss of the ability of VPS39 to bind VPS11 and, consequently, to form the HOPS complex in the presence of CP204L could be explained either by direct competition of CP204L and VPS11 for the same binding site on VPS39 or by an allosteric effect of the CP204L-VPS39 interaction on the VPS39 binding site for VPS11.

CP204L is essential for the virus, and the reduction of protein levels results in a strong suppression of viral replication (21). Although virus replication (Fig. 6) and protein synthesis (Fig. 7) were reduced in VPS39-deficient cells, especially early during infection, this effect did not correlate with the 4-order-of-magnitude reduction observed with CP204L inhibition. This observation suggests that CP204L engages in several distinct functions important for virus replication, one of which involves the interaction with VPS39.

Nevertheless, we propose that the hijacking of VPS39 by CP204L may have two possible functions during ASFV infection. First, by inhibiting VPS39 association with endosomes and lysosomes, CP204L may impair homotypic and heterotypic fusion of vesicles, thus protecting endocytosed viruses from degradation. Second, by CP204L-induced dissociation of VPS39 from the HOPS complex and endosomal membranes, VPS39 gains the ability to engage in membrane contact sites formation (39), playing a role in the biogenesis of ASFV VFs. In this case, the loss of VPS39 could affect the ASFV membrane synthesis and virus assembly, thus leading to the observed delay in virus replication.

In summary, based on our results and previous studies, we conclude that CP204L is a multifunctional protein that interacts with the VPS39 subunit of the HOPS complex, is involved in endosomal trafficking, and orchestrates late endosome and lysosome clustering. CP204L exists in multiple oligomeric forms, undergoes phosphorylation, and localizes to the cytoplasm, nucleus, and virus factory. Moreover, we showed that

VPS39 plays a role in the early phase of ASFV replication and protein synthesis, but it is not essential for ASFV infection progression in wild boar cells.

MATERIALS AND METHODS

Cells and virus. The wild boar lung-derived cells (referred to as WSL cells here) (54), supplied by Friedrich-Loeffler-Institut Biobank (catalog number CCLV-RIE 0379), were maintained at 37°C with 5% CO_2 in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) mixed with Ham's F-12 nutrient mix (1:1 [vol/vol]) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). ASFV (Armenia/07 isolate) was adapted by serial passaging to more efficient replication in WSL cells. Passage 20 stocks were generated as described previously (21).

ASFV *in vitro* infection. All experiments with ASFV were performed in a biocontainment facility fulfilling the safety requirements for ASF laboratories and animal facilities (Commission Decision 2003/422/EC, chapter VIII). For infection experiments, WSL cell monolayers were inoculated with ASFV stock dilutions at an MOI of 2 PFU/cell, and supernatants collected from uninfected cells were used for the mock-infected controls. After inoculation, cells were centrifuged for 1 h at 600 $\times$ *g* and 37°C. Next, cells were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS), replenished with a medium containing 5% FBS, and incubated at 37°C with 5% CO_2. Supernatants were harvested at appropriate times, and progeny virus titers were determined as 50% tissue culture infective doses ($TCID_{50}$) per milliliter (55) on WSL cells.

DNA transfection. WSL cells were transiently transfected with a CP204L, a VPS39, or an empty vector using K2 multiplier and K2 transfection reagent (Biontex) following the manufacturer's instructions. Stable cell lines were generated by transient DNA transfection of WSL cells with plasmids encoding GFP, CP204L-GFP, or VPS39-GFP. Three days after transfection, cells were trypsinized, seeded into 96-well plates, and maintained in a medium containing 500 μg/mL G418 (Corning). Single resistant and fluorescent cell clones detected after 2 to 3 weeks were further propagated and validated for expression of GFP fusion protein by immunoblotting.

Plasmids constructs. (i) Control plasmids (GFP and empty vector). pGFP-N1 plasmid (Clontech; GenBank accession no. U55762) was used for GFP expression. To obtain a matching control plasmid for transfection experiments, a 741-bp BamHI/NotI fragment containing the open reading frame (ORF) encoding the enhanced GFP was deleted from pGFP-N1 (Clontech; GenBank accession no. U55762), resulting in pΔGFP-N1 after Klenow treatment and ligation.

(ii) CP204L-GFP plasmid. For the generation of CP204L-GFP plasmid, the codon-adapted viral frame (ORF) CP204L of ASFV Georgia 2007 (GenBank accession no. FR682468) (28) was amplified from plasmid pUC-BaKJCAG-CP204Lsyn (56) by PCR with primers pCAG-F3 and ASFVp30CDS-R (Table S1) using KOD Xtreme Hot Start DNA polymerase (Sigma/Merck). After digestion of the PCR product with BamHI and EcoRI, the isolated 617-bp fragment was inserted into the correspondingly digested and dephosphorylated reporter gene expression vector pGFP-N1 (Clontech; GenBank accession no. U55762). In the resulting plasmid, CP204L-GFP, the synthetic CP204L ORF was under the control of the human cytomegalovirus (HCMV) immediate early promoter/enhancer complex and 3′-terminally fused to the coding sequence of an enhanced GFP.

(iii) VPS39-GFP plasmid. For overexpression of VPS39 and GFP fusion proteins with VPS39 in transfected eukaryotic cells, the predicted gene product of *Sus scrofa* (isoform X3; GenBank accession no. XP_013848582) was back-translated in line with porcine codon preferences. The custom-made (GeneArt, Thermo Fisher Scientific) synthetic ORF was flanked by a 5′-terminal Kozak sequence (CCACC) and restriction sites for convenient recloning. For fusion of VPS39 to the N terminus of GFP, a 2,674-bp EcoRI/BamHI fragment was inserted into correspondingly digested pGFP-N1. The obtained precursor plasmid was digested with AhdI, treated with Klenow polymerase, and religated. This treatment caused a frameshift immediately upstream of the stop codon of VPS39, leading to in-frame fusion with the downstream GFP ORF in pVPS39porc-GFP.

(iv) A137R-GFP plasmid. A137R of ASFV Georgia 2007 (GenBank accession no. FR682468) (28) was generated by gene synthesis (Twist Bioscience) and shuttled via Gateway technology (Invitrogen) into the pcDNA6.2/N-emGFP-DEST plasmid backbone (Invitrogen) to generate A137R-GFP plasmid. All plasmid constructs were verified by DNA sequencing.

Affinity purification and mass spectrometry. (i) Affinity purification. A total of 5 $\times$ 10^6 WSL cells (stably expressing GFP, CP204L-GFP, or VPS39-GFP) were mock infected or infected with cell culture-adapted ASFV Armenia 2008 at an MOI of 2 PFU/cell. After 24 h, cells were washed three times with PBS and lysed on ice in 1 mL cold immunoprecipitation (IP) buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, and 1 mM $MgCl_2$ supplemented with Benzonase [25 U/mL; Sigma-Aldrich no. E8263], 0.5% Nonidet P40 substitute [NP-40; Sigma-Aldrich no. I8896], and cOmplete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail [Roche, no. 04693159001]). Cells were lysed by sonication three times for 30 s each at 80% amplitude (Branson Digital Sonifier 450) and incubated on a tube rotator for 30 min at 4°C and another 30 min on a thermomixer at 37°C with constant shaking at 900 rpm. Lysates were cleared by centrifugation at 13,000 $\times$ *g* and 4°C for 15 min. Fifty microliters of each lysate was removed for immunoblotting (whole-cell lysate fraction). GFP-trap agarose beads (50 μL; Chromotek) were washed twice in IP buffer and incubated with the remaining lysate for 1 h with constant rotation at 4°C. Beads were washed twice with 1 mL of IP buffer containing 0.05% NP-40 followed by two washes in detergent-free IP buffer. Ten microliters of bead slurry was removed for immunoblotting (IP fraction). The remaining 40 μL beads prepared in four independent biological replicates for CP204L-GFP without infection, CP204L-GFP with ASFV infection, and GFP with ASFV infection and in three independent biological replicates for GFP without infection were kept for mass-spectrometric analysis.

(ii) Sample preparation for mass spectrometry. After AP, beads were suspended in 300 μL freshly made UA buffer (8 M urea, 100 mM Tris-HCl [pH 8]), loaded onto 10-kDa filter units (Sartorius), and

centrifuged at 12,000 × *g* at 20°C for 30 min. Filter-aided sample preparation (FASP) trypsin digestion was performed as described previously (57). Beads were trypsinized to digest the baits and the interacting proteins in 100 μL of digest buffer (1 M urea, 50 mM Tris-HCl [pH 7.5], and 5 μg/mL trypsin [Promega]). Digestion was performed overnight at 37°C with shaking. The next day, the flowthrough containing peptides was collected, and the samples were inactivated for 10 min at 95°C. Peptides were acidified with formic acid (1% final concentration), desalted using C_{18} 100-μL tips (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions, dried by vacuum centrifugation, and reconstituted in 20 μL of 0.1% formic acid prior to mass spectrometry.

(iii) Protein identification by LC-MS/MS. Digested peptide mixtures were analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) on a timsTOF Pro (Bruker Daltonics), which was coupled online to a nanoElute nanoflow liquid chromatography system (Bruker Daltonics) via a CaptiveSpray nanoelectrospray ion source. Peptides (corresponding to 100 ng) were separated on a reverse-phase C_{18} column (25 cm by 75 μm; inside diameter, 1.6 μm; IonOpticks) with a binary buffer system of buffer A (water with 0.1% formic acid [vol/vol]) and buffer B (acetonitrile with 0.1% formic acid [vol/vol]). Peptides were separated by running a gradient of 2 to 95% mobile phase B over 115 min (2% to 16% solvent B (0 to 60 min), 15 to 24% solvent B (60 to 90 min), 24% to 34% solvent B (90 to 105 min), 35 to 95% solvent B (105 to 107 min), and 95% solvent B (107 to 115 min) at a constant flow rate of 400 nL/min. The column temperature was controlled at 40°C. MS analysis of eluting peptides was performed in ddaPASEF mode (1.1-s cycle time) as recommended by the manufacturer.

(iv) MS data analysis. Mass spectrometry raw files were processed with MaxQuant (v.2.0.2.0) (58). A peptide search was performed against an ENSEMBL (59) *Sus scrofa* proteome database (v.11.1.2021-11-10) and an NCBI ASFV Georgia (v.FR682468.2) proteome database. The following modifications were included in the search parameters: trypsin digestion with a maximum of 2 missed cleavages, carbamidomethylation of cysteine as a fixed modification, and protein N-terminal acetylation and oxidation of methionine as variable modifications. Mass error tolerance was set to 20 ppm for the full scan (MS1) and 40 ppm for MS/MS (MS2) spectra. The false discovery rate (FDR) on the peptide and protein levels was set to 0.01, the minimum peptide length was seven amino acids, and the match-between-runs option was used with a 0.7-min match window and 20-min alignment time. The output files were analyzed using Perseus software (v.2.0.3.0) (60). Proteins identified only by modified peptides, reverse hits, and contaminants were filtered out. A protein was considered identified if at least 2 unique peptides of this protein were found in 50% of the replicates. Further filtering of proteins specifically binding to CP204L protein was achieved by comparing CP204L protein pulldown assays with the negative GFP control. iBAQ (intensity-based absolute quantitation) protein quantitation data were $\log_2$ transformed and filtered to contain a minimum of two valid values in at least one experiment. Missing values were imputed on the total matrix with default settings (width, 0.3; downshift, 1.8). Potential interactors were considered CP204L specific if they were identified only in CP204L pulldown assays or if the $\log_2$ fold change (between control and CP204L) was greater than 2 and the *q* value of a two-sided *t* test was <0.01.

GO overrepresentation and network analysis. The data sets obtained for the CP204L interactome in mock-infected and ASFV-infected cells were tested for enrichment of Gene Ontology (GO) biological process terms (61). Porcine genes were assigned to their corresponding human orthologues using the R package gprofiler2 (v.0.2.1) (62). The overrepresentation analysis was performed using the enricher function of the clusterProfiler (v.4.2.2) (63) package in R with default parameters. Significant GO terms (adjusted *P* value < 0.01) were identified and further clustered based on their semantic similarity using the R package rrvgo (v.1.6.0) (64). Selected preys were manually curated, and the network diagram was plotted using Cytoscape (v.3.7.2) (65).

Antibodies. Rabbit antisera specific for ASFV CP204L, B646L, E183L (56), and A137R (our unpublished data) proteins were used at dilutions of 1:20,000 for immunoblotting. The primary antibodies used for immunoblotting included rabbit anti-GFP (Chromotek), rabbit anti-VPS39 (PA5-21104; Thermo Fisher), mouse anti-tubulin (B-5-1-2; Sigma-Aldrich), and mouse anti-GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; MCA4739; Bio-Rad). The secondary antibodies used were peroxidase-conjugated goat anti-mouse and anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch). The additional primary antibodies used for immunofluorescence were mouse anti-vimentin (MA1-06908; Thermo Fisher), rabbit anti-Rab7 (PA5-52369; Thermo Fisher), mouse anti-LAMP-1 (MCA2315GA; Bio-Rad), and rabbit anti-VPS11 (PA5-21854; Thermo Scientific). The secondary antibodies were Alexa Fluor 647-conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L) and goat anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen).

Immunoprecipitation. For immunoprecipitation of endogenous proteins, 4 μg of purified rabbit anti-VPS39 IgG antibody (PA5-21104; Thermo Fisher) or normal rabbit IgG (negative control) (2729; Cell Signaling) was conjugated to 50 μL Dynabeads protein G (Thermo Fisher) for 30 min at room temperature, followed by washing twice in IP buffer. Antibody-conjugated beads, or beads alone, were incubated with 500 μL whole-cell lysates of infected WSL (1×10^7 cells) in IP buffer for 1 h at room temperature. Beads were washed three times in IP buffer and eluted with SDS-PAGE loading dye at 95°C for 5 min. Immunoprecipitation of ASFV CP204L was examined by SDS-PAGE, followed by immunoblotting.

Immunoblotting. Beads and whole-cell lysates were boiled in IP buffer, resolved on SDS-PAGE gels (4 to 20% Mini-Protean TGX gels (Bio-Rad) (66), and transferred to the nitrocellulose membrane by semi-dry transfer (Trans-Blot Turbo; Bio-Rad Laboratories) (67). All membranes were blocked in 5% milk powder in Tris-buffered saline with 0.25% Tween 20 (TBST) and probed overnight with the indicated primary antibodies using appropriate dilutions. This was followed by three 10-min washes in TBST and by incubation with peroxidase-conjugated secondary antibodies diluted in TBST. After 1 h, membranes were washed as described above, and protein bands were detected using the Clarity Western enhanced

chemiluminescence (ECL) substrate (Bio-Rad), imaged on a C-DiGit blot scanner (LI-COR), and analyzed with Image Studio software (v.5.2).

Immunofluorescence. Coverslips were fixed with 3.7% formaldehyde in PBS for 60 min at room temperature, washed 3 times for 10 min with PBS, permeabilized with 0.01% Triton X-100 in PBS for 15 min, and then blocked with PBS containing 10% FBS for 1 h. Coverslips were incubated with the primary antibody for 1 h at 37°C and then with the secondary antibody for 1 h at 37°C. Nuclei were stained for 15 min with 1 μg/mL Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) in PBS. After each step, the cells were repeatedly washed with PBS. Coverslips were then mounted on glass slides using ProLong Glass Antifade Mountant (Invitrogen). Single-slice images were acquired on a Leica DMI6000 TCS SP5 confocal laser scanning microscope (63× objective) and were processed with ImageJ software (v.1.52a) (68). For colocalization analysis, Pearson's coefficient (ImageJ Plugin JaCoP [69]) was used to quantify the degree of overlap between the stainings indicated in the confocal images.

Yeast two-hybrid analysis of the protein interaction. To identify the CP204L binding site, we used the yeast two-hybrid system. First, forward and reverse PCR primers were designed along the VPS39 sequence every 270 and 240 nucleotides. These primer sequences were fused to specific tails, allowing recombination in the Gal4-BD pDEST32 vector. The sequences of the specific tails were 5′-GAAGAGG TAGTAACAAAGGTCAAAGACAGTTGACTGTATCGTCGAGG-3′ and 5′-CCGCGGTGGCGGCCGTTACTTACTTAGAG CTCGACGTCTTACTTA-3′. Matrix combinations of forward and reverse primers were used to amplify VPS39 fragments by PCR. As previously described (70), 10 ng of linearized pDEST32 empty vector was cotransformed with 3 μL of PCR product to achieve recombinational cloning by gap repair in the Y2H Gold yeast strain (Clontech) expressing AD-fused CP204L (pPC86 vector). Interactions between VPS39 fragments and CP204L were tested by plating yeast cells on a selective medium lacking leucine, tryptophan, and histidine and supplemented with 5 mM 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT).

GST pulldown experiments. HEK-293T cells were dispensed into each well of a 6-well plate (2×10^6 cells) and 24 h later were transfected (JetPRIME; Polyplus) with 600 ng of pCI-neo-3xFLAG vector encoding porcine $VPS39^{271–541}$ with pDEST 27 (Invitrogen) expressing either GST alone (800 ng) or GST-CP204L (400 ng). Two days posttransfection, cells were collected in PBS and then incubated on ice in lysis buffer (20 mM morpholinepropanesulfonic acid [MOPS]-KOH [pH 7.4], 120 mM KCl, 0.5% Igepal, 2 mM β-mercaptoethanol, supplemented with complete protease inhibitor cocktail [Roche]) for 20 min. Cell lysates were clarified by centrifugation at 14,000 × *g* for 30 min. For pulldown analysis, protein extracts were incubated for 2 h at 4°C on a spinning wheel with 30 μL of glutathione-Sepharose beads (Amersham Biosciences). Beads were then washed 3 times for 5 min with ice-cold lysis buffer and on a spinning wheel, and proteins were recovered by boiling in denaturing loading buffer (Invitrogen).

Purified complexes and protein extracts were boiled at 95°C for 5 min and resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 4 to 12% NuPAGE bis-Tris gels with Bolt morpholineethanesulfonic acid (MES) SDS running buffer and transferred to a nitrocellulose membrane under wet conditions (Invitrogen). GST- and 3×FLAG-tagged proteins were detected with a rabbit polyclonal anti-GST antibody (1:2,500; Sigma-Aldrich) and a mouse monoclonal horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-FLAG antibody (M2; 1:10,000; Sigma-Aldrich), respectively. Secondary anti-rabbit HRP-conjugated antibody was purchased from Invitrogen (1:5,000). Nitrocellulose membrane was then incubated with a peroxidase substrate (Clarity Western ECL substrate; Bio-Rad) and visualized with the ChemiDoc MP imaging system (Bio-Rad).

Generation of CRISPR-Cas9 knockout cell lines. To generate VPS39 knockout cells, suitable CRISPR/Cas9 target sites were identified within the first 5′-terminal exons present in all predicted mRNA splice variants of the VPS39 gene (GenBank accession no. NC_010443), and corresponding oligonucleotides were synthesized (Eurofins Genomics). The complementary oligonucleotide pair VPS39porc-gR3F and VPS39porc-gR3F, as well as VPS39porc-gR4F and VPS39porc-gR4F (Table S1), was phosphorylated and cloned into the BpiI-digested and dephosphorylated single guide RNA (sgRNA) and Cas9 nuclease expression vector pX330A-1x4neoR (our unpublished results). After verifying the correct sequence insertions, the resulting plasmids pX330-VPS39gR3neoR and pX330-VPS39gR4neoR were used to transfect WSL cells, and single Geneticin-resistant cell clones were selected with a medium containing 500 μg/mL G418 and tested for expression of the FLAG-tagged Cas9 nuclease by Western blot analyses of cell lysates using the monoclonal anti-FLAG M2 antibody (Sigma/Merck) as described previously (56).

Genomic DNA of Cas9-expressing cell clones was prepared (71) and tested for the presence of the desired sgRNA genes by PCR amplification and sequencing using primers X330GGR-F2 and X330GGR-R2 (Table S1), the BigDye Terminator v1.1 cycle sequencing kit, and an Applied Biosystems 3500 genetic analyzer (Thermo Fisher Scientific). Furthermore, genomic DNA of the cell clones was analyzed for CRISPR/Cas9-induced mutations by PCR amplification and sequencing of the targeted VPS39 gene regions using primers VPS39gR3T-136F and VPS39gR3T-950R, or VPS39gR4T-147F and VPS39gR4T-1003R, respectively (Table S1). Sequences were evaluated using the Geneious Prime 2021.0.1 software package (Biomatters [https://www.geneious.com]).

Similarly, a single cell clone was generated with an empty Cas9 nuclease expression vector pX330A-1x4neoR as a control (CTRL-KO). The absence of VPS39 in knockout cells was further confirmed by LC-MS/MS analysis. Lysates of WSL KO and control cells (100 μg) were prepared using the Thermo EasyPep Mini MS sample preparation kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. Dried peptides were reconstituted in 0.1% formic acid to a final concentration of 100 ng/μL. Peptides corresponding to 200 ng protein were measured by LC-MS/MS and analyzed as described in "MS Data Analysis."

Data availability. All mass spectrometry raw data and MaxQuant output tables were deposited in the ProteomeXchange Consortium (http://proteomecentral.proteomexchange.org) via the PRIDE partner repository (72) (identifier PXD035695).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.1 MB.

SUPPLEMENTAL FILE 2, XLSX file, 0.6 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Biobank of the Friedrich-Loeffler-Institut for providing the WSL cell line. We also thank Barbara Bettin and Christin Milde for their technical assistance. We are grateful to Chris Netherton (Pirbright Institute) for critical reading of the manuscript.

This work was supported by research grants from European Commission, Horizon 2020 Framework Program European Union ERA-NET project ASFVInt, grant agreement 862605, and FLI's ASFV Research Network. J.D. is supported by a Ph.D. fellowship from ANSES and INRAE.

T.C.M. and A.K. conceived and designed the study. S.B., T.C.M., and A.K. acquired funding and resources. A.K. supervised the study. K.M.D., W.F., G.C., J.D., and K.P. contributed to the methodology and investigation. K.M.D. wrote the first draft. K.M.D. and A.K. reviewed and edited the article. All authors read and approved the manuscript.

REFERENCES

1. Montgomery RE. 1921. On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony). J Comp Pathol Therapeut 34:159–191. https://doi.org/10.1016/S0368-1742(21)80031-4.
2. Gabriel C, Blome S, Malogolovkin A, Parilov S, Kolbasov D, Teifke JP, Beer M. 2011. Characterization of African swine fever virus Caucasus isolate in European wild boars. Emerg Infect Dis 17:2342–2345. https://doi.org/10.3201/eid1712.110430.
3. Gallardo C, Soler A, Nieto R, Cano C, Pelayo V, Sánchez MA, Pridotkas G, Fernandez-Pinero J, Briones V, Arias M. 2017. Experimental infection of comestic pigs with African swine fever virus Lithuania 2014 genotype II field isolate. Transbound Emerg Dis 64:300–304. https://doi.org/10.1111/tbed.12346.
4. You S, Liu T, Zhang M, Zhao X, Dong Y, Wu B, Wang Y, Li J, Wei X, Shi B. 2021. African swine fever outbreaks in China led to gross domestic product and economic losses. Nat Food 2:802–808. https://doi.org/10.1038/s43016-021-00362-1.
5. Wöhnke E, Fuchs W, Hartmann L, Blohm U, Blome S, Mettenleiter TC, Karger A. 2021. Comparison of the proteomes of porcine macrophages and a stable porcine cell line after infection with African swine fever virus. Viruses 13:2198. https://doi.org/10.3390/v13112198.
6. Keßler C, Forth JH, Keil GM, Mettenleiter TC, Blome S, Karger A. 2018. The intracellular proteome of African swine fever virus. Sci Rep 8:14714. https://doi.org/10.1038/s41598-018-32985-z.
7. Alejo A, Matamoros T, Guerra M, Andrés G. 2018. A proteomic atlas of the African swine fever virus particle. J Virol 92:e01293-18. https://doi.org/10.1128/JVI.01293-18.
8. Gómez-Villamandos JC, Hervás J, Méndez A, Carrasco L, Villeda CJ, Wilkinson PJ, Sierra MA. 1995. Ultrastructural study of the renal tubular system in acute experimental African swine fever: virus replication in glomerular mesangial cells and in the collecting ducts. Arch Virol 140:581–589. https://doi.org/10.1007/BF01718433.
9. Kleiboeker SB, Scoles GA, Burrage TG, Sur J. 1999. African swine fever virus replication in the midgut epithelium is required for infection of Ornithodoros ticks. J Virol 73:8587–8598. https://doi.org/10.1128/JVI.73.10.8587-8598.1999.
10. Hernaez B, Alonso C. 2010. Dynamin- and clathrin-dependent endocytosis in African swine fever virus entry. J Virol 84:2100–2109. https://doi.org/10.1128/JVI.01557-09.
11. Sánchez EG, Quintas A, Pérez-Núñez D, Nogal M, Barroso S, Carrascosa ÁL, Revilla Y. 2012. African swine fever virus uses macropinocytosis to enter host cells. PLoS Pathog 8:e1002754. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002754.
12. Basta S, Gerber H, Schaub A, Summerfield A, McCullough KC. 2010. Cellular processes essential for African swine fever virus to infect and replicate in primary macrophages. Vet Microbiol 140:9–17. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.015.
13. Cuesta-Geijo MA, Galindo I, Hernáez B, Quetglas JI, Dalmau-Mena I, Alonso C. 2012. Endosomal maturation, Rab7 GTPase and phosphoinositides in African swine fever virus entry. PLoS One 7:e48853. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048853.
14. Alcamí A, Carrascosa AL, Viñuela E. 1989. The entry of African swine fever virus into Vero cells. Virology 171:68–75. https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90511-4.
15. Hernáez B, Guerra M, Salas ML, Andrés G. 2016. African swine fever virus undergoes outer envelope disruption, capsid disassembly and inner envelope fusion before core release from multivesicular endosomes. PLoS Pathog 12:e1005595. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005595.
16. Castelló A, Quintas A, Sánchez EG, Sabina P, Nogal M, Carrasco L, Revilla Y. 2009. Regulation of host translational machinery by African swine fever virus. PLoS Pathog 5:e1000562. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000562.
17. Stefanovic S, Windsor M, Nagata K-I, Inagaki M, Wileman T. 2005. Vimentin rearrangement during African swine fever virus infection involves retrograde transport along microtubules and phosphorylation of vimentin by calcium calmodulin kinase II. J Virol 79:11766–11775. https://doi.org/10.1128/JVI.79.18.11766-11775.2005.
18. Aicher S-M, Monaghan P, Netherton CL, Hawes PC. 2021. Unpicking the secrets of African swine fever viral replication sites. Viruses 13:77. https://doi.org/10.3390/v13010077.
19. Cuesta-Geijo MÁ, Barrado-Gil L, Galindo I, Muñoz-Moreno R, Alonso C. 2017. Redistribution of endosomal membranes to the African swine fever virus replication site. Viruses 9:133. https://doi.org/10.3390/v9060133.
20. Alcaraz C, de Diego M, Pastor MJ, Escribano JM. 1990. Comparison of a radioimmunoprecipitation assay to immunoblotting and ELISA for detection of antibody to African swine fever virus. J Vet Diagn Invest 2:191–196. https://doi.org/10.1177/104063879000200307.
21. Hübner A, Petersen B, Keil GM, Niemann H, Mettenleiter TC, Fuchs W. 2018. Efficient inhibition of African swine fever virus replication by CRISPR/Cas9 targeting of the viral p30 gene (CP204L). Sci Rep 8:1449. https://doi.org/10.1038/s41598-018-19626-1.
22. Zheng Y, Li S, Li S-H, Yu S, Wang Q, Zhang K, Qu L, Sun Y, Bi Y, Tang F, Qiu H-J, Gao GF. 2022. Transcriptome profiling in swine macrophages infected with African swine fever virus at single-cell resolution. Proc Natl Acad Sci U S A 119:e2201288119. https://doi.org/10.1073/pnas.2201288119.
23. Cackett G, Matelska D, Sýkora M, Portugal R, Malecki M, Bähler J, Dixon L, Werner F. 2020. The African swine fever virus transcriptome. J Virol 94:e00119-20. https://doi.org/10.1128/JVI.00119-20.
24. Prados FJ, Viñuela E, Alcamí A. 1993. Sequence and characterization of the major early phosphoprotein p32 of African swine fever virus. J Virol 67:2475–2485. https://doi.org/10.1128/JVI.67.5.2475-2485.1993.
25. Afonso CL, Alcaraz C, Brun A, Sussman MD, Onisk DV, Escribano JM, Rock DL. 1992. Characterization of P30, a highly antigenic membrane and secreted protein of African swine fever virus. Virology 189:368–373. https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90718-5.
26. Hernaez B, Escribano JM, Alonso C. 2008. African swine fever virus protein p30 interaction with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP-K) during infection. FEBS Lett 582:3275–3280. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.08.031.

27. Chen X, Chen X, Liang Y, Xu S, Weng Z, Gao Q, Huang Z, Zhang G, Gong L. 2022. Interaction network of African swine fever virus structural protein p30 with host proteins. Front Microbiol 13:971888. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.971888.
28. Chapman DAG, Darby AC, Da Silva M, Upton C, Radford AD, Dixon LK. 2011. Genomic analysis of highly virulent Georgia 2007/1 isolate of African swine fever virus. Emerg Infect Dis 17:599–605. https://doi.org/10.3201/eid1704.101283.
29. Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y, Zerial M. 2005. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. Cell 122:735–749. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.043.
30. Jiang P, Nishimura T, Sakamaki Y, Itakura E, Hatta T, Natsume T, Mizushima N. 2014. The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. Mol Biol Cell 25:1327–1337. https://doi.org/10.1091/mbc.E13-08-0447.
31. Takáts S, Pircs K, Nagy P, Varga Á, Kárpáti M, Hegedűs K, Kramer H, Kovács AL, Sass M, Juhász G. 2014. Interaction of the HOPS complex with Syntaxin 17 mediates autophagosome clearance in Drosophila. Mol Biol Cell 25:1338–1354. https://doi.org/10.1091/mbc.E13-08-0449.
32. Blum M, Chang H-Y, Chuguransky S, Grego T, Kandasaamy S, Mitchell A, Nuka G, Paysan-Lafosse T, Qureshi M, Raj S, Richardson L, Salazar GA, Williams L, Bork P, Bridge A, Gough J, Haft DH, Letunic I, Marchler-Bauer A, Mi H, Natale DA, Necci M, Orengo CA, Pandurangan AP, Rivoire C, Sigrist CJA, Sillitoe I, Thanki N, Thomas PD, Tosatto SCE, Wu CH, Bateman A, Finn RD. 2021. The InterPro protein families and domains database: 20 years on. Nucleic Acids Res 49:D344–D354. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa977.
33. Mészáros B, Erdos G, Dosztányi Z. 2018. IUPred2A: context-dependent prediction of protein disorder as a function of redox state and protein binding. Nucleic Acids Res 46:W329–W337. https://doi.org/10.1093/nar/gky384.
34. Pols MS, ten Brink C, Gosavi P, Oorschot V, Klumperman J. 2013. The HOPS proteins hVps41 and hVps39 are required for homotypic and heterotypic late endosome fusion. Traffic 14:219–232. https://doi.org/10.1111/tra.12027.
35. Bröcker C, Kuhlee A, Gatsogiannis C, Balderhaar H, Hönscher C, Engelbrecht-Vandré S, Ungermann C, Raunser S. 2012. Molecular architecture of the multisubunit homotypic fusion and vacuole protein sorting (HOPS) tethering complex. Proc Natl Acad Sci U S A 109:1991–1996. https://doi.org/10.1073/pnas.1117797109.
36. Miller S, Krijnse-Locker J. 2008. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. Nat Rev Microbiol 6:363–374. https://doi.org/10.1038/nrmicro1890.
37. Galindo I, Cuesta-Geijo MÁ, Del Puerto A, Soriano E, Alonso C. 2019. Lipid exchange factors at membrane contact sites in African swine fever virus infection. Viruses 11:199. https://doi.org/10.3390/v11030199.
38. Sun M, Yu S, Ge H, Wang T, Li Y, Zhou P, Pan L, Han Y, Yang Y, Sun Y, Li S, Li L-F, Qiu H-J. 2022. The A137R protein of African swine fever virus inhibits type I interferon production via the autophagy-mediated lysosomal degradation of TBK1. J Virol 96:e01957-21. https://doi.org/10.1128/jvi.01957-21.
39. González Montoro A, Auffarth K, Hönscher C, Bohnert M, Becker T, Warscheid B, Reggiori F, van der Laan M, Fröhlich F, Ungermann C. 2018. Vps39 interacts with Tom40 to establish one of two functionally distinct vacuole-mitochondria contact sites. Dev Cell 45:621–636.E7. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.05.011.
40. Jackson J, Wischhof L, Scifo E, Pellizzer A, Wang Y, Piazzesi A, Gentile D, Siddig S, Stork M, Hopkins CE, Händler K, Weis J, Roos A, Schultze JL, Nicotera P, Ehninger D, Bano D. 2022. SGPL1 stimulates VPS39 recruitment to the mitochondria in MICU1 deficient cells. Mol Metab 61:101503. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101503.
41. Laufman O, Perrino J, Andino R. 2019. Viral generated inter-organelle contacts redirect lipid flux for genome replication. Cell 178:275–289.E16. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.030.
42. Wong LH, Edgar JR, Martello A, Ferguson BJ, Eden ER. 2021. Exploiting connections for viral replication. Front Cell Dev Biol 9:640456. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.640456.
43. Ostrowicz CW, Bröcker C, Ahnert F, Nordmann M, Lachmann J, Peplowska K, Perz A, Auffarth K, Engelbrecht-Vandré S, Ungermann C. 2010. Defined subunit arrangement and rab interactions are required for functionality of the HOPS tethering complex. Traffic 11:1334–1346. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01097.x.
44. Andrés G, Simón-Mateo C, Viñuela E. 1993. Characterization of two African swine fever virus 220-kDa proteins: a precursor of the major structural protein p150 and an oligomer of phosphoprotein p32. Virology 194:284–293. https://doi.org/10.1006/viro.1993.1259.
45. Caplan S, Hartnell LM, Aguilar RC, Naslavsky N, Bonifacino JS. 2001. Human Vam6p promotes lysosome clustering and fusion in vivo. J Cell Biol 154:109–122. https://doi.org/10.1083/jcb.200102142.
46. Scianimanico S, Schoehn G, Timmins J, Ruigrok RH, Klenk HD, Weissenhorn W. 2000. Membrane association induces a conformational change in the Ebola virus matrix protein. EMBO J 19:6732–6741. https://doi.org/10.1093/emboj/19.24.6732.
47. Hilsch M, Goldenbogen B, Sieben C, Höfer CT, Rabe JP, Klipp E, Herrmann A, Chiantia S. 2014. Influenza A matrix protein M1 multimerizes upon binding to lipid membranes. Biophys J 107:912–923. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.06.042.
48. Gutsche I, Coulibaly F, Voss JE, Salmon J, d'Alayer J, Ermonval M, Larquet E, Charneau P, Krey T, Mégret F, Guittet E, Rey FA, Flamand M. 2011. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. Proc Natl Acad Sci U S A 108:8003–8008. https://doi.org/10.1073/pnas.1017338108.
49. Jayaraman B, Smith AM, Fernandes JD, Frankel AD. 2016. Oligomeric viral proteins: small in size, large in presence. Crit Rev Biochem Mol Biol 51:379–394. https://doi.org/10.1080/10409238.2016.1215406.
50. Yáñez RJ, Rodríguez JM, Nogal ML, Yuste L, Enríquez C, Rodriguez JF, Viñuela E. 1995. Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus. Virology 208:249–278. https://doi.org/10.1006/viro.1995.1149.
51. Miao G, Zhao H, Li Y, Ji M, Chen Y, Shi Y, Bi Y, Wang P, Zhang H. 2021. ORF3a of the COVID-19 virus SARS-CoV-2 blocks HOPS complex-mediated assembly of the SNARE complex required for autolysosome formation. Dev Cell 56:427–442.E5. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.12.010.
52. Zhang Y, Sun H, Pei R, Mao B, Zhao Z, Li H, Lin Y, Lu K. 2021. The SARS-CoV-2 protein ORF3a inhibits fusion of autophagosomes with lysosomes. Cell Discov 7:31. https://doi.org/10.1038/s41421-021-00268-z.
53. van der Kant R, Jonker CTH, Wijdeven RH, Bakker J, Janssen L, Klumperman J, Neefjes J. 2015. Characterization of the mammalian CORVET and HOPS complexes and their modular restructuring for endosome specificity. J Biol Chem 290:30280–30290. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.688440.
54. Keil GM, Giesow K, Portugal R. 2014. A novel bromodeoxyuridine-resistant wild boar lung cell line facilitates generation of African swine fever virus recombinants. Arch Virol 159:2421–2428. https://doi.org/10.1007/s00705-014-2095-2.
55. Reed LJ, Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoint. Am J Epidemiol 27:493–497. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.
56. Hübner A, Keil GM, Kabuuka T, Mettenleiter TC, Fuchs W. 2018. Efficient transgene insertion in a pseudorabies virus vector by CRISPR/Cas9 and marker rescue-enforced recombination. J Virol Methods 262:38–47. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.09.009.
57. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. 2009. Universal sample preparation method for proteome analysis. Nat Methods 6:359–362. https://doi.org/10.1038/nmeth.1322.
58. Cox J, Mann M. 2008. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. Nat Biotechnol 26:1367–1372. https://doi.org/10.1038/nbt.1511.
59. Aken BL, Achuthan P, Akanni W, Amode MR, Bernsdorff F, Bhai J, Billis K, Carvalho-Silva D, Cummins C, Clapham P, Gil L, Girón CG, Gordon L, Hourlier T, Hunt SE, Janacek SH, Juettemann T, Keenan S, Laird MR, Lavidas I, Maurel T, McLaren W, Moore B, Murphy DN, Nag R, Newman V, Nuhn M, Ong CK, Parker A, Patricio M, Riat HS, Sheppard D, Sparrow H, Taylor K, Thormann A, Vullo A, Walts B, Wilder SP, Zadissa A, Kostadima M, Martin FJ, Muffato M, Perry E, Ruffier M, Staines DM, Trevanion SJ, Cunningham F, Yates A, Zerbino DR, Flicek P. 2017. Ensembl 2017. Nucleic Acids Res 45:D635–D642. https://doi.org/10.1093/nar/gkw1104.
60. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, Mann M, Cox J. 2016. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. Nat Methods 13:731–740. https://doi.org/10.1038/nmeth.3901.
61. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nat Genet 25:25–29. https://doi.org/10.1038/75556.
62. Kolberg L, Raudvere U, Kuzmin I, Vilo J, Peterson H. 2020. gprofiler2 – an R package for gene list functional enrichment analysis and namespace conversion toolset g:Profiler. F1000Res 9:ELIXIR-709. https://doi.org/10.12688/f1000research.24956.2.
63. Wu T, Hu E, Xu S, Chen M, Guo P, Dai Z, Feng T, Zhou L, Tang W, Zhan L, Fu X, Liu S, Bo X, Yu G. 2021. clusterProfiler 4.0: a universal enrichment

tool for interpreting omics data. Innovation (Camb) 2:100141. https://doi.org/10.1016/j.xinn.2021.100141.
64. Sayols S. 2020. rrvgo. Bioconductor.
65. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. Genome Res 13:2498–2504. https://doi.org/10.1101/gr.1239303.
66. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680–685. https://doi.org/10.1038/227680a0.
67. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A 76:4350–4354. https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350.
68. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Methods 9:671–675. https://doi.org/10.1038/nmeth.2089.
69. Bolte S, Cordelières FP. 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. J Microsc 224:213–232. https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x.
70. Walhout AJ, Vidal M. 2001. High-throughput yeast two-hybrid assays for large-scale protein interaction mapping. Methods 24:297–306. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1190.
71. Fuchs W, Mettenleiter TC. 1996. DNA sequence and transcriptional analysis of the UL1 to UL5 gene cluster of infectious laryngotracheitis virus. J Gen Virol 77:2221–2229. https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-9-2221.
72. Vizcaíno JA, Deutsch EW, Wang R, Csordas A, Reisinger F, Ríos D, Dianes JA, Sun Z, Farrah T, Bandeira N, Binz P-A, Xenarios I, Eisenacher M, Mayer G, Gatto L, Campos A, Chalkley RJ, Kraus H-J, Albar JP, Martinez-Bartolomé S, Apweiler R, Omenn GS, Martens L, Jones AR, Hermjakob H. 2014. ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination. Nat Biotechnol 32:223–226. https://doi.org/10.1038/nbt.2839.

BIBLIOGRAPHIE

1. Montgomery RE. 1921. On A Form of Swine Fever Occurring in British East Africa (Kenya Colony). J Comp Pathol Ther 34:159–191.
2. Jori F, Vial L, Penrith ML, Pérez-Sánchez R, Etter E, Albina E, Michaud V, Roger F. 2013. Review of the sylvatic cycle of African swine fever in sub-Saharan Africa and the Indian ocean. 1. Virus Res 173:212–227.
3. Michaud V, Randriamparany T, Albina E. 2013. Comprehensive Phylogenetic Reconstructions of African Swine Fever Virus: Proposal for a New Classification and Molecular Dating of the Virus. PLOS ONE 8:e69662.
4. Alkhamis MA, Gallardo C, Jurado C, Soler A, Arias M, Sánchez-Vizcaíno JM. 2018. Phylodynamics and evolutionary epidemiology of African swine fever p72-CVR genes in Eurasia and Africa. PloS One 13:e0192565.
5. Penrith ML, Kivaria FM. 2022. One hundred years of African swine fever in Africa: Where have we been, where are we now, where are we going? Transbound Emerg Dis 69:e1179–e1200.
6. Mulumba-Mfumu LK, Saegerman C, Dixon LK, Madimba KC, Kazadi E, Mukalakata NT, Oura CAL, Chenais E, Masembe C, Ståhl K, Thiry E, Penrith ML. 2019. African swine fever: Update on Eastern, Central and Southern Africa. Transbound Emerg Dis 66:1462–1480.
7. Penrith M-L, Bastos AD, Etter EMC, Beltrán-Alcrudo D. 2019. Epidemiology of African swine fever in Africa today: Sylvatic cycle versus socio-economic imperatives. Transbound Emerg Dis 66:672–686.
8. Wilkinson, P.J, Dixon, L., Sumption, K., Ekue, F, Hutchings, G, Payne, A, Boinas, F. 1993. Genetic variation and epidemiology of African swine fever in Europe and Africa. Int Congr Virol Glasg UK 223.
9. Caiado JM, Boinas FS, Louza AC. 1988. Epidemiological research of African swine fever (ASF) in Portugal: the role of vectors and virus reservoirs. Acta Vet Scand Suppl 84:136–138.
10. Boinas FS, Wilson AJ, Hutchings GH, Martins C, Dixon LJ. 2011. The persistence of African swine fever virus in field-infected Ornithodoros erraticus during the ASF endemic period in Portugal. 5. PloS One 6:e20383.
11. Rose N, Le Potier M-F. 2020. L'épizootie de Peste Porcine Africaine : caractéristiques virologiques et épidémiologiques. Journ Rech Porc 52:293–302.
12. Cappai S, Rolesu S, Coccollone A, Laddomada A, Loi F. 2018. Evaluation of biological and socio-economic factors related to persistence of African swine fever in Sardinia. Prev Vet Med 152:1–11.
13. Laddomada A, Rolesu S, Loi F, Cappai S, Oggiano A, Madrau MP, Sanna ML, Pilo G, Bandino E, Brundu D, Cherchi S, Masala S, Marongiu D, Bitti G, Desini P, Floris V, Mundula L, Carboni G, Pittau M, Feliziani F, Sanchez-Vizcaino JM, Jurado C, Guberti V, Chessa M, Muzzeddu M, Sardo D, Borrello S, Mulas D, Salis G, Zinzula P, Piredda S, De Martini A, Sgarangella F. 2019. Surveillance and control of African Swine Fever in free-ranging pigs in Sardinia. 3. Transbound Emerg Dis 66:1114–1119.
14. Costard S, Wieland B, de Glanville W, Jori F, Rowlands R, Vosloo W, Roger F, Pfeiffer DU, Dixon LK. 2009. African swine fever: how can global spread be prevented? Philos Trans R Soc B Biol Sci 364:2683–2696.
15. Rowlands RJ, Michaud V, Heath L, Hutchings G, Oura C, Vosloo W, Dwarka R, Onashvili T, Albina E, Dixon LK. 2008. African swine fever virus isolate, Georgia, 2007. 12. Emerg Infect Dis 14:1870–1874.
16. Cwynar P, Stojkov J, Wlazlak K. 2019. African Swine Fever Status in Europe. 4. Viruses 11:310.

17. Gulenkin VM, Korennoy FI, Karaulov AK, Dudnikov SA. 2011. Cartographical analysis of African swine fever outbreaks in the territory of the Russian Federation and computer modeling of the basic reproduction ratio. Prev Vet Med 102:167–174.
18. Woźniakowski G, Pejsak Z, Jabłoński A. 2021. Emergence of African Swine Fever in Poland (2014–2021). Successes and Failures in Disease Eradication. 8. Agriculture 11:738.
19. Dellicour S, Desmecht D, Paternostre J, Malengreaux C, Licoppe A, Gilbert M, Linden A. 2020. Unravelling the dispersal dynamics and ecological drivers of the African swine fever outbreak in Belgium. J Appl Ecol 57:1619–1629.
20. Sauter-Louis C, Forth JH, Probst C, Staubach C, Hlinak A, Rudovsky A, Holland D, Schlieben P, Göldner M, Schatz J, Bock S, Fischer M, Schulz K, Homeier-Bachmann T, Plagemann R, Klaaß U, Marquart R, Mettenleiter TC, Beer M, Conraths FJ, Blome S. 2021. Joining the club: First detection of African swine fever in wild boar in Germany. Transbound Emerg Dis 68:1744–1752.
21. Sauter-Louis C, Schulz K, Richter M, Staubach C, Mettenleiter TC, Conraths FJ. 2022. African swine fever: Why the situation in Germany is not comparable to that in the Czech Republic or Belgium. Transbound Emerg Dis 69:2201–2208.
22. Cole L, Stepien M. USDA APHIS | USDA Statement on Confirmation of African Swine Fever in the Dominican Republic. https://www.aphis.usda.gov/aphis/newsroom/news/sa_by_date/sa-2021/asf-confirm. Retrieved 22 September 2023.
23. Zhou X, Li N, Luo Y, Liu Y, Miao F, Chen T, Zhang S, Cao P, Li X, Tian K, Qiu H-J, Hu R. 2018. Emergence of African Swine Fever in China, 2018. Transbound Emerg Dis 65:1482–1484.
24. Bao J, Wang Q, Lin P, Liu C, Li L, Wu X, Chi T, Xu T, Ge S, Liu Y, Li J, Wang S, Qu H, Jin T, Wang Z. 2019. Genome comparison of African swine fever virus China/2018/AnhuiXCGQ strain and related European p72 Genotype II strains. Transbound Emerg Dis 66:1167–1176.
25. Gaudreault NN, Madden DW, Wilson WC, Trujillo JD, Richt JA. 2020. African Swine Fever Virus: An Emerging DNA Arbovirus. Front Vet Sci 7:215.
26. Gavier-Widén D, Ståhl K, Dixon L. 2020. No hasty solutions for African swine fever. Science 367:622–624.
27. You S, Liu T, Zhang M, Zhao X, Dong Y, Wu B, Wang Y, Li J, Wei X, Shi B. 2021. African swine fever outbreaks in China led to gross domestic product and economic losses. 10. Nat Food 2:802–808.
28. Mighell E, Ward MP. 2021. African Swine Fever spread across Asia, 2018–2019. Transbound Emerg Dis 68:2722–2732.
29. Dixon LK, Sun H, Roberts H. 2019. African swine fever. Antiviral Res 165:34–41.
30. Chenais E, Ståhl K, Guberti V, Depner K. 2018. Identification of Wild Boar–Habitat Epidemiologic Cycle in African Swine Fever Epizootic. Emerg Infect Dis 24:810–812.
31. Dixon LK, Stahl K, Jori F, Vial L, Pfeiffer DU. 2020. African Swine Fever Epidemiology and Control. 1. Annu Rev Anim Biosci 8:221–246.
32. Thomson GR, Gainaru MD, Van Dellen AF. 1980. Experimental infection of warthos (Phacochoerus aethiopicus) with African swine fever virus. Onderstepoort J Vet Res 47:19–22.
33. Jori F, Bastos ADS. 2009. Role of wild suids in the epidemiology of African swine fever. EcoHealth 6:296–310.
34. Jori F, Bastos A, Boinas F, Van Heerden J, Heath L, Jourdan-Pineau H, Martinez-Lopez B, Pereira de Oliveira R, Pollet T, Quembo C, Rea K, Simulundu E, Taraveau F, Penrith M-L. 2023. An Updated Review of Ornithodoros Ticks as Reservoirs of African Swine Fever in Sub-Saharan Africa and Madagascar. 3. Pathogens 12:469.

35. Anderson EC, Hutchings GH, Mukarati N, Wilkinson PJ. 1998. African swine fever virus infection of the bushpig (Potamochoerus porcus) and its significance in the epidemiology of the disease. Vet Microbiol 62:1–15.
36. Costard S, Mur L, Lubroth J, Sanchez-Vizcaino JM, Pfeiffer DU. 2013. Epidemiology of African swine fever virus. Virus Res 173:191–197.
37. Vial L, Ducheyne E, Filatov S, Gerilovych A, McVey DS, Sindryakova I, Morgunov S, Pérez de León AA, Kolbasov D, De Clercq EM. 2018. Spatial multi-criteria decision analysis for modelling suitable habitats of Ornithodoros soft ticks in the Western Palearctic region. Vet Parasitol 249:2–16.
38. Oliveira RP de, Hutet E, Paboeuf F, Duhayon M, Boinas F, Leon AP de, Filatov S, Vial L, Potier M-FL. 2019. Comparative vector competence of the Afrotropical soft tick Ornithodoros moubata and Palearctic species, O. erraticus and O. verrucosus, for African swine fever virus strains circulating in Eurasia. PLOS ONE 14:e0225657.
39. Chen Z, Yang X, Bu F, Yang X, Yang X, Liu J. 2010. Ticks (Acari: Ixodoidea: Argasidae, Ixodidae) of China. Exp Appl Acarol 51:393–404.
40. Kleiboeker SB, Burrage TG, Scoles GA, Fish D, Rock DL. 1998. African swine fever virus infection in the argasid host, Ornithodoros porcinus porcinus. 3. J Virol 72:1711–1724.
41. Plowright W, Perry CT, Peirce MA, Parker J. 1970. Experimental infection of the argasid tick, Ornithodoros moubata porcinus, with African swine fever virus. 1. Arch Gesamte Virusforsch 31:33–50.
42. Plowright W, Perry CT, Greig A. 1974. Sexual transmission of African swine fever virus in the tick, Ornithodoros moubata porcinus, Walton. 1. Res Vet Sci 17:106–113.
43. Hess WR, Endris RG, Lousa A, Caiado JM. 1989. Clearance of African swine fever virus from infected tick (Acari) colonies. 4. J Med Entomol 26:314–317.
44. Pereira De Oliveira R, Hutet E, Lancelot R, Paboeuf F, Duhayon M, Boinas F, Pérez de León AA, Filatov S, Le Potier M-F, Vial L. 2020. Differential vector competence of Ornithodoros soft ticks for African swine fever virus: What if it involves more than just crossing organic barriers in ticks? Parasit Vectors 13:618.
45. Kleiboeker SB, Scoles GA. 2001. Pathogenesis of African swine fever virus in Ornithodoros ticks. 2. Anim Health Res Rev 2:121–128.
46. Boinas FS, Wilson AJ, Hutchings GH, Martins C, Dixon LJ. 2011. The persistence of African swine fever virus in field-infected Ornithodoros erraticus during the ASF endemic period in Portugal. PloS One 6:e20383.
47. Forth JH, Forth LF, Lycett S, Bell-Sakyi L, Keil GM, Blome S, Calvignac-Spencer S, Wissgott A, Krause J, Höper D, Kampen H, Beer M. 2020. Identification of African swine fever virus-like elements in the soft tick genome provides insights into the virus' evolution. BMC Biol 18:136.
48. Quembo CJ, Jori F, Vosloo W, Heath L. 2018. Genetic characterization of African swine fever virus isolates from soft ticks at the wildlife/domestic interface in Mozambique and identification of a novel genotype. Transbound Emerg Dis 65:420–431.
49. Bastos ADS, Penrith M-L, Crucière C, Edrich JL, Hutchings G, Roger F, Couacy-Hymann E, R.Thomson G. 2003. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. Arch Virol 148:693–706.
50. Burrage TG, Lu Z, Neilan JG, Rock DL, Zsak L. 2004. African Swine Fever Virus Multigene Family 360 Genes Affect Virus Replication and Generalization of Infection in *Ornithodoros porcinus* Ticks. 5. J Virol 78:2445–2453.

51. Rowlands RJ, Duarte MM, Boinas F, Hutchings G, Dixon LK. 2009. The CD2v protein enhances African swine fever virus replication in the tick vector, Ornithodoros erraticus. 2. Virology 393:319–328.
52. Guinat C, Gogin A, Blome S, Keil G, Pollin R, Pfeiffer DU, Dixon L. 2016. Transmission routes of African swine fever virus to domestic pigs: current knowledge and future research directions. 11. Vet Rec 178:262–267.
53. Davies K, Goatley LC, Guinat C, Netherton CL, Gubbins S, Dixon LK, Reis AL. 2017. Survival of African Swine Fever Virus in Excretions from Pigs Experimentally Infected with the Georgia 2007/1 Isolate. Transbound Emerg Dis 64:425–431.
54. Olesen AS, Lohse L, Boklund A, Halasa T, Gallardo C, Pejsak Z, Belsham GJ, Rasmussen TB, Bøtner A. 2017. Transmission of African swine fever virus from infected pigs by direct contact and aerosol routes. Vet Microbiol 211:92–102.
55. Gogin A, Gerasimov V, Malogolovkin A, Kolbasov D. 2013. African swine fever in the North Caucasus region and the Russian Federation in years 2007-2012. Virus Res 173:198–203.
56. Howey EB, O'Donnell V, de Carvalho Ferreira HC, Borca MV, Arzt J. 2013. Pathogenesis of highly virulent African swine fever virus in domestic pigs exposed via intraoropharyngeal, intranasopharyngeal, and intramuscular inoculation, and by direct contact with infected pigs. Virus Res 178:328–339.
57. Schulz K, Conraths FJ, Blome S, Staubach C, Sauter-Louis C. 2019. African Swine Fever: Fast and Furious or Slow and Steady? Viruses 11:866.
58. Chenais E, Depner K, Guberti V, Dietze K, Viltrop A, Ståhl K. 2019. Epidemiological considerations on African swine fever in Europe 2014–2018. Porc Health Manag 5:6.
59. Probst C, Globig A, Knoll B, Conraths FJ, Depner K. 2017. Behaviour of free ranging wild boar towards their dead fellows: potential implications for the transmission of African swine fever. R Soc Open Sci 4:170054.
60. Blome S, Gabriel C, Beer M. 2013. Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar. 1. Virus Res 173:122–130.
61. Sánchez-Vizcaíno JM, Mur L, Gomez-Villamandos JC, Carrasco L. 2015. An Update on the Epidemiology and Pathology of African Swine Fever. 1. J Comp Pathol 152:9–21.
62. Quintero JC, Wesley RD, Whyard TC, Gregg D, Mebus CA. 1986. In vitro and in vivo association of African swine fever virus with swine erythrocytes. Am J Vet Res 47:1125–1131.
63. Gómez-Villamandos JC, Hervás J, Méndez A, Carrasco L, de las Mulas JM, Villeda CJ, Wilkinson PJ, Sierra MA. 1995. Experimental African swine fever: apoptosis of lymphocytes and virus replication in other cells. J Gen Virol 76:2399–2405.
64. Carrasco L, Chacón-M. de Lara F, Martín de las Mulas J, Gómez-Villamandos JC, Pérez J, Wilkinson PJ, Sierra MA. 1996. Apoptosis in lymph nodes in acute African swine fever. J Comp Pathol 115:415–428.
65. Salguero FJ. 2020. Comparative Pathology and Pathogenesis of African Swine Fever Infection in Swine. Front Vet Sci 7.
66. Alonso C, Borca M, Dixon L, Revilla Y, Rodriguez F, Escribano JM, Ictv Report Consortium null. 2018. ICTV Virus Taxonomy Profile: Asfarviridae. 5. J Gen Virol 99:613–614.
67. Iyer LM, Balaji S, Koonin EV, Aravind L. 2006. Evolutionary genomics of nucleo-cytoplasmic large DNA viruses. Virus Res 117:156–184.
68. Andreani J, Khalil JYB, Sevvana M, Benamar S, Di Pinto F, Bitam I, Colson P, Klose T, Rossmann

MG, Raoult D, La Scola B. 2017. Pacmanvirus, a New Giant Icosahedral Virus at the Crossroads between Asfarviridae and Faustoviruses. 14. J Virol 91.
69. Reteno DG, Benamar S, Khalil JB, Andreani J, Armstrong N, Klose T, Rossmann M, Colson P, Raoult D, La Scola B. 2015. Faustovirus, an Asfarvirus-Related New Lineage of Giant Viruses Infecting Amoebae. 13. J Virol 89:6585–6594.
70. Bajrai LH, Benamar S, Azhar EI, Robert C, Levasseur A, Raoult D, La Scola B. 2016. Kaumoebavirus, a New Virus That Clusters with Faustoviruses and Asfarviridae. Viruses 8:278.
71. Matsuyama T, Takano T, Nishiki I, Fujiwara A, Kiryu I, Inada M, Sakai T, Terashima S, Matsuura Y, Isowa K, Nakayasu C. 2020. A novel Asfarvirus-like virus identified as a potential cause of mass mortality of abalone. Sci Rep 10:4620.
72. Matsuyama T, Kiryu I, Mekata T, Takano T, Umeda K, Matsuura Y. 2023. Pathogenicity, genomic analysis and structure of abalone asfa-like virus: evidence for classification in the family Asfarviridae. J Gen Virol 104:001875.
73. Hannat S, La Scola B, Andreani J, Aherfi S. 2023. Asfarviruses and Closely Related Giant Viruses. Viruses 15:1015.
74. Malogolovkin A, Burmakina G, Titov I, Sereda A, Gogin A, Baryshnikova E, Kolbasov D. Comparative Analysis of African Swine Fever Virus Genotypes and Serogroups - Volume 21, Number 2—February 2015 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC https://doi.org/10.3201/eid2102.140649.
75. Li Z, Chen W, Qiu Z, Li Y, Fan J, Wu K, Li X, Zhao M, Ding H, Fan S, Chen J. 2022. African Swine Fever Virus: A Review. Life 12:1255.
76. Salas ML, Andrés G. 2013. African swine fever virus morphogenesis. 1. Virus Res 173:29–41.
77. Wang N, Zhao D, Wang J, Zhang Y, Wang M, Gao Y, Li F, Wang J, Bu Z, Rao Z, Wang X. 2019. Architecture of African swine fever virus and implications for viral assembly. Science 366:640–644.
78. Alejo A, Matamoros T, Guerra M, Andrés G. 2018. A Proteomic Atlas of the African Swine Fever Virus Particle. J Virol 92:e01293-18.
79. Breese SS, DeBoer CJ. 1966. Electron microscope observations of African swine fever virus in tissue culture cells. Virology 28:420–428.
80. Galindo I, Viñuela E, Carrascosa AL. 1997. Protein cell receptors mediate the saturable interaction of African swine fever virus attachment protein p12 with the surface of permissive cells. Virus Res 49:193–204.
81. Rodríguez JM, Yáñez RJ, Almazán F, Viñuela E, Rodriguez JF. 1993. African swine fever virus encodes a CD2 homolog responsible for the adhesion of erythrocytes to infected cells. J Virol 67:5312–5320.
82. Carrascosa JL, Carazo JM, Carrascosa AL, García N, Santisteban A, Viñuela E. 1984. General morphology and capsid fine structure of African swine fever virus particles. 1. Virology 132:160–172.
83. García-Escudero R, Andrés G, Almazán F, Viñuela E. 1998. Inducible Gene Expression from African Swine Fever Virus Recombinants: Analysis of the Major Capsid Protein p72. J Virol 72:3185–3195.
84. Rouiller I, Brookes SM, Hyatt AD, Windsor M, Wileman T. 1998. African Swine Fever Virus Is Wrapped by the Endoplasmic Reticulum. J Virol 72:2373–2387.
85. Suárez C, Gutiérrez-Berzal J, Andrés G, Salas ML, Rodríguez JM. 2010. African swine fever virus protein p17 is essential for the progression of viral membrane precursors toward icosahedral intermediates. J Virol 84:7484–7499.

86. Andrés G, Simón-Mateo C, Viñuela E. 1997. Assembly of African swine fever virus: role of polyprotein pp220. J Virol 71:2331–2341.
87. Suárez C, Salas ML, Rodríguez JM. 2010. African swine fever virus polyprotein pp62 is essential for viral core development. J Virol 84:176–187.
88. Li G, Liu X, Yang M, Zhang G, Wang Z, Guo K, Gao Y, Jiao P, Sun J, Chen C, Wang H, Deng W, Xiao H, Li S, Wu H, Wang Y, Cao L, Jia Z, Shang L, Yang C, Guo Y, Rao Z. 2020. Crystal Structure of African Swine Fever Virus pS273R Protease and Implications for Inhibitor Design. J Virol 94:e02125-19.
89. Chapman DAG, Tcherepanov V, Upton C, Dixon LKY 2008. Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates. J Gen Virol 89:397–408.
90. Dixon LK, Bristow C, Wilkinson PJ, Sumption KJ. 1990. Identification of a variable region of the African swine fever virus genome that has undergone separate DNA rearrangements leading to expansion of minisatellite-like sequences. J Mol Biol 216:677–688.
91. Zhu Z, Xiao C-T, Fan Y, Cai Z, Lu C, Zhang G, Jiang T, Tan Y, Peng Y. 2019. Homologous recombination shapes the genetic diversity of African swine fever viruses. Vet Microbiol 236:108380.
92. Netherton CL, Connell S, Benfield CTO, Dixon LK. 2019. The Genetics of Life and Death: Virus-Host Interactions Underpinning Resistance to African Swine Fever, a Viral Hemorrhagic Disease. Front Genet 10.
93. Zani L, Forth JH, Forth L, Nurmoja I, Leidenberger S, Henke J, Carlson J, Breidenstein C, Viltrop A, Höper D, Sauter-Louis C, Beer M, Blome S. 2018. Deletion at the 5'-end of Estonian ASFV strains associated with an attenuated phenotype. Sci Rep 8:6510.
94. Dixon LK, Chapman DAG, Netherton CL, Upton C. 2013. African swine fever virus replication and genomics. 1. Virus Res 173:3–14.
95. Fernandez A, Perez J, Carrasco L, Bautista MJ, Sanchez-Vizcaino JM, Sierra MA. 1992. Distribution of ASFV antigens in pig tissues experimentally infected with two different Spanish virus isolates. 6. Zentralblatt Vet Reihe B J Vet Med Ser B 39:393–402.
96. Krug PW, Holinka LG, O'Donnell V, Reese B, Sanford B, Fernandez-Sainz I, Gladue DP, Arzt J, Rodriguez L, Risatti GR, Borca MV. 2014. The Progressive Adaptation of a Georgian Isolate of African Swine Fever Virus to Vero Cells Leads to a Gradual Attenuation of Virulence in Swine Corresponding to Major Modifications of the Viral Genome. J Virol 89:2324–2332.
97. Rodríguez JM, Moreno LT, Alejo A, Lacasta A, Rodríguez F, Salas ML. 2015. Genome Sequence of African Swine Fever Virus BA71, the Virulent Parental Strain of the Nonpathogenic and Tissue-Culture Adapted BA71V. PLOS ONE 10:e0142889.
98. Sánchez-Torres C, Gómez-Puertas P, Gómez-del-Moral M, Alonso F, Escribano JM, Ezquerra A, Domínguez J. 2003. Expression of porcine CD163 on monocytes/macrophages correlates with permissiveness to African swine fever infection. Arch Virol 148:2307–2323.
99. Popescu L, Gaudreault NN, Whitworth KM, Murgia MV, Nietfeld JC, Mileham A, Samuel M, Wells KD, Prather RS, Rowland RRR. 2017. Genetically edited pigs lacking CD163 show no resistance following infection with the African swine fever virus isolate, Georgia 2007/1. Virology 501:102–106.
100. Angulo A, Viñuela E, Alcamí A. 1993. Inhibition of African swine fever virus binding and infectivity by purified recombinant virus attachment protein p12. J Virol 67:5463–5471.
101. Gómez-Puertas P, Rodríguez F, Oviedo JM, Ramiro-Ibáñez F, Ruiz-Gonzalvo F, Alonso C, Escribano JM. 1996. Neutralizing antibodies to different proteins of African swine fever virus inhibit both virus attachment and internalization. J Virol 70:5689–5694.

102. Sánchez EG, Quintas A, Pérez-Núñez D, Nogal M, Barroso S, Carrascosa ÁL, Revilla Y. 2012. African Swine Fever Virus Uses Macropinocytosis to Enter Host Cells. PLOS Pathog 8:e1002754.
103. Galindo I, Cuesta-Geijo MA, Hlavova K, Muñoz-Moreno R, Barrado-Gil L, Dominguez J, Alonso C. 2015. African swine fever virus infects macrophages, the natural host cells, via clathrin- and cholesterol-dependent endocytosis. Virus Res 200:45–55.
104. Hernáez B, Guerra M, Salas ML, Andrés G. 2016. African Swine Fever Virus Undergoes Outer Envelope Disruption, Capsid Disassembly and Inner Envelope Fusion before Core Release from Multivesicular Endosomes. 4. PLoS Pathog 12:e1005595.
105. Matamoros T, Alejo A, Rodríguez JM, Hernáez B, Guerra M, Fraile-Ramos A, Andrés G. 2020. African Swine Fever Virus Protein pE199L Mediates Virus Entry by Enabling Membrane Fusion and Core Penetration. mBio 11:10.1128/mbio.00789-20.
106. Barrado-Gil L, Galindo I, Martínez-Alonso D, Viedma S, Alonso C. 2017. The ubiquitin-proteasome system is required for African swine fever replication. PloS One 12:e0189741.
107. Simões M, Martins C, Ferreira F. 2015. Early intranuclear replication of African swine fever virus genome modifies the landscape of the host cell nucleus. Virus Res 210:1–7.
108. Aicher S-M, Monaghan P, Netherton CL, Hawes PC. 2021. Unpicking the Secrets of African Swine Fever Viral Replication Sites. Viruses 13:77.
109. Alonso C, Miskin J, Hernáez B, Fernandez-Zapatero P, Soto L, Cantó C, Rodríguez-Crespo I, Dixon L, Escribano JM. 2001. African swine fever virus protein p54 interacts with the microtubular motor complex through direct binding to light-chain dynein. J Virol 75:9819–9827.
110. Rojo G, García-Beato R, Viñuela E, Salas ML, Salas J. 1999. Replication of African Swine Fever Virus DNA in Infected Cells. Virology 257:524–536.
111. Ballester M, Rodríguez-Cariño C, Pérez M, Gallardo C, Rodríguez JM, Salas ML, Rodriguez F. 2011. Disruption of Nuclear Organization during the Initial Phase of African Swine Fever Virus Infection. J Virol 85:8263–8269.
112. Simões M, Freitas FB, Leitão A, Martins C, Ferreira F. 2019. African swine fever virus replication events and cell nucleus: New insights and perspectives. Virus Res 270:197667.
113. Shao Z, Yang J, Gao Y, Zhang Y, Zhao X, Shao Q, Zhang W, Cao C, Liu H, Gan J. 2023. Structural and functional studies of PCNA from African swine fever virus. J Virol 97:e00748-23.
114. Hammond JM, Kerr SM, Smith GL, Dixon LK. 1992. An African swine fever virus gene with homology to DNA ligases. Nucleic Acids Res 20:2667–2671.
115. Suzuki S, Kameoka M, Nakaya T, Kimura T, Nishi N, Hirai K, Ikuta K. 1997. Superoxide generation by monocytes following infection with human cytomegalovirus. 2–3. Immunopharmacology 37:185–190.
116. Novoa RR, Calderita G, Arranz R, Fontana J, Granzow H, Risco C. 2005. Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. 2. Biol Cell 97:147–172.
117. Redrejo-Rodríguez M, Salas ML. 2014. Repair of base damage and genome maintenance in the nucleo-cytoplasmic large DNA viruses. Virus Res 179:12–25.
118. Yáñez RJ, Rodríguez JM, Nogal ML, Yuste L, Enríquez C, Rodriguez JF, Viñuela E. 1995. Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus. 1. Virology 208:249–278.
119. Granja AG, Sabina P, Salas ML, Fresno M, Revilla Y. 2006. Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase Expression by Viral A238L-Mediated Inhibition of p65/RelA Acetylation and p300 Transactivation. 21. J Virol 80:10487–10496.
120. García-Escudero R, Viñuela E. 2000. Structure of African Swine Fever Virus Late Promoters:

Requirement of a TATA Sequence at the Initiation Region. J Virol 74:8176–8182.
121. Duan X, Ru Y, Yang W, Ren J, Hao R, Qin X, Li D, Zheng H. 2022. Research progress on the proteins involved in African swine fever virus infection and replication. Front Immunol 13.
122. Quintas A, Pérez-Núñez D, Sánchez EG, Nogal ML, Hentze MW, Castelló A, Revilla Y. 2017. Characterization of the African Swine Fever Virus Decapping Enzyme during Infection. J Virol 91:10.1128/jvi.00990-17.
123. Zhang F, Moon A, Childs K, Goodbourn S, Dixon LK. 2010. The African swine fever virus DP71L protein recruits the protein phosphatase 1 catalytic subunit to dephosphorylate eIF2alpha and inhibits CHOP induction but is dispensable for these activities during virus infection. 20. J Virol 84:10681–10689.
124. Suarez C, Andres G, Kolovou A, Hoppe S, Salas ML, Walther P, Krijnse Locker J. 2015. African swine fever virus assembles a single membrane derived from rupture of the endoplasmic reticulum. Cell Microbiol 17:1683–1698.
125. Andrés G, García-Escudero R, Simón-Mateo C, Viñuela E. 1998. African Swine Fever Virus Is Enveloped by a Two-Membraned Collapsed Cisterna Derived from the Endoplasmic Reticulum. J Virol 72:8988–9001.
126. Stefanovic S, Windsor M, Nagata K, Inagaki M, Wileman T. 2005. Vimentin Rearrangement during African Swine Fever Virus Infection Involves Retrograde Transport along Microtubules and Phosphorylation of Vimentin by Calcium Calmodulin Kinase II. J Virol 79:11766–11775.
127. Jouvenet N, Monaghan P, Way M, Wileman T. 2004. Transport of African Swine Fever Virus from Assembly Sites to the Plasma Membrane Is Dependent on Microtubules and Conventional Kinesin. J Virol 78:7990–8001.
128. Andrés G, García-Escudero R, Viñuela E, Salas ML, Rodríguez JM. 2001. African Swine Fever Virus Structural Protein pE120R Is Essential for Virus Transport from Assembly Sites to Plasma Membrane but Not for Infectivity. J Virol 75:6758–6768.
129. Galindo I, Alonso C. 2017. African Swine Fever Virus: A Review. 5. Viruses 9.
130. Muñoz-Moreno R, Galindo I, Cuesta-Geijo MÁ, Barrado-Gil L, Alonso C. 2015. Host cell targets for African swine fever virus. Virus Res 209:118–127.
131. Blome S, Gabriel C, Beer M. 2014. Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated African swine fever virus vaccine preparation. Vaccine 32:3879–3882.
132. Cadenas-Fernández E, Sánchez-Vizcaíno JM, van den Born E, Kosowska A, van Kilsdonk E, Fernández-Pacheco P, Gallardo C, Arias M, Barasona JA. 2021. High Doses of Inactivated African Swine Fever Virus Are Safe, but Do Not Confer Protection against a Virulent Challenge. Vaccines 9:242.
133. Urbano AC, Ferreira F. African swine fever control and prevention: an update on vaccine development. Emerg Microbes Infect 11:2021–2033.
134. Gaudreault NN, Richt JA. 2019. Subunit Vaccine Approaches for African Swine Fever Virus. Vaccines 7:E56.
135. Gómez-Puertas P, Rodríguez F, Oviedo JM, Brun A, Alonso C, Escribano JM. 1998. The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response. Virology 243:461–471.
136. Neilan JG, Zsak L, Lu Z, Burrage TG, Kutish GF, Rock DL. 2004. Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection. Virology 319:337–342.
137. Ruiz-Gonzalvo F, Rodríguez F, Escribano JM. 1996. Functional and immunological properties of

the baculovirus-expressed hemagglutinin of African swine fever virus. Virology 218:285–289.
138. Oura C a. L, Denyer MS, Takamatsu H, Parkhouse RME. 2005. In vivo depletion of CD8+ T lymphocytes abrogates protective immunity to African swine fever virus. J Gen Virol 86:2445–2450.
139. Argilaguet JM, Pérez-Martín E, Nofrarías M, Gallardo C, Accensi F, Lacasta A, Mora M, Ballester M, Galindo-Cardiel I, López-Soria S, Escribano JM, Reche PA, Rodríguez F. 2012. DNA vaccination partially protects against African swine fever virus lethal challenge in the absence of antibodies. PloS One 7:e40942.
140. Argilaguet JM, Pérez-Martín E, Gallardo C, Salguero FJ, Borrego B, Lacasta A, Accensi F, Díaz I, Nofrarías M, Pujols J, Blanco E, Pérez-Filgueira M, Escribano JM, Rodríguez F. 2011. Enhancing DNA immunization by targeting ASFV antigens to SLA-II bearing cells. Vaccine 29:5379–5385.
141. Lokhandwala S, Waghela SD, Bray J, Martin CL, Sangewar N, Charendoff C, Shetti R, Ashley C, Chen C-H, Berghman LR, Mwangi D, Dominowski PJ, Foss DL, Rai S, Vora S, Gabbert L, Burrage TG, Brake D, Neilan J, Mwangi W. 2016. Induction of Robust Immune Responses in Swine by Using a Cocktail of Adenovirus-Vectored African Swine Fever Virus Antigens. Clin Vaccine Immunol CVI 23:888–900.
142. Lokhandwala S, Waghela SD, Bray J, Sangewar N, Charendoff C, Martin CL, Hassan WS, Koynarski T, Gabbert L, Burrage TG, Brake D, Neilan J, Mwangi W. 2017. Adenovirus-vectored novel African Swine Fever Virus antigens elicit robust immune responses in swine. PLoS ONE 12:e0177007.
143. Lopera-Madrid J, Osorio JE, He Y, Xiang Z, Adams LG, Laughlin RC, Mwangi W, Subramanya S, Neilan J, Brake D, Burrage TG, Brown WC, Clavijo A, Bounpheng MA. 2017. Safety and immunogenicity of mammalian cell derived and Modified Vaccinia Ankara vectored African swine fever subunit antigens in swine. Vet Immunol Immunopathol 185:20–33.
144. Gallardo C, Soler A, Rodze I, Nieto R, Cano-Gómez C, Fernandez-Pinero J, Arias M. 2019. Attenuated and non-haemadsorbing (non-HAD) genotype II African swine fever virus (ASFV) isolated in Europe, Latvia 2017. Transbound Emerg Dis 66:1399–1404.
145. Boinas FS, Hutchings GH, Dixon LK, Wilkinson PJ. 2004. Characterization of pathogenic and non-pathogenic African swine fever virus isolates from Ornithodoros erraticus inhabiting pig premises in Portugal. J Gen Virol 85:2177–2187.
146. Leitão A, Cartaxeiro C, Coelho R, Cruz B, Parkhouse RME, Portugal FC, Vigário JD, Martins CLV. 2001. The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for defining the protective anti-virus immune response. J Gen Virol 82:513–523.
147. Gallardo C, Sánchez EG, Pérez-Núñez D, Nogal M, de León P, Carrascosa ÁL, Nieto R, Soler A, Arias ML, Revilla Y. 2018. African swine fever virus (ASFV) protection mediated by NH/P68 and NH/P68 recombinant live-attenuated viruses. Vaccine 36:2694–2704.
148. Abrams CC, Goatley L, Fishbourne E, Chapman D, Cooke L, Oura CA, Netherton CL, Takamatsu H-H, Dixon LK. 2013. Deletion of virulence associated genes from attenuated African swine fever virus isolate OUR T88/3 decreases its ability to protect against challenge with virulent virus. Virology 443:99–105.
149. Gladue DP, Borca MV. 2022. Recombinant ASF Live Attenuated Virus Strains as Experimental Vaccine Candidates. Viruses 14:878.
150. Reis AL, Goatley LC, Jabbar T, Sanchez-Cordon PJ, Netherton CL, Chapman DAG, Dixon LK. 2017. Deletion of the African Swine Fever Virus Gene DP148R Does Not Reduce Virus Replication in Culture but Reduces Virus Virulence in Pigs and Induces High Levels of Protection against Challenge. J Virol 91:e01428-17.
151. Rathakrishnan A, Reis AL, Goatley LC, Moffat K, Dixon LK. 2021. Deletion of the K145R and

DP148R Genes from the Virulent ASFV Georgia 2007/1 Isolate Delays the Onset, but Does Not Reduce Severity, of Clinical Signs in Infected Pigs. Viruses 13:1473.
152. Meloni D, Franzoni G, Oggiano A. 2022. Cell Lines for the Development of African Swine Fever Virus Vaccine Candidates: An Update. Vaccines 10:707.
153. Wang T, Wang L, Han Y, Pan L, Yang J, Sun M, Zhou P, Sun Y, Bi Y, Qiu H-J. 2021. Adaptation of African swine fever virus to HEK293T cells. 5. Transbound Emerg Dis 68:2853–2866.
154. Borca MV, Rai A, Ramirez-Medina E, Silva E, Velazquez-Salinas L, Vuono E, Pruitt S, Espinoza N, Gladue DP. 2021. A Cell Culture-Adapted Vaccine Virus against the Current African Swine Fever Virus Pandemic Strain. J Virol 95:e0012321.
155. Gladue DP, Ramirez-Medina E, Vuono E, Silva E, Rai A, Pruitt S, Espinoza N, Velazquez-Salinas L, Borca MV. 2021. Deletion of the A137R Gene from the Pandemic Strain of African Swine Fever Virus Attenuates the Strain and Offers Protection against the Virulent Pandemic Virus. 21. J Virol 95.
156. Zhang J, Zhang Y, Chen T, Yang J, Yue H, Wang L, Zhou X, Qi Y, Han X, Ke J, Wang S, Yang J, Miao F, Zhang S, Zhang F, Wang Y, Li M, Hu R. 2021. Deletion of the L7L-L11L Genes Attenuates ASFV and Induces Protection against Homologous Challenge. 2. Viruses 13:255.
157. Sanford B, Holinka LG, O'Donnell V, Krug PW, Carlson J, Alfano M, Carrillo C, Wu P, Lowe A, Risatti GR, Gladue DP, Borca MV. 2016. Deletion of the thymidine kinase gene induces complete attenuation of the Georgia isolate of African swine fever virus. Virus Res 213:165–171.
158. Lewis T, Zsak L, Burrage TG, Lu Z, Kutish GF, Neilan JG, Rock DL. 2000. An African Swine Fever Virus *ERV1-ALR* Homologue, *9GL* , Affects Virion Maturation and Viral Growth in Macrophages and Viral Virulence in Swine. 3. J Virol 74:1275–1285.
159. Carlson J, O'Donnell V, Alfano M, Velazquez Salinas L, Holinka LG, Krug PW, Gladue DP, Higgs S, Borca MV. 2016. Association of the Host Immune Response with Protection Using a Live Attenuated African Swine Fever Virus Model. Viruses 8:291.
160. O'Donnell V, Holinka LG, Krug PW, Gladue DP, Carlson J, Sanford B, Alfano M, Kramer E, Lu Z, Arzt J, Reese B, Carrillo C, Risatti GR, Borca MV. 2015. African Swine Fever Virus Georgia 2007 with a Deletion of Virulence-Associated Gene *9GL* (B119L), when Administered at Low Doses, Leads to Virus Attenuation in Swine and Induces an Effective Protection against Homologous Challenge. 16. J Virol 89:8556–8566.
161. O'Donnell V, Holinka LG, Sanford B, Krug PW, Carlson J, Pacheco JM, Reese B, Risatti GR, Gladue DP, Borca MV. 2016. African swine fever virus Georgia isolate harboring deletions of 9GL and MGF360/505 genes is highly attenuated in swine but does not confer protection against parental virus challenge. Virus Res 221:8–14.
162. O'Donnell V, Holinka LG, Gladue DP, Sanford B, Krug PW, Lu X, Arzt J, Reese B, Carrillo C, Risatti GR, Borca MV. 2015. African Swine Fever Virus Georgia Isolate Harboring Deletions of MGF360 and MGF505 Genes Is Attenuated in Swine and Confers Protection against Challenge with Virulent Parental Virus. J Virol 89:6048–6056.
163. O'Donnell Vivian, Risatti Guillermo R., Holinka Lauren G., Krug Peter W., Carlson Jolene, Velazquez-Salinas Lauro, Azzinaro Paul A., Gladue Douglas P., Borca Manuel V., Perlman Stanley. Simultaneous Deletion of the 9GL and UK Genes from the African Swine Fever Virus Georgia 2007 Isolate Offers Increased Safety and Protection against Homologous Challenge. 1. J Virol 91:e01760-16.
164. Ramirez-Medina E, Vuono E, O'Donnell V, Holinka LG, Silva E, Rai A, Pruitt S, Carrillo C, Gladue DP, Borca MV. 2019. Differential Effect of the Deletion of African Swine Fever Virus Virulence-Associated Genes in the Induction of Attenuation of the Highly Virulent Georgia Strain. 7. Viruses 11.

165. Borca MV, Ramirez-Medina E, Silva E, Vuono E, Rai A, Pruitt S, Holinka LG, Velazquez-Salinas L, Zhu J, Gladue DP. 2020. Development of a Highly Effective African Swine Fever Virus Vaccine by Deletion of the I177L Gene Results in Sterile Immunity against the Current Epidemic Eurasia Strain. J Virol 94:e02017-19.
166. Tran XH, Le TTP, Nguyen QH, Do TT, Nguyen VD, Gay CG, Borca MV, Gladue DP. 2021. African swine fever virus vaccine candidate ASFV-G-ΔI177L efficiently protects European and native pig breeds against circulating Vietnamese field strain. n/a. Transbound Emerg Dis n/a.
167. Borca MV, Ramirez-Medina E, Silva E, Vuono E, Rai A, Pruitt S, Espinoza N, Velazquez-Salinas L, Gay CG, Gladue DP. 2021. ASFV-G-ΔI177L as an Effective Oral Nasal Vaccine against the Eurasia Strain of Africa Swine Fever. 5. Viruses 13:765.
168. Tran XH, Phuong LTT, Huy NQ, Thuy DT, Nguyen VD, Quang PH, Ngôn QV, Rai A, Gay CG, Gladue DP, Borca MV. 2022. Evaluation of the Safety Profile of the ASFV Vaccine Candidate ASFV-G-ΔI177L. 5. Viruses 14:896.
169. Borca MV, Ramirez-Medina E, Silva E, Rai A, Espinoza N, Velazquez-Salinas L, Gladue DP. 2023. ASF Vaccine Candidate ASFV-G-ΔI177L Does Not Exhibit Residual Virulence in Long-Term Clinical Studies. 6. Pathogens 12:805.
170. Liu Y, Xie Z, Li Y, Song Y, Di D, Liu J, Gong L, Chen Z, Wu J, Ye Z, Liu J, Yu W, Lv L, Zhong Q, Tian C, Song Q, Wang H, Chen H. 2023. Evaluation of an I177L gene-based five-gene-deleted African swine fever virus as a live attenuated vaccine in pigs. Emerg Microbes Infect 12:2148560.
171. O'Donnell V, Holinka LG, Gladue DP, Sanford B, Krug PW, Lu X, Arzt J, Reese B, Carrillo C, Risatti GR, Borca MV. 2015. African Swine Fever Virus Georgia Isolate Harboring Deletions of MGF360 and MGF505 Genes Is Attenuated in Swine and Confers Protection against Challenge with Virulent Parental Virus. 11. J Virol 89:6048–6056.
172. Lewis T, Zsak L, Burrage TG, Lu Z, Kutish GF, Neilan JG, Rock DL. 2000. An African swine fever virus ERV1-ALR homologue, 9GL, affects virion maturation and viral growth in macrophages and viral virulence in swine. 3. J Virol 74:1275–1285.
173. Afonso CL, Carrillo C, Zsak L, Rock DL, Borca MV. 1998. African swine fever virus NL gene is not required for virus virulence. 10. J Gen Virol 79:2543–2547.
174. Zhang Y, Ke J, Zhang J, Yang J, Yue H, Zhou X, Qi Y, Zhu R, Miao F, Li Q, Zhang F, Wang Y, Han X, Mi L, Yang J, Zhang S, Chen T, Hu R. 2021. African Swine Fever Virus Bearing an I226R Gene Deletion Elicits Robust Immunity in Pigs to African Swine Fever. 23. J Virol 95:e0119921.
175. Chen W, Zhao D, He X, Liu R, Wang Z, Zhang X, Li F, Shan D, Chen H, Zhang J, Wang L, Wen Z, Wang X, Guan Y, Liu J, Bu Z. 2020. A seven-gene-deleted African swine fever virus is safe and effective as a live attenuated vaccine in pigs. 5. Sci China Life Sci 63:623–634.
176. Monteagudo PL, Lacasta A, López E, Bosch L, Collado J, Pina-Pedrero S, Correa-Fiz F, Accensi F, Navas MJ, Vidal E, Bustos MJ, Rodríguez JM, Gallei A, Nikolin V, Salas ML, Rodríguez F. 2017. BA71ΔCD2: a New Recombinant Live Attenuated African Swine Fever Virus with Cross-Protective Capabilities. 21. J Virol 91.
177. Borca MV, O'Donnell V, Holinka LG, Risatti GR, Ramirez-Medina E, Vuono EA, Shi J, Pruitt S, Rai A, Silva E, Velazquez-Salinas L, Gladue DP. 2020. Deletion of CD2-like gene from the genome of African swine fever virus strain Georgia does not attenuate virulence in swine. 1. Sci Rep 10:494.
178. Reis AL, Abrams CC, Goatley LC, Netherton C, Chapman DG, Sanchez-Cordon P, Dixon LK. 2016. Deletion of African swine fever virus interferon inhibitors from the genome of a virulent isolate reduces virulence in domestic pigs and induces a protective response. Vaccine 34:4698–4705.

179. Ramirez-Medina E, Vuono E, Rai A, Pruitt S, Espinoza N, Velazquez-Salinas L, Pina-Pedrero S, Zhu J, Rodriguez F, Borca MV, Gladue DP. 2022. Deletion of E184L, a Putative DIVA Target from the Pandemic Strain of African Swine Fever Virus, Produces a Reduction in Virulence and Protection against Virulent Challenge. J Virol 96:e0141921.
180. Gladue DP, O'Donnell V, Ramirez-Medina E, Rai A, Pruitt S, Vuono EA, Silva E, Velazquez-Salinas L, Borca MV. 2020. Deletion of CD2-Like (CD2v) and C-Type Lectin-Like (EP153R) Genes from African Swine Fever Virus Georgia-Δ9GL Abrogates Its Effectiveness as an Experimental Vaccine. Viruses 12:1185.
181. García-Belmonte R, Pérez-Núñez D, Pittau M, Richt JA, Revilla Y. 2019. African Swine Fever Virus Armenia/07 Virulent Strain Controls Interferon Beta Production through the cGAS-STING Pathway. J Virol 93:e02298-18.
182. Pikalo J, Zani L, Hühr J, Beer M, Blome S. 2019. Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar – Lessons learned from recent animal trials. Virus Res 271:197614.
183. de Oliveira Mann CC, Hopfner K. 2021. Nuclear cGAS: guard or prisoner? EMBO J 40:e108293.
184. Ayanwale A, Trapp S, Guabiraba R, Caballero I, Roesch F. 2022. New Insights in the Interplay Between African Swine Fever Virus and Innate Immunity and Its Impact on Viral Pathogenicity. Front Microbiol 13:958307.
185. Lahaye X, Gentili M, Silvin A, Conrad C, Picard L, Jouve M, Zueva E, Maurin M, Nadalin F, Knott GJ, Zhao B, Du F, Rio M, Amiel J, Fox AH, Li P, Etienne L, Bond CS, Colleaux L, Manel N. 2018. NONO Detects the Nuclear HIV Capsid to Promote cGAS-Mediated Innate Immune Activation. Cell 175:488-501.e22.
186. Hopfner K-P, Hornung V. 2020. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS–STING signalling. 9. Nat Rev Mol Cell Biol 21:501–521.
187. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. Nat Immunol 5:730–737.
188. Ran Y, Li D, Xiong M-G, Liu H-N, Feng T, Shi Z-W, Li Y-H, Wu H-N, Wang S-Y, Zheng H-X, Wang Y-Y. 2022. African swine fever virus I267L acts as an important virulence factor by inhibiting RNA polymerase III-RIG-I-mediated innate immunity. 1. PLoS Pathog 18.
189. Chiu Y-H, Macmillan JB, Chen ZJ. 2009. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. Cell 138:576–591.
190. Agier J, Żelechowska P, Kozłowska E, Brzezińska-Błaszczyk E. 2016. Expression of surface and intracellular Toll-like receptors by mature mast cells. Cent-Eur J Immunol 41:333–338.
191. CHEN Y, LIN J, ZHAO Y, MA X, YI H. 2021. Toll-like receptor 3 (TLR3) regulation mechanisms and roles in antiviral innate immune responses. J Zhejiang Univ Sci B 22:609–632.
192. De Oliveira, L V, Almeida SCP, Soares HR, Crespo A, Marshall-Clarke S, Parkhouse RME. 2011. A novel TLR3 inhibitor encoded by African swine fever virus (ASFV). 4. Arch Virol 156:597–609.
193. Yang B, Shen C, Zhang D, Zhang T, Shi X, Yang J, Hao Y, Zhao D, Cui H, Yuan X, Chen X, Zhang K, Zheng H, Liu X. 2021. Mechanism of interaction between virus and host is inferred from the changes of gene expression in macrophages infected with African swine fever virus CN/GS/2018 strain. Virol J 18:170.
194. Ezeonwumelu IJ, Garcia-Vidal E, Ballana E. 2021. JAK-STAT Pathway: A Novel Target to Tackle Viral Infections. Viruses 13:2379.
195. Smith S, Weston S, Kellam P, Marsh M. 2014. IFITM proteins — cellular inhibitors of viral entry.

Curr Opin Virol 4:71–77.
196. Muñoz-Moreno R, Cuesta-Geijo MÁ, Martínez-Romero C, Barrado-Gil L, Galindo I, García-Sastre A, Alonso C. 2016. Antiviral Role of IFITM Proteins in African Swine Fever Virus Infection. 4. PLOS ONE 11:e0154366.
197. Cai S, Zheng Z, Cheng J, Zhong L, Shao R, Zheng F, Lai Z, Ou J, Xu L, Zhou P, Lu G, Zhang G. 2022. Swine Interferon-Inducible Transmembrane Proteins Potently Inhibit African Swine Fever Virus Replication. Front Immunol 13.
198. Netherton CL, Simpson J, Haller O, Wileman TE, Takamatsu H-H, Monaghan P, Taylor G. 2009. Inhibition of a large double-stranded DNA virus by MxA protein. 5. J Virol 83:2310–2320.
199. Sun H, Niu Q, Yang J, Zhao Y, Tian Z, Fan J, Zhang Z, Wang Y, Geng S, Zhang Y, Guan G, Williams DT, Luo J, Yin H, Liu Z. 2021. Transcriptome Profiling Reveals Features of Immune Response and Metabolism of Acutely Infected, Dead and Asymptomatic Infection of African Swine Fever Virus in Pigs. Front Immunol 12:808545.
200. OAS1 suppresses African swine fever virus replication by recruiting TRIM21 to degrade viral major capsid protein | Journal of Virology. https://journals.asm.org/doi/10.1128/jvi.01217-23?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed. Retrieved 16 October 2023.
201. Drappier M, Michiels T. 2015. Inhibition of the OAS/RNase L pathway by viruses. Curr Opin Virol 15:19–26.
202. Teijaro JR. 2017. Cytokine storms in infectious diseases. Semin Immunopathol 39:501–503.
203. Basler CF. 2017. Molecular Pathogenesis of Viral Hemorrhagic Fever. Semin Immunopathol 39:551–561.
204. Dorrington MG, Fraser IDC. 2019. NF-κB Signaling in Macrophages: Dynamics, Crosstalk, and Signal Integration. Front Immunol 10.
205. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. 2019. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. Int J Mol Sci 20:3328.
206. Liu X, Zhang Z, Ruan J, Pan Y, Magupalli VG, Wu H, Lieberman J. 2016. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. Nature 535:153–158.
207. Franzoni G, Pedrera M, Sánchez-Cordón PJ. 2023. African Swine Fever Virus Infection and Cytokine Response In Vivo: An Update. Viruses 15:233.
208. Wang S, Zhang J, Zhang Y, Yang J, Wang L, Qi Y, Han X, Zhou X, Miao F, Chen T, Wang Y, Zhang F, Zhang S, Hu R. 2020. Cytokine Storm in Domestic Pigs Induced by Infection of Virulent African Swine Fever Virus. Front Vet Sci 7:601641.
209. Salguero FJ, Sánchez-Cordón PJ, Sierra MA, Jover A, Núñez A, Gómez-Villamandos JC. 2004. Apoptosis of thymocytes in experimental African Swine Fever virus infection. Histol Histopathol 19:77–84.
210. Ramiro-Ibáñez F, Ortega A, Escribano JM, Alonso C. 1996. Apoptosis: a Mechanism of Cell Killing and Lymphoid Organ Impairment During Acute African Swine Fever Virus Infection. J Gen Virol 77:2209–2219.
211. Dixon LK, Sánchez-Cordón PJ, Galindo I, Alonso C. 2017. Investigations of Pro- and Anti-Apoptotic Factors Affecting African Swine Fever Virus Replication and Pathogenesis. 9. Viruses 9.
212. Oura CA, Powell PP, Parkhouse RM. 1998. African swine fever: a disease characterized by apoptosis. J Gen Virol 79 (Pt 6):1427–1438.
213. Gómez del Moral M, Ortuño E, Fernández-Zapatero P, Alonso F, Alonso C, Ezquerra A,

Domínguez J. 1999. African swine fever virus infection induces tumor necrosis factor alpha production: implications in pathogenesis. J Virol 73:2173–2180.
214. Carrascosa AL, Bustos MJ, Nogal ML, González de Buitrago G, Revilla Y. 2002. Apoptosis Induced in an Early Step of African Swine Fever Virus Entry into Vero Cells Does Not Require Virus Replication. 2. Virology 294:372–382.
215. Galindo I, Hernáez B, Muñoz-Moreno R, Cuesta-Geijo MA, Dalmau-Mena I, Alonso C. 2012. The ATF6 branch of unfolded protein response and apoptosis are activated to promote African swine fever virus infection. 7. Cell Death Dis 3:e341–e341.
216. Netherton CL, Wileman TE. 2013. African swine fever virus organelle rearrangements. Virus Res 173:76–86.
217. Hernáez B, Díaz-Gil G, García-Gallo M, Ignacio Quetglas J, Rodríguez-Crespo I, Dixon L, Escribano JM, Alonso C. 2004. The African swine fever virus dynein-binding protein p54 induces infected cell apoptosis. 1–3. FEBS Lett 569:224–228.
218. Schäfer A, Franzoni G, Netherton CL, Hartmann L, Blome S, Blohm U. 2022. Adaptive Cellular Immunity against African Swine Fever Virus Infections. Pathogens 11:274.
219. Escribano JM, Galindo I, Alonso C. 2013. Antibody-mediated neutralization of African swine fever virus: myths and facts. Virus Res 173:101–109.
220. den Haan JMM, Arens R, van Zelm MC. 2014. The activation of the adaptive immune system: Cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. Immunol Lett 162:103–112.
221. Lithgow P, Takamatsu H, Werling D, Dixon L, Chapman D. 2014. Correlation of cell surface marker expression with African swine fever virus infection. Vet Microbiol 168:413–419.
222. Franzoni G, Razzuoli E, Dei Giudici S, Carta T, Galleri G, Zinellu S, Ledda M, Angioi P, Modesto P, Graham SP, Oggiano A. 2020. Comparison of Macrophage Responses to African Swine Fever Viruses Reveals that the NH/P68 Strain is Associated with Enhanced Sensitivity to Type I IFN and Cytokine Responses from Classically Activated Macrophages. Pathog Basel Switz 9:209.
223. Netherton CL, McCrossan M-C, Denyer M, Ponnambalam S, Armstrong J, Takamatsu H-H, Wileman TE. 2006. African swine fever virus causes microtubule-dependent dispersal of the trans-golgi network and slows delivery of membrane protein to the plasma membrane. J Virol 80:11385–11392.
224. Franzoni G, Graham SP, Giudici SD, Bonelli P, Pilo G, Anfossi AG, Pittau M, Nicolussi PS, Laddomada A, Oggiano A. 2017. Characterization of the interaction of African swine fever virus with monocytes and derived macrophage subsets. Vet Microbiol 198:88–98.
225. Lanier LL. 2005. NK cell recognition. Annu Rev Immunol 23:225–274.
226. Norley SG, Wardley RC. 1984. Cytotoxic lymphocytes induced by African swine fever infection. Res Vet Sci 37:255–257.
227. Martins CLV, Leitão AC. 1994. Porcine immune responses to African swine fever virus (ASFV) infection. Vet Immunol Immunopathol 43:99–106.
228. Schäfer A, Zani L, Pikalo J, Hühr J, Sehl J, Mettenleiter TC, Breithaupt A, Blome S, Blohm U. 2021. T-cell responses in domestic pigs and wild boar upon infection with the moderately virulent African swine fever virus strain “Estonia2014.” Transbound Emerg Dis 68:2733–2749.
229. Hühr J, Schäfer A, Schwaiger T, Zani L, Sehl J, Mettenleiter TC, Blome S, Blohm U. 2020. Impaired T-cell responses in domestic pigs and wild boar upon infection with a highly virulent African swine fever virus strain. Transbound Emerg Dis 67:3016–3032.
230. Casal I, Viñuela E, Enjuanes L. 1987. Synthesis of African swine fever (ASF) virus-specific antibodies in vitro in a porcine leucocyte system. Immunology 62:207–213.

231. Reis AL, Parkhouse RME, Penedos AR, Martins C, Leitão A. 2007. Systematic analysis of longitudinal serological responses of pigs infected experimentally with African swine fever virus. J Gen Virol 88:2426–2434.
232. Guinat C, Reis AL, Netherton CL, Goatley L, Pfeiffer DU, Dixon L. 2014. Dynamics of African swine fever virus shedding and excretion in domestic pigs infected by intramuscular inoculation and contact transmission. Vet Res 45:93.
233. Onisk DV, Borca MV, Kutish S, Kramer E, Irusta P, Rock DL. 1994. Passively Transferred African Swine Fever Virus Antibodies Protect Swine against Lethal Infection. Virology 198:350–354.
234. Schlafer DH, Mebus CA, McVicar JW. 1984. African swine fever in neonatal pigs: passively acquired protection from colostrum or serum of recovered pigs. Am J Vet Res 45:1367–1372.
235. Schlafer DH, McVicar JW, Mebus CA. 1984. African swine fever convalescent sows: subsequent pregnancy and the effect of colostral antibody on challenge inoculation of their pigs. Am J Vet Res 45:1361–1366.
236. Ruiz GF, Caballero C, Martinez J, Carnero ME. 1986. Neutralization of African swine fever virus by sera from African swine fever-resistant pigs. Am J Vet Res 47:1858–1862.
237. Ruiz GF, Carnero ME, Caballero C, Martínez J. 1986. Inhibition of African swine fever infection in the presence of immune sera in vivo and in vitro. Am J Vet Res 47:1249–1252.
238. Borca MV, Irusta P, Carrillo C, Afonso CL, Burrage T, Rock DL. 1994. African Swine Fever Virus Structural Protein p72 Contains a Conformational Neutralizing Epitope. Virology 201:413–418.
239. Gómez-Puertas P, Oviedo JM, Rodríguez F, Coll J, Escribano JM. 1997. Neutralization Susceptibility of African Swine Fever Virus Is Dependent on the Phospholipid Composition of Viral Particles. Virology 228:180–189.
240. Wardley RC, Norley SG, Wilkinson PJ, Williams S. 1985. The role of antibody in protection against African swine fever virus. Vet Immunol Immunopathol 9:201–212.
241. Arias M, De la Torre A, Dixon L, Gallardo C, Jori F, Laddomada A, Martins C, Parkhouse RM, Revilla Y, Rodriguez F and J-M, Sanchez-Vizcaino. 2017. Approaches and Perspectives for Development of African Swine Fever Virus Vaccines. 4. Vaccines 5:35.
242. Razzuoli E, Franzoni G, Carta T, Zinellu S, Amadori M, Modesto P, Oggiano A. 2020. Modulation of Type I Interferon System by African Swine Fever Virus. Pathogens 9:361.
243. Golding JP, Goatley L, Goodbourn S, Dixon LK, Taylor G, Netherton CL. 2016. Sensitivity of African swine fever virus to type I interferon is linked to genes within multigene families 360 and 505. Virology 493:154–161.
244. Afonso CL, Piccone ME, Zaffuto KM, Neilan J, Kutish GF, Lu Z, Balinsky CA, Gibb TR, Bean TJ, Zsak L, Rock DL. 2004. African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes affect host interferon response. J Virol 78:1858–1864.
245. Gil S, Sepúlveda N, Albina E, Leitão A, Martins C. 2008. The low-virulent African swine fever virus (ASFV/NH/P68) induces enhanced expression and production of relevant regulatory cytokines (IFNα, TNFα and IL12p40) on porcine macrophages in comparison to the highly virulent ASFV/L60. 10. Arch Virol 153:1845–1854.
246. Chapman DAG, Tcherepanov V, Upton C, Dixon LK. 2008. Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates. 2. J Gen Virol 89:397–408.
247. Cheng M, Kanyema MM, Sun Y, Zhao W, Lu Y, Wang J, Li X, Shi C, Wang J, Wang N, Yang W, Jiang Y, Huang H, Yang G, Zeng Y, Wang C, Cao X. 2023. African Swine Fever Virus L83L Negatively

Regulates the cGAS-STING-Mediated IFN-I Pathway by Recruiting Tollip To Promote STING Autophagic Degradation. J Virol 97:e0192322.
248. Hao S, Zheng X, Zhu Y, Yao Y, Li S, Xu Y, Feng W. 2023. African swine fever virus QP383R dampens type I interferon production by promoting cGAS palmitoylation. Front Immunol 14.
249. Dodantenna N, Ranathunga L, Chathuranga WAG, Weerawardhana A, Cha J-W, Subasinghe A, Gamage N, Haluwana DK, Kim Y, Jheong W, Poo H, Lee J-S. 2022. African Swine Fever Virus EP364R and C129R Target Cyclic GMP-AMP To Inhibit the cGAS-STING Signaling Pathway. J Virol e0102222.
250. Zheng W, Xia N, Zhang J, Cao Q, Jiang S, Luo J, Wang H, Chen N, Zhang Q, Meurens F, Zhu J. 2022. African Swine Fever Virus Structural Protein p17 Inhibits cGAS-STING Signaling Pathway Through Interacting With STING. Front Immunol 13:941579.
251. Li D, Yang W, Li L, Li P, Ma Z, Zhang J, Qi X, Ren J, Ru Y, Niu Q, Liu Z, Liu X, Zheng H. 2021. African Swine Fever Virus MGF-505-7R Negatively Regulates cGAS–STING-Mediated Signaling Pathway. 8. J Immunol 206:1844–1857.
252. Zhu Z, Li S, Ma C, Yang F, Cao W, Liu H, Chen X, Feng T, Shi Z, Tian H, Zhang K, Chen H, Liu X, Zheng H. 2023. African Swine Fever Virus E184L Protein Interacts with Innate Immune Adaptor STING to Block IFN Production for Viral Replication and Pathogenesis. J Immunol 210:442–458.
253. Henriques ES, Brito RMM, Soares H, Ventura S, de Oliveira VL, Parkhouse RME. 2011. Modeling of the Toll-like receptor 3 and a putative Toll-like receptor 3 antagonist encoded by the African swine fever virus: Modeling of TLR3 and a Putative TLR3 Antagonist. 2. Protein Sci 20:247–255.
254. Reis AL, Goatley LC, Jabbar T, Lopez E, Rathakrishnan A, Dixon LK. 2020. Deletion of the Gene for the Type I Interferon Inhibitor I329L from the Attenuated African Swine Fever Virus OURT88/3 Strain Reduces Protection Induced in Pigs. 2. Vaccines 8:262.
255. Luo J, Zhang J, Ni J, Jiang S, Xia N, Guo Y, Shao Q, Cao Q, Zheng W, Chen N, Zhang Q, Chen H, Chen Q, Zhu H, Meurens F, Zhu J. The African swine fever virus protease pS273R inhibits DNA sensing cGAS-STING pathway by targeting IKKε. 1. Virulence 13:740–756.
256. Huang L, Xu W, Liu H, Xue M, Liu X, Zhang K, Hu L, Li J, Liu X, Xiang Z, Zheng J, Li C, Chen W, Bu Z, Xiong T, Weng C. 2021. African Swine Fever Virus pI215L Negatively Regulates cGAS-STING Signaling Pathway through Recruiting RNF138 to Inhibit K63-Linked Ubiquitination of TBK1. 11. J Immunol 207:2754–2769.
257. Ren J, Li D, Zhu G, Yang W, Ru Y, Feng T, Qin X, Hao R, Duan X, Liu X, Zheng H. 2023. Deletion of MGF-110-9L gene from African swine fever virus weakens autophagic degradation of TBK1 as a mechanism for enhancing type I interferon production. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol 37:e22934.
258. Song G, Liu B, Li Z, Wu H, Wang P, Zhao K, Jiang G, Zhang L, Gao C. 2016. E3 ubiquitin ligase RNF128 promotes innate antiviral immunity through K63-linked ubiquitination of TBK1. Nat Immunol 17:1342–1351.
259. Zheng Q, Hou J, Zhou Y, Yang Y, Xie B, Cao X. 2015. Siglec1 suppresses antiviral innate immune response by inducing TBK1 degradation via the ubiquitin ligase TRIM27. 10. Cell Res 25:1121–1136.
260. Wang Y, Cui S, Xin T, Wang X, Yu H, Chen S, Jiang Y, Gao X, Jiang Y, Guo X, Jia H, Zhu H. 2022. African Swine Fever Virus MGF360-14L Negatively Regulates Type I Interferon Signaling by Targeting IRF3. Front Cell Infect Microbiol 11.
261. Liu Huisheng, Zhu Zixiang, Feng Tao, Ma Zhao, Xue Qiao, Wu Panxue, Li Pan, Li Shasha, Yang Fan, Cao Weijun, Xue Zhaoning, Chen Hongjun, Liu Xiangtao, Zheng Haixue, Shisler Joanna L. African Swine Fever Virus E120R Protein Inhibits Interferon Beta Production by Interacting with IRF3 To Block

Its Activation. 18. J Virol 95:e00824-21.
262. Li J, Song J, Kang L, Huang L, Zhou S, Hu L, Zheng J, Li C, Zhang X, He X, Zhao D, Bu Z, Weng C. 2021. pMGF505-7R determines pathogenicity of African swine fever virus infection by inhibiting IL-1β and type I IFN production. PLoS Pathog 17:e1009733.
263. Yang K, Huang Q, Wang R, Zeng Y, Cheng M, Xue Y, Shi C, Ye L, Yang W, Jiang Y, Wang J, Huang H, Cao X, Yang G, Wang C. 2021. African swine fever virus MGF505-11R inhibits type I interferon production by negatively regulating the cGAS-STING-mediated signaling pathway. Vet Microbiol 263:109265.
264. Ye G, Liu H, Liu X, Chen W, Li J, Zhao D, Wang G, Feng C, Zhang Z, Zhou Q, Zheng J, Bu Z, Weng C, Huang L. 2023. African Swine Fever Virus H240R Protein Inhibits the Production of Type I Interferon through Disrupting the Oligomerization of STING. J Virol 97:e0057723.
265. Huang L, Chen W, Liu H, Xue M, Dong S, Liu X, Feng C, Cao S, Ye G, Zhou Q, Zhang Z, Zheng J, Li J, Zhao D, Wang Z, Sun E, Chen H, Zhang S, Wang X, Zhang X, He X, Guan Y, Bu Z, Weng C. 2023. African Swine Fever Virus HLJ/18 CD2v Suppresses Type I IFN Production and IFN-Stimulated Genes Expression through Negatively Regulating cGMP-AMP Synthase-STING and IFN Signaling Pathways. J Immunol Baltim Md 1950 210:1338–1350.
266. Luo J, Cheng M, Duan Y, Xing X, Lu M, Sun Y, Shi C, Wang J, Lu Y, Li X, Wang C, Cao X, Zeng Y. 2023. African swine fever virus encoded protein MGF360-13L inhibits cGAS-STING-mediated IFN-I signaling pathway. Gene 874:147490.
267. Yang K, Xue Y, Niu T, Li X, Cheng M, Bao M, Zou B, Shi C, Wang J, Yang W, Wang N, Jiang Y, Yang G, Zeng Y, Cao X, Wang C. 2022. African swine fever virus MGF505-7R protein interacted with IRF7and TBK1 to inhibit type I interferon production. Virus Res 322:198931.
268. Yang K, Xue Y, Niu H, Shi C, Cheng M, Wang J, Zou B, Wang J, Niu T, Bao M, Yang W, Zhao D, Jiang Y, Yang G, Zeng Y, Cao X, Wang C. 2022. African swine fever virus MGF360-11L negatively regulates cGAS-STING-mediated inhibition of type I interferon production. 1. Vet Res 53.
269. Cheng M, Luo J, Duan Y, Yang Y, Shi C, Sun Y, Lu Y, Wang J, Li X, Wang J, Wang N, Yang W, Jiang Y, Yang G, Zeng Y, Wang C, Cao X. 2022. African swine fever virus MGF505-3R inhibits cGAS-STING-mediated IFN-β pathway activation by degrading TBK1. Anim Dis 2:13.
270. Correia S, Ventura S, Parkhouse RM. 2013. Identification and utility of innate immune system evasion mechanisms of ASFV. Virus Res 173:87–100.
271. Wang X, Wu J, Wu Y, Chen H, Zhang S, Li J, Xin T, Jia H, Hou S, Jiang Y, Zhu H, Guo X. 2018. Inhibition of cGAS-STING-TBK1 signaling pathway by DP96R of ASFV China 2018/1. Biochem Biophys Res Commun 506:437–443.
272. Huang L, Xu W, Liu H, Xue M, Liu X, Zhang K, Hu L, Li J, Liu X, Xiang Z, Zheng J, Li C, Chen W, Bu Z, Xiong T, Weng C. 2021. African Swine Fever Virus pI215L Negatively Regulates cGAS-STING Signaling Pathway through Recruiting RNF138 to Inhibit K63-Linked Ubiquitination of TBK1. J Immunol Baltim Md 1950 207:2754–2769.
273. Sun M, Yu S, Ge H, Wang T, Li Y, Zhou P, Pan L, Han Y, Yang Y, Sun Y, Li S, Li L-F, Qiu H-J. 2022. The A137R Protein of African Swine Fever Virus Inhibits Type I Interferon Production via the Autophagy-Mediated Lysosomal Degradation of TBK1. 9. J Virol 96:e0195721.
274. Cui S, Wang Y, Gao X, Xin T, Wang X, Yu H, Chen S, Jiang Y, Chen Q, Jiang F, Wang D, Guo X, Jia H, Zhu H. 2022. African swine fever virus M1249L protein antagonizes type I interferon production via suppressing phosphorylation of TBK1 and degrading IRF3. Virus Res 319:198872.
275. Li H, Zheng X, Li Y, Zhu Y, Xu Y, Yu Z, Feng W-H. 2023. African swine fever virus S273R protein

antagonizes type I interferon production by interfering with TBK1 and IRF3 interaction. Virol Sin S1995-820X(23)00107–4.
276. Liu X, Liu H, Ye G, Xue M, Yu H, Feng C, Zhou Q, Liu X, Zhang L, Jiao S, Weng C, Huang L. 2022. African swine fever virus pE301R negatively regulates cGAS-STING signaling pathway by inhibiting the nuclear translocation of IRF3. Vet Microbiol 274:109556.
277. Zhang K, Ge H, Zhou P, Li L-F, Dai J, Cao H, Luo Y, Sun Y, Wang Y, Li J, Yu S, Li S, Qiu H-J. 2023. The D129L protein of African swine fever virus interferes with the binding of transcriptional coactivator p300 and IRF3 to prevent beta interferon induction. J Virol e0082423.
278. Zhang K, Yang B, Shen C, Zhang T, Hao Y, Zhang D, Liu H, Shi X, Li G, Yang J, Li D, Zhu Z, Tian H, Yang F, Ru Y, Cao WJ, Guo J, He J, Zheng H, Liu X. 2022. MGF360-9L Is a Major Virulence Factor Associated with the African Swine Fever Virus by Antagonizing the JAK/STAT Signaling Pathway. 1. mBio 13.
279. Chen Q, Li L, Liu L, Liu Z, Guo S, Tan C, Chen H, Wang X. 2023. African Swine Fever Virus pF778R Attenuates Type I Interferon Response by Impeding STAT1 Nuclear Translocation. Virus Res 335:199190.
280. Li D, Zhang J, Yang W, Li P, Ru Y, Kang W, Li L, Ran Y, Zheng H. 2021. African swine fever virus protein MGF-505-7R promotes virulence and pathogenesis by inhibiting JAK1- and JAK2-mediated signaling. 5. J Biol Chem 297:101190.
281. Chen Q, Li L, Guo S, Liu Z, Liu L, Tan C, Chen H, Wang X. 2023. African swine fever virus pA104R protein acts as a suppressor of type I interferon signaling. Front Microbiol 14:1169699.
282. Li Y-H, Peng J-L, Xu Z-S, Xiong M-G, Wu H-N, Wang S-Y, Li D, Zhu G-Q, Ran Y, Wang Y-Y. 2023. African Swine Fever Virus Cysteine Protease pS273R Inhibits Type I Interferon Signaling by Mediating STAT2 Degradation. J Virol 97:e0194222.
283. Li D, Peng J, Wu J, Yi J, Wu P, Qi X, Ren J, Peng G, Duan X, Ru Y, Liu H, Tian H, Zheng H. 2023. African swine fever virus MGF-360-10L is a novel and crucial virulence factor that mediates ubiquitination and degradation of JAK1 by recruiting the E3 ubiquitin ligase HERC5. mBio 14:e0060623.
284. Li L, Fu J, Li J, Guo S, Chen Q, Zhang Y, Liu Z, Tan C, Chen H, Wang X. 2022. African Swine Fever Virus pI215L Inhibits Type I Interferon Signaling by Targeting Interferon Regulatory Factor 9 for Autophagic Degradation. J Virol 96:e0094422.
285. Riera E, García-Belmonte R, Madrid R, Pérez-Núñez D, Revilla Y. 2022. African swine fever virus ubiquitin-conjugating enzyme pI215L inhibits IFN-I signaling pathway through STAT2 degradation. Front Microbiol 13:1081035.
286. Zhang F, Hopwood P, Abrams CC, Downing A, Murray F, Talbot R, Archibald A, Lowden S, Dixon LK. 2006. Macrophage transcriptional responses following in vitro infection with a highly virulent African swine fever virus isolate. J Virol 80:10514–10521.
287. Karalyan Z, Voskanyan H, Ter-Pogossyan Z, Saroyan D, Karalova E. 2016. IL-23/IL-17/G-CSF pathway is associated with granulocyte recruitment to the lung during African swine fever. Vet Immunol Immunopathol 179:58–62.
288. Zakaryan H, Cholakyans V, Simonyan L, Misakyan A, Karalova E, Chavushyan A, Karalyan Z. 2015. A study of lymphoid organs and serum proinflammatory cytokines in pigs infected with African swine fever virus genotype II. Arch Virol 160:1407–1414.
289. Zheng X, Nie S, Feng W-H. 2022. Regulation of antiviral immune response by African swine fever virus (ASFV). Virol Sin 37:157–167.
290. Fishbourne E, Abrams CC, Takamatsu H-H, Dixon LK. 2013. Modulation of chemokine and

chemokine receptor expression following infection of porcine macrophages with African swine fever virus. Vet Microbiol 162:937–943.
291. Franzoni G, Dei Giudici S, Oggiano A. 2018. Infection, modulation and responses of antigen-presenting cells to African swine fever viruses. Virus Res 258:73–80.
292. Zhuo Y, Guo Z, Ba T, Zhang C, He L, Zeng C, Dai H. 2021. African Swine Fever Virus MGF360-12L Inhibits Type I Interferon Production by Blocking the Interaction of Importin α and NF-κB Signaling Pathway. 2. Virol Sin 36:176–186.
293. Liu X, Ao D, Jiang S, Xia N, Xu Y, Shao Q, Luo J, Wang H, Zheng W, Chen N, Meurens F, Zhu J. 2021. African Swine Fever Virus A528R Inhibits TLR8 Mediated NF-κB Activity by Targeting p65 Activation and Nuclear Translocation. 10. Viruses 13.
294. Yang J, Li S, Feng T, Zhang X, Yang F, Cao W, Chen H, Liu H, Zhang K, Zhu Z, Zheng H. African Swine Fever Virus F317L Protein Inhibits NF-κB Activation To Evade Host Immune Response and Promote Viral Replication. 5. mSphere 6.
295. Hong J, Chi X, Yuan X, Wen F, Rai KR, Wu L, Song Z, Wang S, Guo G, Chen J-L. 2022. I226R Protein of African Swine Fever Virus Is a Suppressor of Innate Antiviral Responses. 3. Viruses 14:575.
296. Barrado-Gil L, Del Puerto A, Galindo I, Cuesta-Geijo MÁ, García-Dorival I, de Motes CM, Alonso C. 2021. African Swine Fever Virus Ubiquitin-Conjugating Enzyme Is an Immunomodulator Targeting NF-κB Activation. Viruses 13:1160.
297. Gao Q, Yang Y, Luo Y, Chen X, Gong T, Wu D, Feng Y, Zheng X, Wang H, Zhang G, Lu G, Gong L. African Swine Fever Virus Envelope Glycoprotein CD2v Interacts with Host CSF2RA to Regulate the JAK2-STAT3 Pathway and Inhibit Apoptosis to Facilitate Virus Replication. J Virol 97:e01889-22.
298. Chen H, Wang Z, Gao X, Lv J, Hu Y, Jung Y-S, Zhu S, Wu X, Qian Y, Dai J. 2022. ASFV pD345L protein negatively regulates NF-κB signalling by inhibiting IKK kinase activity. 1. Vet Res 53:32.
299. Zhao G, Li T, Liu X, Zhang T, Zhang Z, Kang L, Song J, Zhou S, Chen X, Wang X, Li J, Huang L, Li C, Bu Z, Zheng J, Weng C. 2022. African swine fever virus cysteine protease pS273R inhibits pyroptosis by noncanonically cleaving gasdermin D. J Biol Chem 298:101480.
300. Chen X, Li L-F, Yang Z-Y, Li M, Fan S, Shi L-F, Ren Z-Y, Cao X-J, Zhang Y, Han S, Wan B, Qiu H-J, Zhang G, He W-R. 2023. The African swine fever virus I10L protein inhibits the NF-κB signaling pathway by targeting IKKβ. J Virol 97:e0056923.
301. Borca MV, O'Donnell V, Holinka LG, Ramírez-Medina E, Clark BA, Vuono EA, Berggren K, Alfano M, Carey LB, Richt JA, Risatti GR, Gladue DP. 2018. The L83L ORF of African swine fever virus strain Georgia encodes for a non-essential gene that interacts with the host protein IL-1β. Virus Res 249:116–123.
302. Revilla Y, Callejo M, Rodríguez JM, Culebras E, Nogal ML, Salas ML, Viñuela E, Fresno M. 1998. Inhibition of Nuclear Factor κB Activation by a Virus-encoded IκB-like Protein*. J Biol Chem 273:5405–5411.
303. Granja AG, Nogal ML, Hurtado C, del Aguila C, Carrascosa AL, Salas ML, Fresno M, Revilla Y. 2006. The Viral Protein A238L Inhibits TNF-α Expression through a CBP/p300 Transcriptional Coactivators Pathway1. J Immunol 176:451–462.
304. Miskin JE, Abrams CC, Dixon LK. 2000. African swine fever virus protein A238L interacts with the cellular phosphatase calcineurin via a binding domain similar to that of NFAT. J Virol 74:9412–9420.
305. Wang T, Luo R, Zhang J, Lu Z, Li L-F, Zheng Y-H, Pan L, Lan J, Zhai H, Huang S, Sun Y, Qiu H-J. 2023. The MGF300-2R protein of African swine fever virus is associated with viral pathogenicity by promoting the autophagic degradation of IKKα and IKKβ through the recruitment of TOLLIP. PLOS

Pathog 19:e1011580.
306. Zhou P, Dai J, Zhang K, Wang T, Li L-F, Luo Y, Sun Y, Qiu H-J, Li S. The H240R Protein of African Swine Fever Virus Inhibits Interleukin 1β Production by Inhibiting NEMO Expression and NLRP3 Oligomerization. J Virol 96:e00954-22.
307. Huang L, Liu H, Ye G, Liu X, Chen W, Wang Z, Zhao D, Zhang Z, Feng C, Hu L, Yu H, Zhou S, Zhang X, He X, Zheng J, Bu Z, Li J, Weng C. 2023. Deletion of African Swine Fever Virus (ASFV) H240R Gene Attenuates the Virulence of ASFV by Enhancing NLRP3-Mediated Inflammatory Responses. J Virol 97:e0122722.
308. Powell PP, Dixon LK, Parkhouse RM. 1996. An IkappaB homolog encoded by African swine fever virus provides a novel mechanism for downregulation of proinflammatory cytokine responses in host macrophages. J Virol 70:8527–8533.
309. Tait SWG, Reid EB, Greaves DR, Wileman TE, Powell PP. 2000. Mechanism of Inactivation of NF-κB by a Viral Homologue of IκBα: SIGNAL-INDUCED RELEASE OF IκBα RESULTS IN BINDING OF THE VIRAL HOMOLOGUE TO NF-κB*. J Biol Chem 275:34656–34664.
310. Miskin JE, Abrams CC, Goatley LC, Dixon LK. 1998. A viral mechanism for inhibition of the cellular phosphatase calcineurin. Science 281:562–565.
311. Swanson KV, Deng M, Ting JP-Y. 2019. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. Nat Rev Immunol 19:477–489.
312. Galluzzi L, Brenner C, Morselli E, Touat Z, Kroemer G. 2008. Viral Control of Mitochondrial Apoptosis. 5. PLoS Pathog 4.
313. Chu Y, Dong X, Kang Y, Liu J, Zhang T, Yang C, Wang Z, Shen W, Huo H, Zhuang M, Lu J, Liu Y. 2020. The Chaperone BAG6 Regulates Cellular Homeostasis between Autophagy and Apoptosis by Holding LC3B. iScience 23:101708.
314. Reis AL, Netherton C, Dixon LK. 2016. Unraveling the Armor of a Killer: Evasion of Host Defenses by African Swine Fever Virus. J Virol https://doi.org/10.1128/JVI.02338-16.
315. Afonso CL, Neilan JG, Kutish GF, Rock DL. 1996. An African swine fever virus Bc1-2 homolog, 5-HL, suppresses apoptotic cell death. 7. J Virol 70:4858–4863.
316. Hernaez B, Cabezas M, Muñoz-Moreno R, Galindo I, Cuesta-Geijo MA, Alonso C. 2013. A179L, a new viral Bcl2 homolog targeting Beclin 1 autophagy related protein. Curr Mol Med 13:305–316.
317. Revilla Y, Cebrián A, Baixerás E, Martínez-A C, Viñuela E, Salas ML. 1997. Inhibition of Apoptosis by the African Swine Fever Virus Bcl-2 Homologue: Role of the BH1 Domain. 2. Virology 228:400–404.
318. Banjara S, Caria S, Dixon LK, Hinds MG, Kvansakul M. 2017. Structural Insight into African Swine Fever Virus A179L-Mediated Inhibition of Apoptosis. 6. J Virol 91.
319. Nogal ML, González de Buitrago G, Rodríguez C, Cubelos B, Carrascosa AL, Salas ML, Revilla Y. 2001. African swine fever virus IAP homologue inhibits caspase activation and promotes cell survival in mammalian cells. 6. J Virol 75:2535–2543.
320. Hernaez B, Cabezas M, Munoz-Moreno R, Galindo I, A. Cuesta-Geijo M, Alonso C. 2013. A179L, a New Viral Bcl2 Homolog Targeting Beclin 1 Autophagy Related Protein. Curr Mol Med 13:305–316.
321. Shimmon GL, Hui JYK, Wileman TE, Netherton CL. 2021. Autophagy impairment by African swine fever virus. J Gen Virol 102:001637.
322. Dolata KM, Pei G, Netherton CL, Karger A. 2023. Functional Landscape of African Swine Fever Virus-Host and Virus-Virus Protein Interactions. Viruses 15:1634.
323. Fields S, Song O. 1989. A novel genetic system to detect protein–protein interactions. 6230. Nature 340:245–246.

324. Brent R, Ptashne M. 1984. A bacterial repressor protein or a yeast transcriptional terminator can block upstream activation of a yeast gene. Nature 312:612–615.
325. Vidalain P-O, Jacob Y, Hagemeijer MC, Jones LM, Neveu G, Roussarie J-P, Rottier PJM, Tangy F, de Haan CAM. 2015. A field-proven yeast two-hybrid protocol used to identify coronavirus-host protein-protein interactions. Methods Mol Biol Clifton NJ 1282:213–229.
326. Li S, Armstrong CM, Bertin N, Ge H, Milstein S, Boxem M, Vidalain P-O, Han J-DJ, Chesneau A, Hao T, Goldberg DS, Li N, Martinez M, Rual J-F, Lamesch P, Xu L, Tewari M, Wong SL, Zhang LV, Berriz GF, Jacotot L, Vaglio P, Reboul J, Hirozane-Kishikawa T, Li Q, Gabel HW, Elewa A, Baumgartner B, Rose DJ, Yu H, Bosak S, Sequerra R, Fraser A, Mango SE, Saxton WM, Strome S, Van Den Heuvel S, Piano F, Vandenhaute J, Sardet C, Gerstein M, Doucette-Stamm L, Gunsalus KC, Harper JW, Cusick ME, Roth FP, Hill DE, Vidal M. 2004. A map of the interactome network of the metazoan C. elegans. Science 303:540–543.
327. Guey B, Wischnewski M, Decout A, Makasheva K, Kaynak M, Sakar MS, Fierz B, Ablasser A. 2020. BAF restricts cGAS on nuclear DNA to prevent innate immune activation. Science 369:823–828.
328. Ma H, Qian W, Bambouskova M, Collins PL, Porter SI, Byrum AK, Zhang R, Artyomov M, Oltz EM, Mosammaparast N, Miner JJ, Diamond MS. 2020. Barrier-to-Autointegration Factor 1 Protects against a Basal cGAS-STING Response. mBio 11:e00136-20.
329. Wiebe MS, Jamin A. 2016. The Barrier to Autointegration Factor: Interlocking Antiviral Defense with Genome Maintenance. J Virol 90:3806–3809.
330. Jamin A, Thunuguntla P, Wicklund A, Jones C, Wiebe MS. 2014. Barrier to Autointegration Factor Becomes Dephosphorylated during HSV-1 Infection and Can Act as a Host Defense by Impairing Viral DNA Replication and Gene Expression. PLOS ONE 9:e100511.
331. Ibrahim N, Wicklund A, Wiebe MS. 2011. Molecular characterization of the host defense activity of the barrier to autointegration factor against vaccinia virus. J Virol 85:11588–11600.
332. Lee MS, Craigie R. 1998. A previously unidentified host protein protects retroviral DNA from autointegration. Proc Natl Acad Sci 95:1528–1533.
333. Jacque J-M, Stevenson M. 2006. The inner-nuclear-envelope protein emerin regulates HIV-1 infectivity. 7093. Nature 441:641–645.
334. Nichols RJ, Wiebe MS, Traktman P. 2006. The Vaccinia-related Kinases Phosphorylate the N' Terminus of BAF, Regulating Its Interaction with DNA and Its Retention in the Nucleus. Mol Biol Cell 17:2451–2464.
335. Ramirez-Medina E, Vuono E, Pruitt S, Rai A, Espinoza N, Valladares A, Spinard E, Silva E, Velazquez-Salinas L, Gladue DP, Borca MV. 2022. ASFV Gene A151R Is Involved in the Process of Virulence in Domestic Swine. Viruses 14:1834.
336. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. 2013. Cyclic GMP-AMP Synthase is a Cytosolic DNA Sensor that Activates the Type-I Interferon Pathway. Science 339:10.1126/science.1232458.
337. Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, Chen ZJ. 2013. Cyclic-GMP-AMP Is An Endogenous Second Messenger in Innate Immune Signaling by Cytosolic DNA. Science 339:10.1126/science.1229963.
338. Lepelley A, Martin-Niclós MJ, Le Bihan M, Marsh JA, Uggenti C, Rice GI, Bondet V, Duffy D, Hertzog J, Rehwinkel J, Amselem S, Boulisfane-El Khalifi S, Brennan M, Carter E, Chatenoud L, Chhun S, Coulomb l'Hermine A, Depp M, Legendre M, Mackenzie KJ, Marey J, McDougall C, McKenzie KJ, Molina TJ, Neven B, Seabra L, Thumerelle C, Wislez M, Nathan N, Manel N, Crow YJ, Frémond M-L. 2020. Mutations in COPA lead to abnormal trafficking of STING to the Golgi and interferon signaling. J Exp

Med 217:e20200600.
339. Zhang X, Ye Z, Pei Y, Qiu G, Wang Q, Xu Y, Shen B, Zhang J. 2016. Neddylation is required for herpes simplex virus type I (HSV-1)-induced early phase interferon-beta production. Cell Mol Immunol 13:578–583.
340. Wu Y, Jin S, Liu Q, Zhang Y, Ma L, Zhao Z, Yang S, Li Y-P, Cui J. 2021. Selective autophagy controls the stability of transcription factor IRF3 to balance type I interferon production and immune suppression. Autophagy 17:1379–1392.
341. Wu Q, Lei Y, Zuo Y, Zhang J, Guo F, Xu W, Xie T, Wang D, Peng G, Wang X, Chen H, Fu Z, Cao G, Dai J. 2023. Interactome between ASFV and host immune pathway proteins. mSystems e0047123.
342. Yang F, Lei Y, Zhou M, Yao Q, Han Y, Wu X, Zhong W, Zhu C, Xu W, Tao R, Chen X, Lin D, Rahman K, Tyagi R, Habib Z, Xiao S, Wang D, Yu Y, Chen H, Fu Z, Cao G. 2018. Development and application of a recombination-based library versus library high- throughput yeast two-hybrid (RLL-Y2H) screening system. Nucleic Acids Res 46:e17.
343. Zheng R, Ghirlando R, Lee MS, Mizuuchi K, Krause M, Craigie R. 2000. Barrier-to-autointegration factor (BAF) bridges DNA in a discrete, higher-order nucleoprotein complex. Proc Natl Acad Sci U S A 97:8997–9002.
344. Bradley CM, Ronning DR, Ghirlando R, Craigie R, Dyda F. 2005. Structural basis for DNA bridging by barrier-to-autointegration factor. Nat Struct Mol Biol 12:935–936.
345. Gorjánácz M, Klerkx EPF, Galy V, Santarella R, López-Iglesias C, Askjaer P, Mattaj IW. 2007. Caenorhabditis elegans BAF-1 and its kinase VRK-1 participate directly in post-mitotic nuclear envelope assembly. EMBO J 26:132.
346. Haraguchi T, Koujin T, Segura-Totten M, Lee KK, Matsuoka Y, Yoneda Y, Wilson KL, Hiraoka Y. 2001. BAF is required for emerin assembly into the reforming nuclear envelope. J Cell Sci 114:4575–4585.
347. Haraguchi T, Kojidani T, Koujin T, Shimi T, Osakada H, Mori C, Yamamoto A, Hiraoka Y. 2008. Live cell imaging and electron microscopy reveal dynamic processes of BAF-directed nuclear envelope assembly. J Cell Sci 121:2540–2554.
348. Asencio C, Davidson IF, Santarella-Mellwig R, Ly-Hartig TBN, Mall M, Wallenfang MR, Mattaj IW, Gorjánácz M. 2012. Coordination of kinase and phosphatase activities by Lem4 enables nuclear envelope reassembly during mitosis. Cell 150:122–135.
349. Samwer M, Schneider MWG, Hoefler R, Schmalhorst PS, Jude JG, Zuber J, Gerlich DW. 2017. DNA Cross-Bridging Shapes a Single Nucleus from a Set of Mitotic Chromosomes. Cell 170:956-972.e23.
350. Young AM, Gunn AL, Hatch EM. 2020. BAF facilitates interphase nuclear membrane repair through recruitment of nuclear transmembrane proteins. Mol Biol Cell 31:1551–1560.
351. Halfmann CT, Sears RM, Katiyar A, Busselman BW, Aman LK, Zhang Q, O'Bryan CS, Angelini TE, Lele TP, Roux KJ. 2019. Repair of nuclear ruptures requires barrier-to-autointegration factor. J Cell Biol 218:2136.
352. Montes de Oca R, Shoemaker CJ, Gucek M, Cole RN, Wilson KL. 2009. Barrier-to-Autointegration Factor Proteome Reveals Chromatin-Regulatory Partners. PLoS ONE 4:e7050.
353. Bolderson E, Burgess JT, Li J, Gandhi NS, Boucher D, Croft LV, Beard S, Plowman JJ, Suraweera A, Adams MN, Naqi A, Zhang S-D, Sinclair DA, O'Byrne KJ, Richard DJ. 2019. Barrier-to-autointegration factor 1 (Banf1) regulates poly [ADP-ribose] polymerase 1 (PARP1) activity following oxidative DNA damage. Nat Commun 10:5501.
354. Wang X, Xu S, Rivolta C, Li LY, Peng G-H, Swain PK, Sung C-H, Swaroop A, Berson EL, Dryja TP,

Chen S. 2002. Barrier to autointegration factor interacts with the cone-rod homeobox and represses its transactivation function. J Biol Chem 277:43288–43300.
355. Margalit A, Neufeld E, Feinstein N, Wilson KL, Podbilewicz B, Gruenbaum Y. 2007. Barrier to autointegration factor blocks premature cell fusion and maintains adult muscle integrity in C. elegans. J Cell Biol 178:661–673.
356. Sears RM, Roux KJ. 2020. Diverse cellular functions of barrier-to-autointegration factor and its roles in disease. J Cell Sci 133:jcs246546.
357. Elde NC, Child SJ, Eickbush MT, Kitzman JO, Rogers KS, Shendure J, Geballe AP, Malik HS. 2012. Poxviruses deploy genomic accordions to adapt rapidly against host antiviral defenses. Cell 150:831–841.
358. Jamin A, Wicklund A, Wiebe MS. 2014. Cell- and Virus-Mediated Regulation of the Barrier-to-Autointegration Factor's Phosphorylation State Controls Its DNA Binding, Dimerization, Subcellular Localization, and Antipoxviral Activity. J Virol 88:5342–5355.
359. Bengtsson L, Wilson KL. 2006. Barrier-to-autointegration factor phosphorylation on Ser-4 regulates emerin binding to lamin A in vitro and emerin localization in vivo. Mol Biol Cell 17:1154–1163.
360. Tang M, Suraweera A, Nie X, Li Z, Lai P, Wells JW, O'Byrne KJ, Woods RJ, Bolderson E, Richard DJ. 2023. Mono-phosphorylation at Ser4 of barrier-to-autointegration factor (Banf1) significantly reduces its DNA binding capability by inducing critical changes in its local conformation and DNA binding surface. Phys Chem Chem Phys PCCP 25:24657–24677.
361. Ibrahim N, Wicklund A, Jamin A, Wiebe MS. 2013. Barrier to autointegration factor (BAF) inhibits vaccinia virus intermediate transcription in the absence of the viral B1 kinase. Virology 444:363–373.
362. Wiebe MS, Traktman P. 2007. Barrier to Autointegration Factor is a Host Defense Against Poxvirus Replication that is Overcome by the Viral B1 Kinase. Cell Host Microbe 1:187–197.
363. Mishra AK, Hossain MM, Sata TN, Yadav AK, Zadran S, Sah AK, Nayak B, Shalimar, Venugopal SK. Hepatitis B Virus X Protein Inhibits the Expression of Barrier To Autointegration factor1 via Upregulating miR-203 Expression in Hepatic Cells. Microbiol Spectr 11:e01235-22.
364. Chen H, Engelman A. 1998. The barrier-to-autointegration protein is a host factor for HIV type 1 integration. Proc Natl Acad Sci U S A 95:15270–15274.
365. Cai M, Huang Y, Zheng R, Wei SQ, Ghirlando R, Lee MS, Craigie R, Gronenborn AM, Clore GM. 1998. Solution structure of the cellular factor BAF responsible for protecting retroviral DNA from autointegration. Nat Struct Biol 5:903–909.
366. Broussard G, Ni G, Zhang Z, Li Q, Cano P, Dittmer DP, Damania B. 2023. Barrier-to-autointegration factor 1 promotes gammaherpesvirus reactivation from latency. Nat Commun 14:434.
367. Huang J-W, Niu D, Liu K, Wang Q, Ma L, Chen C-C, Zhang L, Liu W, Zhou S, Min J, Wu S, Yang Y, Guo R-T. 2020. Structure basis of non-structural protein pA151R from African Swine Fever Virus. Biochem Biophys Res Commun 532:108–113.
368. Cassandri M, Smirnov A, Novelli F, Pitolli C, Agostini M, Malewicz M, Melino G, Raschellà G. 2017. Zinc-finger proteins in health and disease. Cell Death Discov 3:17071.
369. Marcelot A, Zinn-Justin S, Cuniasse P. 2023. The Conformation of the Intrinsically Disordered N-Terminal Region of Barrier-to-Autointegration Factor (BAF) is Regulated by pH and Phosphorylation. J Mol Biol 435:167888.
370. Bourry O, Hutet E, Le Dimna M, Lucas P, Blanchard Y, Chastagner A, Paboeuf F, Le Potier M-F.

2022. Oronasal or Intramuscular Immunization with a Thermo-Attenuated ASFV Strain Provides Full Clinical Protection against Georgia 2007/1 Challenge. Viruses 14:2777.
371. Bourry O, Hutet E, Le Dimna M, Lucas P, Blanchard Y, Chastagner A, Paboeuf F, Le Potier M-F. 2022. Oronasal or Intramuscular Immunization with a Thermo-Attenuated ASFV Strain Provides Full Clinical Protection against Georgia 2007/1 Challenge. Viruses 14:2777.
372. Dupré J, Le Potier M-F, Vitour D, Caignard G. 2022. [Modulation of the innate immune response by African swine fever virus]. Virol Montrouge Fr 26:387–400.
373. Dolata KM, Fuchs W, Caignard G, Dupré J, Pannhorst K, Blome S, Mettenleiter TC, Karger A. 2023. CP204L Is a Multifunctional Protein of African Swine Fever Virus That Interacts with the VPS39 Subunit of the Homotypic Fusion and Vacuole Protein Sorting Complex and Promotes Lysosome Clustering. J Virol 97:e0194322.
374. Fablet A, Kundlacz C, Dupré J, Hirchaud E, Postic L, Sailleau C, Bréard E, Zientara S, Vitour D, Caignard G. 2022. Comparative Virus-Host Protein Interactions of the Bluetongue Virus NS4 Virulence Factor. Viruses 14:182.
375. Sarry M, Caignard G, Dupré J, Zientara S, Vitour D, Bakkali Kassimi L, Blaise-Boisseau S. 2023. Host-Specific Interplay between Foot-and-Mouth Disease Virus 3D Polymerase and the Type-I Interferon Pathway. Viruses 15:666.

IDENTIFICATION OF NEW FACTORS OF PATHOGENICITY AND VIRULENCE FOR THE AFRICAN SWINE FEVER VIRUS

African swine fever is a highly pathogenic disease that causes hemorrhagic fever in swine. It is responsible for numerous epizootics, causing major economic losses for the swine industry. The African Swine Fever virus (ASFV) is a double-stranded DNA virus belonging to the *Asfvarviridae* family and composed of more than 150 proteins, many of which still have no described function. There is a close relationship between the ability of certain viral proteins to inhibit the type I interferon (IFN-I) response and the processes of virulence and attenuation of ASFV, but few explanatory mechanisms have been described at the molecular level.

The aim of my project was to identify the molecular mechanisms underlying the hijacking of the cellular machinery and others explaining the escape from the innate immune response by ASFV.

Firstly, we carried out an unbiased screen to identify the cellular partners of a hundred viral proteins encoded by ASFV. Yeast two-hybrid screens were carried out, using viral proteins as bait against a cDNA library derived from pig alveolar macrophages. Eighty-eight new virus-host interactions were identified. One cellular interactor, BANF1, particularly caught our attention because of its role as a cGAS inhibitor and the fact that it was the most frequently identified cellular interactor when the A151R and MGF360-21R proteins were used as baits. We then investigated the function of these two viral proteins and were able to show that they could inhibit the IFN-I pathway.

Secondly, we showed that porcine alveolar macrophages infected with an attenuated strain of ASFV (ASFV 989) produced three times more IFN-I than those infected with the parental Georgia 2007/01 strain. Eight genes have been deleted in this attenuated strain, and one of them (MGF505-4R) encodes for a protein that we have also described as inhibiting the IFN-I response. We were able to show that MGF505-4R interacts with a component of the IFN-I pathway (TRAF3). MGF505-4R thus represents a new virulence factor that can probably explain the attenuation process of ASFV 989 at a molecular level.

Knowledge of the mechanisms and interactions underlying the hijacking of cellular pathways represents a valuable resource for the development of antiviral strategies, including live attenuated vaccines.

KEYWORDS: African swine fever virus, interactomic, IFN-I pathway, virulence, attenuation process

École nationale vétérinaire d'Alfort
7, avenue du général de Gaulle
94 704 Maisons-Alfort Cedex
01 43 96 71 00
vet-alfort.fr

IDENTIFICATION DE NOUVEAUX FACTEURS DE PATHOGENICITÉ ET DE VIRULENCE POUR LE VIRUS DE LA PESTE PORCINE AFRICAINE

La Peste Porcine Africaine est une maladie hautement pathogène causant une fièvre hémorragique chez les suidés. Elle est responsable de nombreuses épizooties, causant de grandes pertes économiques pour la filière porcine. Le virus de la Peste Porcine Africaine (*African Swine fever virus, ASFV*) est un virus à ADN double brin appartenant à la famille des *Asfvarviridae* et composé de plus de 150 protéines dont une grande partie n'a pas encore de fonction décrite. Il existe une étroite relation entre la capacité de certaines protéines virales à inhiber la réponse interféron de type I (IFN-I) et les processus d'atténuation et de virulence de l'ASFV, mais peu de mécanismes explicatifs ont été décrits sur le plan moléculaire.

L'objectif de mon travail de thèse a été d'identifier les mécanismes moléculaires à l'origine du détournement de la machinerie cellulaire et d'autres expliquant l'échappement à la réponse immunitaire innée par l'ASFV.

Dans un premier temps, nous avons effectué un crible sans *a priori* pour rechercher les partenaires cellulaires d'une centaine de protéines virales codées par l'ASFV. Des cribles double-hybride en levure ont ainsi été réalisés, en utilisant les protéines virales comme appâts contre une banque d'ADNc issus de macrophages alvéolaires de porc. Quatre-vingt-huit nouvelles interactions virus-hôte ont ainsi pu être identifiées. Un interacteur cellulaire, BANF1, a particulièrement retenu notre attention en raison de son rôle inhibiteur de cGAS et du fait qu'il soit l'interacteur cellulaire majoritairement identifié lors de nos cribles, en utilisant les protéines A151R et MGF360-21R comme appâts. Nous nous sommes ensuite intéressés à la fonction de ces deux protéines virales et avons pu montrer qu'elles étaient capables d'inhiber la voie IFN-I.

Dans un deuxième temps, nous avons montré que des macrophages alvéolaires porcins infectés par une souche d'ASFV atténuée (ASFV 989) produisent trois fois plus d'IFN-I par rapport à ceux infectés par la souche parentale Georgia 2007/01. Or, huit gènes ont été délétés dans cette souche atténuée et l'un d'entre eux (MGF505-4R) code pour une protéine que nous avons aussi décrite pour inhiber la réponse IFN-I. Nous avons pu montrer que MGF505-4R interagit avec un composant de la voie IFN-I (TRAF3). MGF505-4R représente ainsi un nouveau facteur de virulence pouvant probablement expliquer le processus d'atténuation de la souche ASFV 989 sur le plan moléculaire.

La connaissance des mécanismes explicatifs et interactions sous-jacentes au détournement des voies représente une ressource précieuse pour le développement de stratégies antivirales dont les vaccins vivants atténués.

MOTS CLÉS : Virus de la peste porcine africaine, interactomique, voie IFN-I, virulence, processus d'atténuation

École nationale vétérinaire d'Alfort
7, avenue du général de Gaulle
94 704 Maisons-Alfort Cedex
01 43 96 71 00
vet-alfort.fr