

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

Laboratoire de Microbiologie

Ecole Doctorale n°258 : Science, Technologie, Santé

N° 300A

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Virologie, Biologie Cellulaire et Biochimie

présentée et soutenue publiquement le

29 avril 2003

par

Raphaël DUVAL

né le 08 mars 1972 à Limoges (Haute-Vienne)

Expression des différentes voies apoptotiques induites par le
rétrovirus Visna.

Directeur de Thèse : Mme le Professeur Claudine BOSGIRAUD

JURY

M. le Professeur Jean-Louis BENEYTOUT (Université de Limoges)	Président
Mme le Professeur Sylviane BILLAUDEL (Université de Nantes)	Rapporteur
M. Le Professeur Ernst PETERHANS (Université de Berne)	Rapporteur
Mme le Professeur Claudine BOSGIRAUD (Université de Limoges)	Directeur
Mme Sylvie DELEBASSEE (Université de Limoges)	Codirecteur

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE :

Monsieur le Professeur HABRIOUX Gérard

ASSESEURS :

Madame le Professeur CHULIA Dominique

Monsieur COMBY Francis, Maître de Conférences

PROFESSEURS :

BENEYTOUT Jean-Louis

BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE

BOSGIRAUD Claudine

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE-PARASITOLOGIE

BROSSARD Claude

PHARMACOTECHNIE

BUXERAUD Jacques

CHIMIE ORGANIQUE

CHIMIE THERAPEUTIQUE

CARDOT Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE et BROMATOLOGIE

CHULIA Albert

PHARMACOGNOSIE

CHULIA Dominique

PHARMACOTECHNIE

DELAGE Christiane

CHIMIE GENERALE et MINERALE

DREYFUSS Gilles

PARASITOLOGIE

DUROUX Jean-Luc

BIOPHYSIQUE

GHESTEM Axel

BOTANIQUE et CRYPTOLOGIE

HABRIOUX Gérard

BIOCHIMIE FONDAMENTALE

LACHATRE Gérard

TOXICOLOGIE

MOESCH Christian

HYGIENE-HYDROLOGIE-ENVIRONNEMENT

LOUDART Nicole

PHARMACODYNAMIE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

Madame ROCHE Doriane

A Madame le Professeur BOSGIRAUD
Professeur des Universités de Bactériologie Virologie Parasitologie
Faculté de Pharmacie, Université de Limoges
Directeur de Thèse

Recevez mes plus sincères remerciements pour la bienveillance avec laquelle vous m'avez accueilli dans votre service, pour la confiance que vous m'avez accordée et pour votre soutien précieux qui ont fait progresser ce travail.

Très respectueusement je tiens à vous exprimer ma gratitude et mon profond respect.

A Madame le Professeur BILLAUDEL
Professeur des Universités de Virologie
Laboratoire de Virologie
UPRES-EA 1156, Institut de Biologie, CHRU de Nantes

Je suis très heureux que vous ayez accepté d'être le rapporteur de ce mémoire.
Veuillez trouver ici l'expression de notre plus profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur PETERHANS
Institut de Virologie Vétérinaire
Université de Berne (Suisse)

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Veuillez recevoir mes sincères remerciements et l'assurance de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur BENEYTOU
Professeur des Universités de Biochimie et Biologie Moléculaire
Faculté de Pharmacie, Université de Limoges
UPRES EA 1085 Biomolécules et cibles cellulaires tumorales

Je suis très touché de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail.

Soyez remercié de l'honneur que vous me faites d'être présent dans ce jury et soyez assuré de tout mon respect et de ma profonde gratitude.

A Madame Sylvie DELEBASSEE
Maître de Conférences des Universités de Bactériologie Virologie
Faculté de Pharmacie, Université de Limoges
Co-directeur de Thèse

Je vous adresse ma sincère reconnaissance pour vos conseils, votre disponibilité, votre soutien, ils ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je suis particulièrement honoré de votre présence dans ce jury de thèse.

Ces travaux de recherche ont été réalisés grâce à l'obtention d'une bourse PDZR, attribuée par le Conseil Régional du Limousin.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude M le Professeur DUMAS, directeur de l'Institut Fédératif « Santé Environnement des Sociétés » (SES).

Je remercie l'« Institut de Pathologie Expérimentale et Comparée » (IPCE) pour son soutien financier à la réalisation de ce travail.

Au laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Limoges.

Je tiens à remercier très vivement Madame R. Mouzet pour sa sympathie et sa bonne humeur, l'équipe d'enseignants, Monsieur le Professeur G. Dreyfuss, Madame J. Cook-Moreau pour leurs encouragements, leurs connaissances scientifiques et leurs conseils ainsi que tous les autres membres du laboratoire pour leur accueil chaleureux.

Je tiens à remercier tout particulièrement ma petite femme de labo « Ninie ».

« A mamie, tata, tonton et surtout maman ! ! ! ».

Enfin je remercie tous ceux qui à titre divers au sein des Facultés de Pharmacie et de Médecine qui m'ont aidé et soutenu.

A mes frères Igor et Yves ainsi qu'à tous mes amis :

Laurent,

Pierre-Olivier, Serge, Bertrand, Claude, Jean-Christophe, David,

Virginie, Lucie, Cécile,

Alain, Patrick,...

Mesdames Delage, Allais, Dreyfuss, et Messieurs Vignoles, Cardi, Duroux, Habrioux.

*« Per mintaini d'in moun cœur lu souvenir dei mo grando Maî et
dei moun grand Paî »*

A ma « petite » mamie

A mes parents

A tous les membres de ma famille

A ma belle-famille

A mes amis

A Catherine

A Marianne

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
ABREVIATIONS	5
INTRODUCTION.....	15
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	19
CHAPITRE I : L' APOPTOSE	20
I. Les différents types de mort cellulaire	20
II. Importance du processus apoptotique.....	21
III. Les modifications cellulaires caractéristiques induites par l'apoptose.....	25
IV. Mécanismes de l'apoptose.....	29
CHAPITRE II : VIRUS ET APOPTOSE.....	56
I. Stratégies virales de régulation de la voie des récepteurs de mort.....	58
II. Les molécules virales homologues de la protéine anti-apoptotique Bcl-2	62
III. Les inhibiteurs viraux des caspases	64
IV. Stratégies virales de régulation du cycle cellulaire	66
V. Stratégies virales de modulation du « système IFN ».....	69
VI. Stratégies virales sur le contrôle du réticulum endoplasmique	70
VII. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).....	72
CHAPITRE III : LE VIRUS VISNA-MAEDI.....	76
I. Historique	76
II. Structure et génome du Visna-Maedi	78
III. Tropisme cellulaire et cycle de réplication.....	86
IV. La maladie	87

PARTIE EXPERIMENTALE.....	90
MATERIELS ET METHODES	91
I. Culture cellulaire	92
II. Le virus Visna et son titrage	93
III. Induction de l'apoptose sur les cellules de PC.....	96
IV. Analyse des modifications nucléaires apoptotiques.....	97
V. Dosage de l'activité Lactate Déshydrogénase (LDH)	102
VI. Etude du clivage de la PARP	104
VII. Etude de la libération du cytochrome c.....	105
VIII. Marquage du relargage de l'AIF.....	106
IX. Etude de la translocation de la phosphatidylsérine	107
X. Dosage des activités caspases.....	108
XI. Effets des inhibiteurs synthétiques de caspases sur l'activation des caspases au cours de l'apoptose Visna induite	113
XII. Effets des inhibiteurs irréversibles de caspases sur l'ECP Visna induit.....	114
XIII. Marquage <i>in situ</i> avec le FITC-VAD-FMK	115
XIV. Technique de double marquage DAPI/ FITC-VAD-FMK.....	115
XV. Tests statistiques	116
RESULTATS	117
I. Recherche d'un témoin positif d'apoptose.....	118
II. Modifications morphologiques observées au cours de l'infection par le virus Visna	121
III. Etude de l'intégrité membranaire des cellules PC infectées.....	129
IV. Recherche de la translocation de la phosphatidylsérine.....	129
V. Clivage de la PARP	131
VI. Mise en évidence de l'activation des caspases apoptotiques.....	131
VII. Mise en évidence des différentes voies de transduction du signal induites.....	139
VIII. Implication des caspases au cours de l'infection par le virus Visna.....	146
DISCUSSION	160

CONCLUSION	175
BIBLIOGRAPHIE	179
TABLE DES MATIERES	214
TABLE DES FIGURES.....	220
ANNEXES	223

ABREVIATIONS

A

Abs : Absorbance

Ac : Anticorps

Ac-DEVD-AMC : acétyl-[DEVD]-7-amino-4-methylcoumarin

Ac-DEVD-CHO : acétyl-[DEVD]-aldéhyde

Ac-IETD-AMC : acétyl-[IETD]-7-amino-4-methylcoumarin

Ac-IETD-CHO : acétyl-[IETD]-aldéhyde

Ac-LEHD-AMC : acétyl-[LEHD]-7-amino-4-methylcoumarin

Ac-LEHD-CHO : acétyl-[LEHD]-aldéhyde

Ac-YVAD-AMC : acétyl-[YVAD]-7-amino-4-methylcoumarin

Ac-YVAD-CHO : acétyl-[YVAD]-aldéhyde

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AFC : 7-amino-4-trifluoromethylcoumarin

AIF : « Aptoptosis Inducing Factor »

Akt : « serine/threonine protein kinase »

AMC : « 7-amino-4-methylcoumarin »

ANT : « Adenine Nucleotide Translocator »

AP-1 : « Activator protein-1 », facteur de transcription

Apaf : « Aptoptosis Protein Activating Factor »

Apo2L : « Apo2 Ligand »

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

B

Bad : « Bcl-X_L/bcl-2 associated death promoter homolog »

Bag : « Bcl-2 associated athanogene »

Bak : « Bcl-2 homologous antagonist/killer »

Bax : « Bcl-2 associated X protein »

BCBL : « body cavity-based lymphoma »

Bcl-2 : « B cell lymphoma leukemia »

Bcl-x : « Bcl-2 homolog X protein from avian lymphocyte development »

Bcl-x_L : « longer alternatively spliced form of Bcl-x »
Bcl-x_S : « shorter alternatively spliced form of Bcl-x »
BET : Bromure d'éthidium
BH : « Bcl-2 Homology »
BHRF-1 : « BamH1 fragment H righward reading frame 1 »
BHV : « Bovine herpesvirus », virus herpès bovin
Bid : « BH3 interacting death domain agonist »
Bik : « Bcl-2 interacting killer »
Bim : « Bcl-2 interacting mediator of cell death »
BIV : « Bovine Immunodeficiency Virus »
Blk : « Bik-like killer protein »
Bod : « Bcl-2-related ovarian death agonist »
Bok : « Bcl-2-related ovarian killer »
Boo : « Bcl-2 homologue of ovary »
BSA : « bovine serum albumine », albumine sérique bovine

C

C. elegans : Caenorhabditis elegans
CA : capside
CAD : « Caspase-Activated Dnase »
CAEV : « Caprine Arthritis-Encephalitis Virus »
CARD : « Caspase Recruitment Domain »
Caspase : « Cysteine Aspartate Protease »
CD4 : « Cluster of Differentiation 4 »
CD8 : « Cluster of Differentiation 8 »
Ced : C. elegans death genes
cIAP : « cellular-IAP »
CMV : cytomégalovirus
CrmA : « cytokine response modifier A »
CTL : « cytotoxic T lymphocytes »

D

D. melanogaster : Drosophilla melanogaster

DAB : 3,3'-diamidinobenzidine

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

dATP : deoxyATP

DD : « Death Domain », domaine de mort

DED : « Death Effector Domain », domaine effecteur de mort

DEVD : Asparate-Glutamate-Valine-Aspartate

DFF : « DNA Fragmentation Factor »

Diablo : « direct IAP binding protein with low pI »

DICC50 : Dose infectant à 50% les cellules en culture

DISC : « Death-Inducing-Signaling-Complex »

Diva : « death inducer binding to vBcl-2 and Apaf-1 »

DMEM : « Dulbecco's modified Eagle's medium », milieu minimum essentiel Dulbecco's modification de Eagle

DMSO : Diméthylsulfoxide

DNA : « Deoxyribonucleic Acid »

DNA-PK : « DNA protein kinase »

DNase : désoxyribonucléase

dNTP : déoxynucléotides triphosphates

DR : « Death Receptor »

DRAF : « dsRNA-activated transcription factor complex »

DRONC : « Drosophilla Nedd-2 like caspase »

dsRNA : « double stranded RNA »

DTT : Dithiothreitol

E

EBNA- : « Epstein Barr virus-encoded nuclear antigen »

EBV : « Epstein-Barr virus », virus Epstein Barr

ECP : Effet Cytopathologique

EDTA : « Ethylenediaminetetraacetic acid », Acide éthylène diamine tétra-acétique

Egl-1 : « egg laying defective-1 »

EHV : « Equine HerpesVirus », virus herpès équin

EIAV : « Equine Infectious Anaemia Virus »
ELISA : « Enzyme linked immuno-sorbent assay »
Env : « envelope », protéine d'enveloppe
ERK : « Extracellular signal-Regulated Kinase »
ESB : Encéphalopathie Spongiforme Bovine

F

FADD : « Fas Associated Death Domain protein »
FasL : « Fas Ligand »
FITC : Fluorescéine IsoThioCynate
FITC-VAD-FMK : Fluorescéine IsoThioCynate-[VAD]-FluoroMethylKetone
FIV : « Feline Immunodeficiency Virus »
FLICE : « FADD-like IL-1 β -converting enzyme »
FLIP : « FLICE Inhibitory Protein »
FMK : « FluoroMethylKetone », fluoro-méthyl cétone

G

g : gramme
Gag : « group-specific antigen »
gp : glycoprotéine
GrB : Granzyme B

H

HBx : « Hepatitis B virus protein X »
HCMV : « Human CytoMegaloVirus »
HEPES : acide N-[2-hydroxyéthyl]piperazine-N'-[2-éthanesulfonique]
HHV : « Human Herpes Virus »
hIAP : « human IAP »
HIV : « Human Immunodeficiency Virus », VIH
HPV : « Human PapillomaVirus », papillomavirus humains
Hrk : Harakiri
HSV : « Herpes Simplex Virus »
HVS : « HerpesVirus Saimiri »

I

IAP : « Inhibitor of Apoptosis Proteins »

ICAD : « Inhibitor of Caspase-Activated DNase »

ICE : « IL-1 β Converting Enzyme »

IETD : Isoleucine-Glutamate-Thréonine-Aspartate

IFN : Interféron

IFN I : IFN de type I

IFN II : IFN de type II

Ig : Immunoglobuline

IL : interleukine

IRF : « IFN Regulatory factor »

J

JNK : « c-jun N-terminal kinase »

K

Kb : kilobases

KDa : kilo Dalton

Kpb : Kilo paires de base

KS-Bcl2 : « Kaposi sarcoma Bcl-2 homologue »

KSHV : « Kaposi sarcoma human virus »

L

LANA : « Latency-Associated Nuclear Antigen »

LARD : « Lymphocyte-Associated Receptor of Death »

LDH : Lactate Déshydrogénase

LEHD : Leucine-Glutamate-Histidine-Aspartate

LMP-1 : « Latent Membrane Protein-1 »

LTC : Lymphocytes T cytotoxiques

LTR : « Long Terminal Repeat »

M

MA : protéine de matrice

mAb : « monoclonal antibody », anticorps monoclonal

MACH : « MORT1 associated CED-3 homologue »

Mcl-1 : ML-1 human myeloid leukemia cell line

MCP : Mort Cellulaire Programmée

MCV : *molluscum contagiosum virus*

mg : milligramme

MGG : May-Grünwald Giemsa

MHV : « Murine HerpesVirus », virus herpès murin

mM : millimolaire

MOI : « Multiplicity of Infection », multiplicité d'infection

MRIT : « MACH-related inducer of cytotoxicity »

MTT : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide

N

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide (forme oxydée)

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)

NC : nucléoprotéine

Nef : « negative regulator factor »

NF-κB : « Nuclear Factor-Kappa B », facteur nucléaire -κB

NGF : « Nerve Growth Factor »

NGFR : « Nerve Growth Factor Receptor »

nm : nanomètre

O

ORF : « Open Reading Frame »

P

PAF : paraformaldéhyde

PAK-2 : « P21 Activated Kinase-2 »

PARP : Poly-ADP Ribose-Polymerase

pb : paires de base

PBS : « Phosphate Buffer Saline », tampon phosphate salin
PC : Plexus Choroïde
pH : potentiel hydrogène
PKC : « Protein Kinase C »
PKR : « dsRNA-dependent serine/threonine protein kinase »,
pNa : p-nitroanilide
Pol : « Polymerase »
pRb : « retinoblastoma tumours suppressor protein »
PTP : « Permeability Transition Pores »

Q

R

RAIDD : « RIPK1 Domain containing Adapter with DD »
RE : Réticulum Endoplasmique
Rev : « Regulator of virion protein expression »
RIP : « Receptor Interacting Protein »
RIPK : « RIP kinase »
ROI : « reactive oxxygen intermediates »
RRE : « Rev responsive element »

S

S : Unité Svedberg
S. frugiperda : *Spodoptera frugiperda*
Serpine : « Serine protease inhibitor »
SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Acquise
SIV : « Simian Immunodeficiency Virus »
Smac : « Second mitochondria-derived activator of caspase »
SNC : Système Nerveux Central
SU : glycoprotéine de surface
SV40 : « Simian virus 40 »
SVF : Sérum de Veau Fœtal

T

Tat : « trans activator of transcription », protéine trans-activatrice

TBE : tris-borate-EDTA

TM : glycoprotéine transmembranaire

TNF α : « Tumor Necrosis Factor alpha »

TNF-R : « Tumor Necrosis Factor-Receptor »

TRADD : « TNF-Receptor Associated Death Domain protein »

TRAF-2 : « TNF-R Associated Factor-2 »

TRAIL : « Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand »

TRAMP : « TNF receptor-related apoptosis-mediating protein »

TRICK : « TRAIL receptor inducer of cell killing »

TUNEL : « Terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling »

TWEAK : « TNF-related weak inducer of apoptosis »

U

URF : Unité Relative de Fluorescence

UV : Ultraviolet

V

VAD : Valine-Alanine-Aspartate

VDAC : « Voltage Dependent Anion Channel »

v-FLIP : « viral-FLIP »

VHB : Virus de l'Hépatite B

VHC : Virus de l'Hépatite C

Vif : « viral infectivity factor »

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VIH-1 : VIH de type 1

VMV : « Visna Maedi Virus »

VpR : « viral protein R »

VpU : « viral protein U »

VpX : « viral protein X »

VV : virus Visna

W

X

XIAP : « X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein »

Y

YVAD : Tyrosine-Valine-Alanine-Aspartate

Z

z-DEVD-FMK : benzoxycarbonyl-[DEVD]-FMK

z-VAD-FMK : benzoxycarbonyl-[VAD]-FMK

z-YVAD-FMK : benzoxycarbonyl-[YVAD]-FMK

INTRODUCTION

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire qui intervient aussi bien lors des nombreuses étapes de différenciation que le maintien de l'homéostasie cellulaire... Parmi tous les centres d'intérêt de la Biologie, l'apoptose est devenue un domaine à part entière au cours des années 1980. Les processus de cette mort, au cours de laquelle la cellule entrain de mourir participe activement à sa destruction sont de mieux en mieux compris.

S'il existe actuellement un débat pour établir quels sont les auteurs qui ont fait mention pour la première fois d'un processus de mort cellulaire apparaissant nécessaire au développement d'organismes supérieurs, la paternité du terme apoptose est attribuée à J.F. Kerr qui, à la suite de ses travaux, aboutit en 1972 à la description de deux types morphologiques distincts de mort cellulaire. Dans le premier cas, il s'agit d'une mort accidentelle, rapide, impliquant une rupture de différents compartiments menant à « l'explosion » de la cellule : c'est la nécrose, connue depuis longtemps. Dans le deuxième cas, la cellule se condense puis forme des invaginations qui évoque une « implosion », après quoi elle est phagocytée par les cellules environnantes : c'est l'apoptose.

Au début, la caractérisation de cette mort cellulaire par apoptose se faisait uniquement sur des critères morphologiques : réduction du cytoplasme, modification de l'intégrité de la membrane plasmique, relocalisation des organites cytoplasmiques, margination puis pycnose chromatinienne, et enfin fragmentation du noyau et du cytoplasme en « corps apoptotiques ».

L'engouement pour cette découverte et la somme considérable des travaux qui en résulta, a permis au début des années 1990 d'établir une base biochimique du processus apoptotique : chute du potentiel transmembranaire mitochondrial, ecto-exposition des phosphatidyl-sérines, activation de protéases de la famille des caspases, découpage de l'ADN en fragments de haut poids moléculaires et/ou oligonucléosomes.

A l'heure actuelle, l'évolution des recherches se focalise plutôt sur les différents gènes impliqués dans le processus apoptotique et sur leur régulation.

Ainsi, l'apoptose est définie comme une mort génétiquement programmée des cellules. Elle se déroule d'une manière ordonnée, contrôlée par des protéines codées par des gènes cellulaires, et traduit la réponse des cellules à divers **stimuli exogènes** comme des stress divers en facteurs trophiques ou hormonaux... ou **endogènes** comme des lésions génétiques, une activation oncogénique...

L'apoptose intervient aussi bien en conditions physiologiques, lors de l'élimination de cellules superflues ou dangereuses pour l'organisme, que dans le développement de certaines pathologies où elle peut être, selon le cas, en excès ou en déficit. Ainsi elle est impliquée dans

au moins trois catégories de phénomènes biologiques : (i) le développement embryonnaire et l'homéostasie, (ii) le vieillissement et (iii) la défense de l'organisme contre les cellules tumorales et les infections bactériennes ou virales.

La contribution de l'apoptose dans l'élaboration des organismes pluricellulaires préfigure donc, son intervention dans la protection des organismes humains ou animaux, en particulier contre les infections virales. Il a été démontré que l'apoptose peut avoir un rôle ambivalent au cours des infections : si elle peut limiter la multiplication des microorganismes au niveau cellulaire, elle semble parfois faire partie intégrante de la stratégie de multiplication des agents infectieux dans un organisme. Ce phénomène est particulièrement bien décrit au cours de l'infection par le VIH, mais il s'applique aussi à d'autres virus : comme les Adénovirus, le virus Epstein Barr...

Pour se multiplier au sein d'un hôte, les virus animaux pathogènes interfèrent sur tout un ensemble de fonctions cellulaires propres à l'hôte, aussi essentiels que les voies de synthèses protéiques et les voies du système immunitaire de défense de l'hôte qui sont naturellement induites au cours d'une infection virale. Pour assurer leur survie, les virus ont donc développé des stratégies pour contrôler, voire détourner ces voies à leur profit.

Au cours de ces dernières années un nombre toujours plus important de travaux ont permis de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques liés aux infections virales en identifiant certaines protéines virales impliquées dans la prise de contrôle de l'hôte. Ces protéines peuvent soit inhiber, soit favoriser les mécanismes apoptotiques de l'hôte. En effet, une induction précoce de l'apoptose au cours du cycle viral limiterait la libération abondante de particules virales produites, en interrompant la réplication virale et en limitant la propagation des virus chez l'hôte. A l'inverse, une apoptose tardive, retardée, prolonge la survie cellulaire et permet une production plus importante de virions. Ce dérèglement de la voie d'induction d'apoptose peut entraîner une persistance et une latence virale et parfois même l'immortalisation et la transformation cellulaire. Nous prenons alors conscience de la complexité des stratégies virales pour la prise de contrôle de l'hôte, liées à l'intervention de protéines virales et cellulaires suivant un schéma tactique bien défini et spécifique.

Dans ce travail nous ferons tout d'abord une mise au point bibliographique sur les processus d'apoptose actuellement connus, en nous intéressant aux mécanismes d'apoptose viro-induits, afin de mieux comprendre les mécanismes viraux d'invasion de l'hôte. Puis nous développerons dans la partie expérimentale comment nous avons mis en évidence l'apoptose

rétroviro-induite, en utilisant comme modèle d'étude l'infection par le virus Visna sur des cellules issues de plexus choroïde.

Les objectifs poursuivis ont été dans un premier temps de mettre en évidence (i) les modifications morphologiques (condensation du cytoplasme, condensation chromatinienne, formation des corps apoptotiques...), et (ii) les différents marqueurs biochimiques associés (translocations des résidus phosphatidylsérines, activation des caspases, fragmentation chromatinienne...) caractéristiques de l'induction d'un processus apoptotique. Nous avons ensuite recherché quelles pouvaient être les différentes voies de transduction du signal pro-apoptotique induites par le virus Visna (voies dépendantes des caspases : voies extrinsèque et intrinsèque, ou voie indépendante : voie de l'AIF). Enfin, nous avons montré que l'expression de l'effet cytopathologique Visna-induit, qui se traduit par une lyse cellulaire massive, et la production de particules virales étaient étroitement liées à l'activation de protéases spécifiques de l'apoptose : les caspases, et plus particulièrement les caspases -3, -8 et -9.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : L'APOPTOSE

L'apoptose ou mort cellulaire programmée (MCP) est un processus actif d'autodestruction en réponse à des signaux déclencheurs de mort ou à l'absence de signaux de survie dans l'environnement de la cellule. L'apoptose joue un rôle déterminant au cours du développement et du fonctionnement du système immunitaire, de l'homéostasie cellulaire et de la morphogénèse tissulaire. C'est un phénomène hautement régulé au cours duquel des enzymes cataboliques dégradent des molécules essentielles, aboutissant aux caractéristiques biochimiques et morphologiques typiques de la mort cellulaire programmée. La notion d'apoptose a été introduite par Kerr, Wyllie et Currie en 1972, pour décrire une forme de mort cellulaire différente de la nécrose, seule forme connue à cette époque. Le terme «apo-» (achèvement) «-ptose» (chute) évoque la chute caduque des feuilles en automne et sous-entend un rôle homéostatique. Depuis 30 ans, une littérature importante a permis de mieux comprendre la séquence d'événements cellulaires biochimiques et morphologiques qui sont à la base des techniques de détection de l'apoptose.

I. Les différents types de mort cellulaire

La nécrose représente une mort accidentelle, rapide et uniquement observée dans certaines conditions pathologiques. C'est une agonie violente et traumatique de la cellule qui survient lorsque celle-ci est agressée par des agents cytotoxiques (physiques ou chimiques) ou lorsqu'elle est soumise à des variations extrêmes des conditions physiologiques (hypoxie, hypothermie). La nécrose est un phénomène considéré comme passif et «désordonné» qui résulte d'une incapacité de la cellule à maintenir son homéostasie, conduisant à une entrée massive d'eau et d'électrolytes dans la cellule. La cellule et les organites intracellulaires (mitochondries, réticulum endoplasmique, noyau) gonflent jusqu'à éclater. Parallèlement, l'ADN est clivé de manière aléatoire par des endonucléases (Dong et al., 1997). La cellule nécrotique explose, libérant son contenu dans le milieu environnant, notamment les enzymes lysosomiales et d'autres métabolites, qui entraînent un processus nécrotique chez les cellules environnantes. Cette propagation est à l'origine de la réaction inflammatoire.

Par opposition à la nécrose, **l'apoptose** est un processus actif et ordonné, qui survient naturellement lors de l'évolution physiologique d'un organisme mais aussi dans certaines situations pathologiques. Elle résulte d'un ensemble très régulé d'activations enzymatiques et d'expression de gènes pro- et anti-apoptotiques qui vont induire l'autodestruction de la cellule sans léser les cellules environnantes, préservant ainsi l'intégrité tissulaire, voire celle de l'organisme (Raff et al., 1993). Ainsi, au cours de l'apoptose, il n'y a pas fuite de substances toxiques, les cellules environnantes ne sont pas affectées, il n'y a donc pas de réaction inflammatoire (Afford & Randhawa, 2000).

Récemment, l'équipe de Bredesen a décrit une autre forme de mort cellulaire programmée : **la paraptose** (Sperandio et al., 2000). Ce processus n'impliquerait pas les mêmes gènes ni les mêmes enzymes que l'apoptose. Ce processus est présent chez certains micro-organismes, comme les moisissures, incapables de mourir par apoptose. Il est possible que la paraptose représente une des premières voies de MCP qui se soit développée au cours de l'évolution (Wyllie & Golstein, 2001).

II. Importance du processus apoptotique

L'apoptose est une des fonctions normales de l'organisme qui a pour but d'éliminer les cellules inutiles et/ou potentiellement dangereuses. Elle intervient dans les étapes du développement au cours de l'embryogenèse et l'organogenèse : formation de cavité, élimination de la peau entre les doigts ou d'autres structures devenues inutiles (Meier et al., 2000). Au cours du développement du système nerveux central chez les vertébrés, en moyenne 50% des neurones dégèrent au cours de la période périnatale. L'ampleur du phénomène varie selon les différentes populations de neurones. Ce phénomène est en partie contrôlé par des facteurs trophiques rétrogrades spécifiques, sécrétés au niveau des territoires d'innervation. La survie des neurones dépendrait de leur capacité d'accéder à une quantité suffisante de facteurs neurotrophiques : ceux qui reçoivent suffisamment de facteurs neurotrophiques survivent, les autres dégèrent (Raff, 1992). Il y a donc une sélection des neurones bien connectés. L'apoptose par privation de facteurs trophiques est un processus qui permet d'ajuster le nombre de neurones au nombre de cellules environnantes (Feldmann, 1999).

DEFICIT DE L' APOPTOSE	EXCES D' APOPTOSE
Cancers : Cancer mammaire Cancer de la prostate Cancer ovarien Lymphome folliculaire Leucémies Syndrome lymphoprolifératif	Maladies neurodégénératives : Alzheimer Parkinson Huntington Sclérose latérale amyotrophique Syndrome myélodysplasique
	Athérosclérose
Maladies auto-immunes : Lupus érythémateux disséminé	Infarctus du myocarde
Syndrome d'hyper-éosinophilie	Anémies aplasiques
	Ischémies
Infections virales : Herpes Virus Poxvirus Adénovirus...	Infections virales : SIDA Hépatites B et C...
Ostéoporose	Troubles hépatiques
	Colite ulcérate
Troubles du développement	Troubles du développement

Tableau 1 : Exemples de situations pathologiques où l'apoptose est impliquée.

Chez la femme, l'apoptose est impliquée dans l'involution des seins après le sevrage (Strange et al., 2001) ou dans la régression de l'endomètre utérin au cours des menstruations (Vinatier et al., 2001).

L'apoptose assure également le remodelage et le maintien de l'homéostasie des tissus, c'est à dire la conservation du nombre et de la qualité des cellules qui les constituent (Evan & Littlewood, 1998). A tout moment alors que des milliers de cellules se divisent dans notre organisme, un grand nombre de cellules entament un processus d'autodestruction. L'apoptose s'avère essentielle dans l'élimination des cellules superflues, mutées, ectopiques, sénescents, infectées ou endommagées.

Enfin, l'apoptose est essentielle à la régulation de la réponse immunitaire. Tout d'abord, les cellules immunitaires prolifèrent pour lutter contre un agent étranger. Celui-ci, une fois éliminé, une grande partie de ces cellules est détruite afin d'éviter un emballement de la réponse immunitaire qui pourrait causer de graves dommages à l'organisme (Ekert & Vaux, 1997 ; Feldmann, 1999 ; Krammer, 2000).

La mort cellulaire programmée est aussi observée dans des situations pathologiques. Un déficit ou excès d'apoptose sont associés à diverses maladies, chez l'homme (Tableau 1), les animaux mais également chez les plantes.

Le déficit de l'apoptose est fréquemment associé au développement de maladies auto-immunes et lymphoprolifératives (Neurath et al., 2001 ; Rich et al., 1999), aux phénomènes de carcinogenèse (Agnantis & Goussia, 1999) ou aux infections virales pendant lesquelles les virus mettent en place des systèmes d'inhibition d'apoptose afin d'envahir l'hôte (Saikumar et al., 1999).

L'excès d'apoptose intervient dans les anomalies congénitales du développement, dans certaines maladies neurodégénératives (Barinaga, 1998) ou dans certaines pathologies provoquées par des infections virales. Par exemple, au cours du SIDA, le VIH est capable d'induire l'apoptose des lymphocytes CD4⁺ (Ameisen, 1994 ; Saikumar et al., 1999).

<h2 style="text-align: center;">APOPTOSE</h2>	<h2 style="text-align: center;">NECROSE</h2>
<h3 style="text-align: center;">Description</h3>	<h3 style="text-align: center;">Description</h3>
<ul style="list-style-type: none"> - physiologique ou pathologique (agression sub-chronique) - hautement régulée - membrane plasmique intacte jusqu' en phase tardive - pas de libération du contenu intracellulaire - peu ou pas d'inflammation - élimination des cellules par phagocytose - participation des enzymes intracellulaires entraînant une destruction ordonnée des structures sub-cellulaires : - condensation de la chromatine (pycnose), fragmentation nucléaire (karyorrhexis), profil régulier de dégradation de l'ADN « ladder » (endonucléolyse) - dégradation spécifique des protéines par des caspases (clivage de la PARP, de l'actine, des lamines...) - changements subtils de la membrane plasmique (perte de l'asymétrie membranaire précédant la perte de l'intégrité membranaire) - réduction du volume cellulaire - pas de dilatation de la mitochondrie - $[Ca^{2+}]_i$ baisse puis augmente tardivement 	<ul style="list-style-type: none"> Nécrose primaire - accidentelle, souvent pathologique - peu ou pas régulée - rupture précoce de la membrane plasmique - libération du contenu cellulaire, inflammation - élimination par phagocytose des débris cellulaires - caractéristiques biochimiques et morphologiques incluant : <ul style="list-style-type: none"> gonflement cellulaire (oncosé), dilatation du réticulum et de la mitochondrie et dégradation irrégulière de l'ADN Nécrose secondaire - Cytolyse secondaire à l'apoptose en l'absence de phagocytose - $[Ca^{2+}]_i$ augmente précocement

Tableau 2 : Comparaison Apoptose / Nécrose (Kroemer et al., 1998).

III. Les modifications cellulaires caractéristiques induites par l'apoptose

En 1972, Kerr, Wyllie et Currie montrent que des cellules en train de mourir par apoptose, développent des modifications morphologiques et biochimiques caractéristiques différentes de celles observées chez les cellules entrant en nécrose. Depuis, d'autres critères discriminant sont venus s'ajouter à ceux décrits par Kerr, Wyllie et Currie. Les principales différences sont résumées dans le Tableau 2.

III.1. Les modifications du cytoplasme

L'apoptose est caractérisée par une forte diminution du volume cellulaire, avec une importante condensation du cytoplasme. Cette réduction résulte d'une perte d'eau et d'électrolytes (Yu et al., 1997) conséquence de l'inhibition du co-transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$. La condensation cytoplasmique est associée à une désorganisation du cytosquelette qui se manifeste par l'apparition de bourgeons membranaires appelées «blebbs». L'activation d'aspartate protéases à cystéine, de la famille des caspases, est un des facteurs susceptibles d'intervenir dans la désorganisation du cytosquelette suite au clivage de molécules telles que l'actine, la gelsodine, la fodrine et différentes formes inactives des autres caspases (Earnshaw et al., 1999). Les transglutaminases, dont l'activité dépend du calcium, interviennent également dans la condensation du cytoplasme en catalysant la formation de ponts protéiques entre les résidus lysine et glutamine, formant ainsi des complexes insolubles (Fesus et al., 1987). A ce stade, dans le cytoplasme des cellules apoptotiques, il existe une structure rigide constituée de protéines « transglutaminées ». La cellule apoptotique perd alors tout contact avec les cellules voisines. La formation de bulles cytoplasmiques est probablement précédée par l'apparition, à la périphérie de la cellule, d'un chapelet de vésicules issues de la destructuration des membranes (Feldmann, 1999).

III.2. Les modifications au niveau des organites intracellulaires

Contrairement à la nécrose, l'apoptose ne s'accompagne généralement pas de la destruction des organites intracellulaires. Cependant, dans certaines conditions expérimentales, les mitochondries peuvent être précocement lésées après, par exemple, une stimulation du récepteur TNF-R1 « Tumor Necrosis Factor-Receptor » par le TNF α « Tumor Necrosis Factor alpha » (Angermüller et al., 1998). Dans la cellule en apoptose on observe une relocalisation des organites cytoplasmiques : les mitochondries intactes se regroupent autour du noyau alors que dans certaines cellules comme l'hépatocyte, le réticulum endoplasmique

semble se déplacer vers la périphérie de la cellule. Les ribosomes sont toujours présents à la surface du réticulum endoplasmique même quand des portions de celui-ci se retrouvent dans des bulles cytoplasmiques (Feldmann, 1999). Une chute tardive du potentiel mitochondrial membranaire est aussi observée : la mitochondrie joue un rôle important dans l'apoptose contrairement à la nécrose. Une des hypothèses justifiant le maintien de l'intégrité membranaire mitochondriale, au moins dans les stades précoces, a été émise dans les travaux de l'équipe de Nicotera qui ont démontré que la survenue de l'apoptose était dépendante de la conservation du « pool » d'ATP cellulaire (Leist et al., 1997). La mitochondrie intervient de façon primordiale dans l'apoptose et son rôle sera développé dans le chapitre « La voie mitochondriale ».

III.3. Les modifications nucléaires

Le nucléole se transforme en un amas granuleux homogène. La diminution du volume nucléaire est liée à une condensation de la chromatine autour de la membrane nucléaire. La margination chromatinienne est suivie d'une pycnose chromatinienne (Earnshaw, 1995). La chromatine n'est plus localisée à la périphérie du noyau, mais elle se condense en de volumineux agrégats occupant une grande partie de la matrice nucléaire et forme un large croissant ou un anneau dense parfois complet. Les mécanismes de cette condensation sont encore peu connus (Stuppia et al., 1996).

Au cours de la condensation chromatinienne, l'ADN est tout d'abord fragmenté en découpage grossier de fragments de 300 Kpb et de 50 Kpb (Oberhammer et al., 1993) puis en oligonucléosomes de 180 à 200 pb et multiples. Cette fragmentation par des endonucléases Ca^{2+} - Mg^{2+} dépendantes est visualisée par électrophorèse en gel d'agarose par un profil de migration typique dit « en échelle » ou « DNA ladder » par opposition au profil diffus obtenu dans le cas d'une nécrose (Wyllie, 1980). Toutefois il apparaît que dans certaines formes d'apoptose, cette fragmentation internucléosomale de l'ADN est remplacée par une fragmentation dite de haut poids moléculaire (Kaufmann et al., 2000).

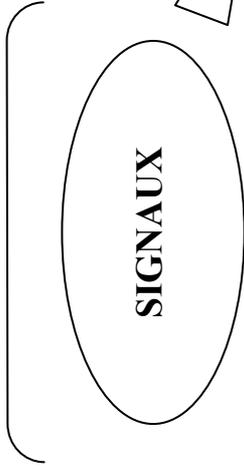
De plus, il peut se produire des modifications de la membrane nucléaire qui se sépare des agrégats chromatiniens avant la fragmentation du noyau (Earnshaw, 1995).

III.4. Les modifications de la membrane plasmique

La cellule en apoptose perd le contact avec ses cellules voisines et/ou la matrice extracellulaire. Il est probable que ces phénomènes s'accompagnent d'altérations des jonctions, en particulier au niveau des desmosomes et des protéines d'adhésion se trouvant au niveau des membranes. Cette hypothèse a été confirmée par le rôle prédominant des intégrines dans l'apoptose (Meredith & Schwartz, 1997).

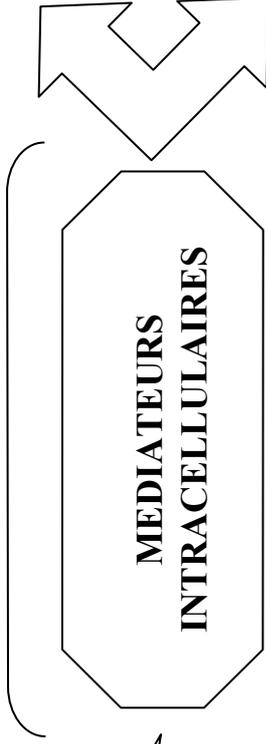
Une des premières modifications caractéristiques de l'apoptose est l'inversion de polarité de la membrane plasmique. Le changement de polarité membranaire correspond à la translocation des résidus phosphatidylsérines du feuillet interne vers le feuillet externe de la bicouche phospholipidique (Savill & Fadok, 2000). Cette exposition de résidus phosphatidylsérines est essentielle pour l'élimination des corps apoptotiques. A l'étape finale de l'apoptose, des bourgeons à la surface de la cellule apoptotique s'individualisent et forment des corps apoptotiques. Ces corps apoptotiques seront alors reconnus et digérés par les macrophages (phagocytes primaires) ou par les cellules environnantes (phagocytes secondaires). Les mécanismes dirigeant l'élimination des corps apoptotiques par les phagocytes font intervenir un certain nombre de molécules. Les résidus phosphatidylsérines contribuent efficacement à la reconnaissance et à la phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages *via*, par exemple, leur liaison à la thrombospondine. Ainsi, tout déversement du contenu cellulaire dans le milieu environnant et tout dommage pouvant en résulter sont évités. La réaction inflammatoire, présente au cours du processus nécrotique, est donc absente du processus apoptotique. *In vitro*, en l'absence de phagocytose, les corps apoptotiques finissent par éclater, on parle alors de nécrose secondaire.

INITIATION



- Dommages cellulaires (agents cytotoxiques, hypoxie, chaleur, perte de l'adhésion...)
- Récepteurs (Fas /TNF, glucocorticoïdes...)
- Carence en facteurs de croissance
- Stress oxydant
- etc.

REGULATION



- FADD / TRAF / MORT / TRADD / RIP ...
- Bcl-2 / Ced-9
- Ced-4
- Cytochrome c / dATP
- p53
- Protéines régulant le cycle cellulaire
- Oncogènes
- Facteurs de transcription
- Kinases / Phosphatases
- IAP
- etc.

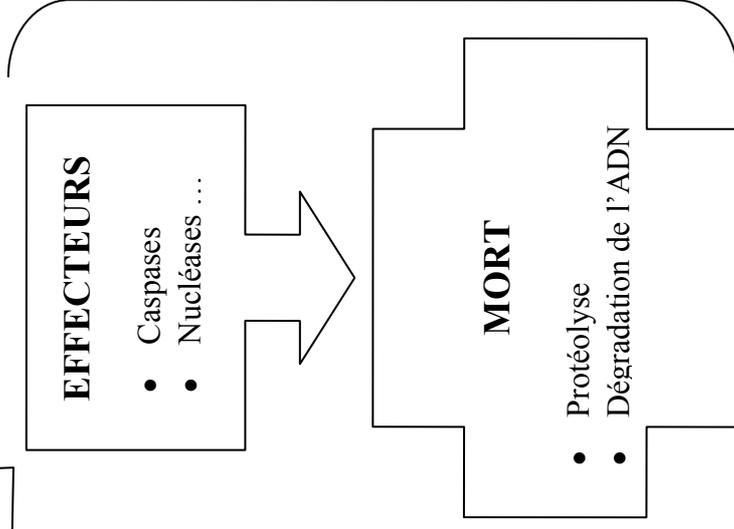
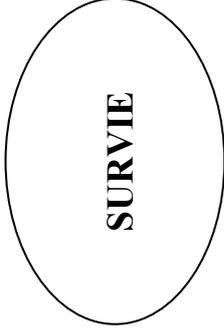


Figure 1 : L'apoptose un processus en trois phases.

IV. Mécanismes de l'apoptose

Les cascades de signaux moléculaires conduisant à l'apoptose constituent des programmes performants, présents dans la plupart des types cellulaires. Ces programmes apoptotiques peuvent être initiés par une variété de signaux intra- ou extracellulaires qui déclenchent une voie d'apoptose particulière.

L'activation de la voie de transduction du signal pro-apoptotique dépend du type cellulaire et d'éléments sub-cellulaires cibles de chaque stress. Les différentes voies de transduction en amont convergent toujours vers une voie finale effectrice commune de la mort cellulaire (Thompson, 1995).

L'apoptose peut être considérée comme un processus en trois phases (Figure 1) :

- la phase d'initiation ou de signalisation se caractérise par des modifications biochimiques. Cette phase est réversible. A ce stade, les modifications morphologiques ne sont pas encore visibles. Les événements biochimiques de cette première phase dépendent de la nature, potentiellement très hétérogène, des stimuli. Ces derniers peuvent être physiques (pression, micro-ondes, rayonnement X ou UV...), chimiques (étoposide, cisplatine, camptothécine, staurosporine...) ou encore biologiques (ligands des récepteurs membranaires impliqués dans la mort cellulaire, privation de facteurs trophiques, infection par des bactéries ou des virus...). De multiples modifications physico-chimiques et/ou génétiques caractérisent cette phase. Des régulateurs de l'expression génique comme le facteur de transcription NF- κ B (« Nuclear Factor-Kappa B »), de la prolifération cellulaire, comme l'oncoprotéine c-myc, ainsi que des récepteurs membranaires de mort ou encore des molécules impliquées dans le maintien de l'intégrité du génome (suppresseur de tumeur p53) vont jouer un rôle important (Rich et al., 2000).

- la phase de régulation ou de décision est commune à tous les types d'apoptose. Après intégration du signal initiateur, en fonction de son métabolisme interne et de son état de développement, la cellule « décide » d'entrer ou non apoptose. Le signal initiateur peut alors être converti en programme létal. Le contrôle est effectué, entre autre, par les mitochondries et les gènes pro- et anti-apoptotiques.

- la phase d'exécution ou de dégradation est irréversible. Elle se distingue par l'activation d'hydrolases cataboliques comme les nucléases et les caspases, protéases à cystéine. Elles sont activées et contrôlées par les mitochondries ainsi que par les gènes pro- et

anti-apoptotiques. Ces enzymes désassemblent de façon ordonnée les structures sub-cellulaires, entraînant les changements biochimiques et morphologiques du stade final de l'apoptose qui se traduisent par une destruction cellulaire.

IV.1. La phase d'initiation

Des signaux de survie venant de l'environnement cellulaire et des « détecteurs » de l'intégrité cellulaire contrôlent normalement la machinerie cellulaire de l'apoptose. Dans certaines conditions où la cellule perd ses contacts avec son entourage ou en cas d'anomalies intracellulaires irréparables, la cellule entre en apoptose. Cependant, une cellule qui reçoit simultanément des signaux contradictoires favorisant et diminuant son cycle de division, peut aussi entrer en apoptose (Evan & Littlewood, 1998).

Sur le plan biochimique, il existe deux voies principales conduisant à l'apoptose : la voie des récepteurs de mort déclenchée par des signaux extracellulaires appelée voie extrinsèque et la voie mitochondriale, induite par des signaux internes, comme le stress intracellulaire ou la perturbation métabolique, appelée voie intrinsèque.

IV.1.1. Les récepteurs de mort cellulaire

Certains récepteurs sont capables de transmettre des signaux apoptotiques lorsqu'ils ont lié leur ligand. On parle alors de récepteurs de mort. Ils ont des structures analogues permettant de les regrouper dans une seule et même famille, celle des récepteurs au TNF ou « TNF-R family » (Nagata, 1997).

Les membres de la famille du TNF-R sont des protéines transmembranaires dont l'extrémité N-terminale est orientée vers le milieu extracellulaire (Nagata, 1997). Chacune de ces protéines contient un domaine extracellulaire renfermant deux à six régions riches en acide aminé cystéine, qui permet la liaison au ligand (Smith et al., 1994). Dans leur partie intracellulaire, les récepteurs de mort possèdent une région conservée appelée domaine de mort cellulaire (DD, « Death Domain ») (Smith et al., 1994 ; Nagata, 1997). Ce domaine de mort rend le récepteur capable d'activer la machinerie apoptotique.

Les TNF-R peuvent promouvoir, selon le contexte cellulaire, soit la survie soit la mort :

- ❖ exemples de récepteurs impliqués dans la survie cellulaire :
 - CD27 (Camerini et al., 1991),
 - CD30 (Durkop et al., 1992),
 - CD40 (Stamenkovic et al., 1989),
 - TNF-R2 (Smith et al., 1990)
 - p75^{NGFR} (Jonhson et al., 1986) etc....
- ❖ exemples de récepteurs impliqués dans la mort cellulaire : (Ashkenazi & Dixit, 1998)
 - Fas ou CD95 ou Apo-1,
 - TNF-R1 ou p55 ou CD120a,
 - DR3 (pour « Death Receptor 3 ») ou Apo3 ou WSL-1 ou TRAMP ou LARD,
 - DR4,
 - DR5 ou Apo2 ou TRAIL-R2 ou TRICK 2 ou KILLER,
 - DR6 (Pan et al., 1998).

Le récepteur Fas est exprimé dans de nombreux types cellulaires ou tissus : les hépatocytes, le cœur, le rein et surtout dans les thymocytes et les cellules T activées (Nagata, 1999). Le couple FasL/Fas a fait l'objet de nombreuses études qui ont permis de révéler les rôles physiologiques et pathologiques du processus de mort cellulaire apoptotique dans le maintien de l'homéostasie du système immunitaire (Nagata, 1999).

En plus de leur capacité à provoquer l'apoptose DR3 et TNF-R1 ont également la particularité commune d'activer NF- κ B qui a un rôle anti-apoptotique en agissant sur la régulation de gènes (Marsters et al., 1996).

La mort induite par les récepteurs de la famille du TNF-R conduit à l'activation des caspases et en est dépendante (Longthorne & Williams, 1997).

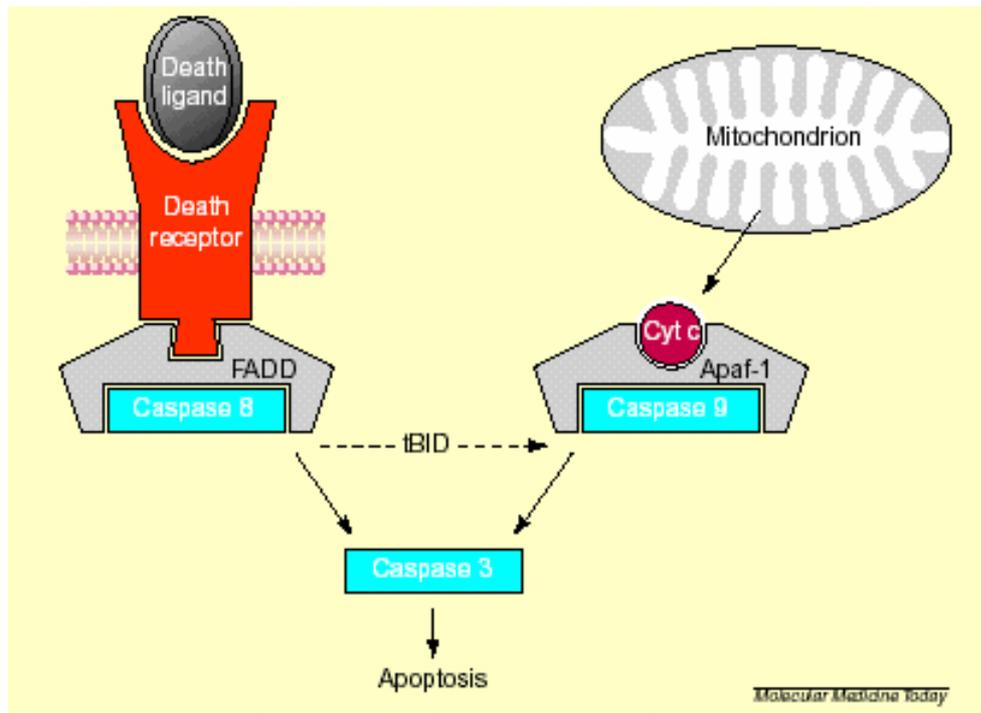


Figure 2 : Les voies extrinsèque (à gauche) et intrinsèque (à droite) de l'apoptose (Roy & Nicholson, 2000).

IV.1.2. Les ligands des récepteurs de mort

Ces ligands appartiennent à la même famille de cytokines que le TNF- α qui comprend une quinzaine de membres : (Ashkenazi & Dixit, 1998)

- TNF- α se lie au TNF-R1,
- FasL («Fas Ligand») se lie au Fas, ou CD95L,
- Apo3L (Apo3 Ligand) ou TWEAK se lie au DR3,
- Apo2L (Apo2 Ligand) ou TRAIL se lie au DR5. Apo2L semble avoir

une activité anticancéreuse sans être toxique sur les tissus normaux, contrairement à FasL ou à TNF (Ashkenazi et al., 1999). FasL est surtout exprimé dans les lymphocytes T activés. Ces ligands ont la particularité de présenter tous des similitudes de structure (Smith et al., 1994) et sont en grande majorité des protéines transmembranaires dont l'extrémité C-terminale est orientée vers le milieu extracellulaire (Nagata, 1997). Certaines de ces protéines, telles que FasL et TNF, existent également sous une forme soluble.

IV.1.3. Induction de l'apoptose par les récepteurs de mort ou voie extrinsèque (Figure 2)

Le ligand du récepteur Fas (FasL) existe sous forme homotrimérique (Smith et al., 1994). La stimulation du récepteur Fas par FasL ou par un anticorps anti-Fas, induit son homotrimérisation. Cette agrégation du récepteur modifie la conformation des domaines de mort (DD, « Death Domain ») qui vont s'associer les uns les autres et peuvent alors recruter un certain nombre de protéines impliquées dans la transduction du signal apoptotique dont la protéine adaptatrice FADD « Fas Associated Death Domain protein » (Figure 3). FADD se lie par l'intermédiaire de son propre DD aux domaines de mort groupés du récepteur Fas (Boldin et al., 1995). La protéine FADD contient également un domaine effecteur de mort, DED « Death Effector Domain » qui peut recruter les procaspases-8 et -10 au niveau de leur DED analogue (Figure 3), répété en tandem, et ainsi les activer (Boldin et al., 1996). Après sa liaison à FADD, la caspase-8 s'oligomérisent et cette oligomérisation conduit à son activation par auto-clivage (Muzio et al., 1998). L'activation de la caspase-8 va ensuite initier « la cascade des caspases » en activant d'autres caspases dont la caspase-3. La formation du complexe de mort (Fas, FADD et caspase-8) peut-être inhibée par Bcl-2 (Kawahara et al., 1998).

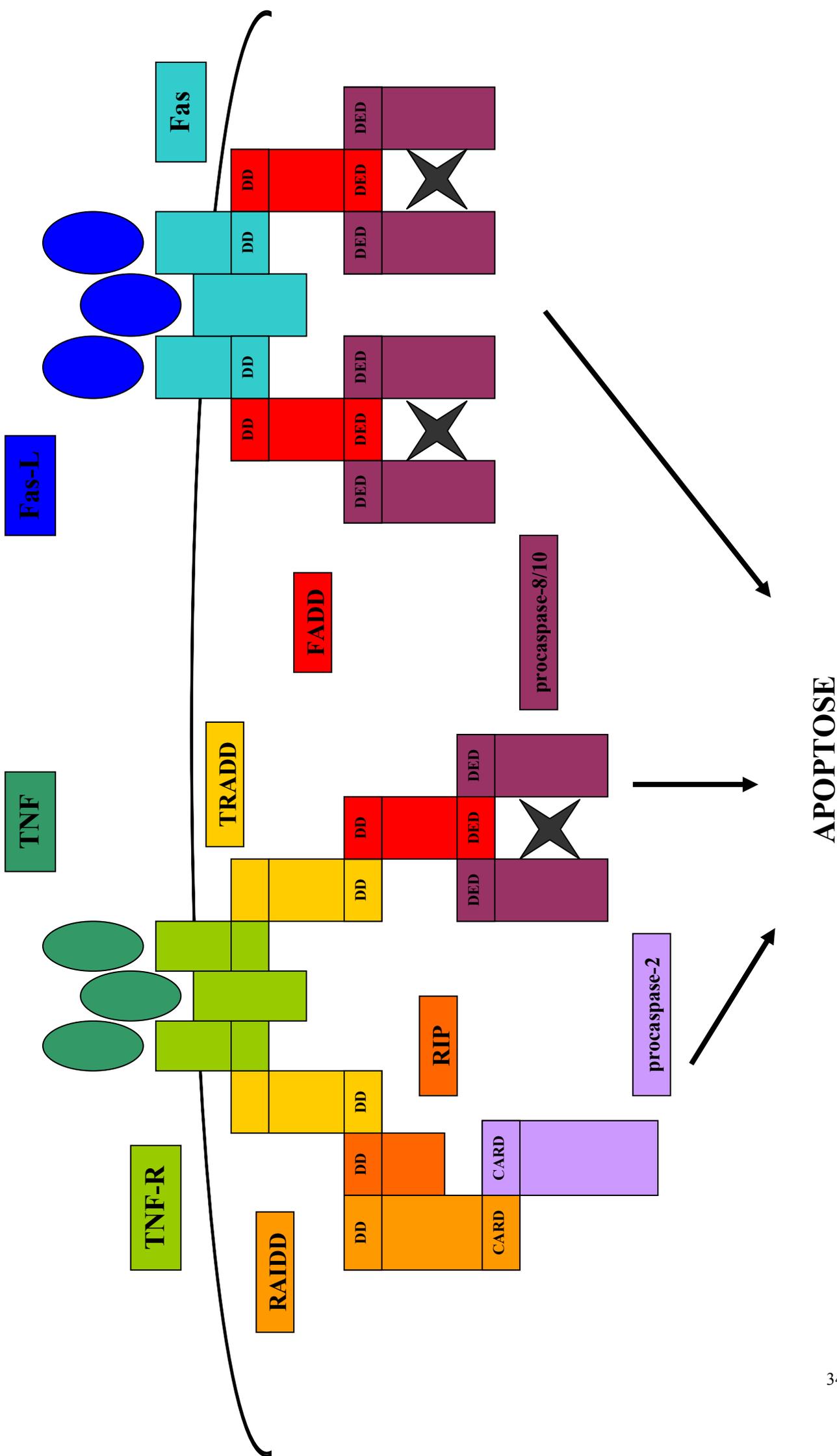


Figure 3 : Activation des Récepteurs TNF-R et Fas.

Dans le cas du TNF-R1, c'est une autre protéine adaptatrice, TRADD « TNF-Receptor Associated Death Domain protein » qui est recrutée après fixation du ligand. TRADD possède aussi un domaine DD qui peut s'associer à FADD ou à la protéine kinase RIP « Receptor Interacting Protein ». Dans ce dernier cas, la procaspase-2 s'associe alors par l'intermédiaire de son domaine CARD (« Caspase Recruitment Domain ») au domaine CARD de la protéine RAIDD (« RIPK1 Domain containing Adapter with DD ») qui interagit avec RIP ; ces différentes interactions aboutissent également à l'activation en cascade d'autres caspases (Figure 3). La protéine RIP intervient également dans une signalisation de survie générée par TNF-R1 via l'activation du facteur NF- κ B.

Les récepteurs de mort TNF-R1 et DR3 ont le même mode de transduction du signal que Fas (interactions protéine-protéine). Alors que DR3 est constitutivement exprimé dans beaucoup de tissus, TNF-R1 est synthétisé par les cellules T activées et les macrophages en réponse à une infection. La liaison du TNF à son récepteur peut aussi bien conduire à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 (anti-apoptotiques) qu'à l'apoptose (Hsu et al., 1995). Le récepteur Fas et son ligand FasL sont surtout impliqués dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Le couple Fas/FasL, au même titre que la paire granzyme B / perforine joue un rôle très important dans la cytotoxicité des lymphocytes T. Ces deux mécanismes coopèrent pour permettre l'élimination de la cellule cible par un processus d'apoptose (Golstein et al., 1991). Dans le cas du couple granzyme B / perforine, le granzyme B (GrB) pénètre à l'intérieur de la cellule cible où il clive et active les caspases, notamment la procaspase-8 et par voie de conséquence, induit l'apoptose (Heusel et al., 1994 ; Medema et al., 1997).

La libération du GrB par les lymphocytes cytotoxiques et sa pénétration à l'intérieur de la cellule cible dépendent de la formation d'un canal qui est assurée par la perforine (Figure 4).

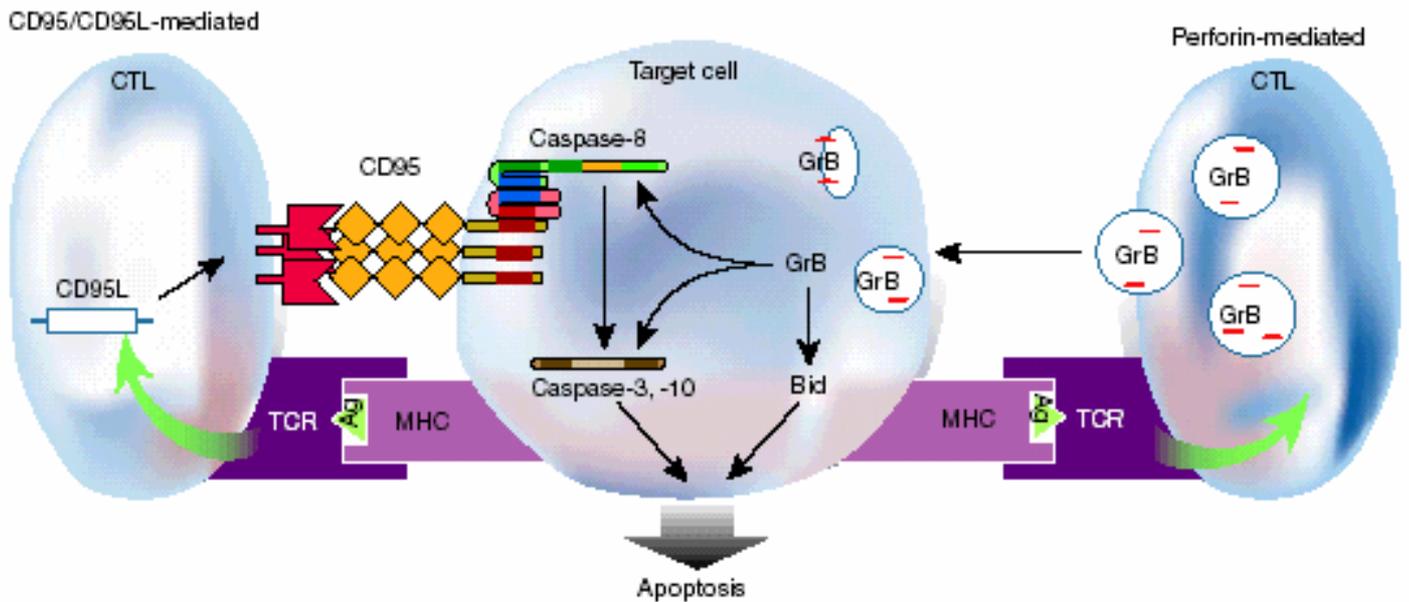


Figure 4 : Comparaison entre les systèmes CD95/CD95L (Fas/FasL) et GranzymeB/Perforine (Krammer 2000).

IV.1.4. Induction de l'apoptose par la mitochondrie ou voie intrinsèque (Figure 2)

La principale fonction de la mitochondrie était jusqu'alors limitée à la production d'énergie *via* la chaîne respiratoire. Cependant, il a été démontré, au cours de ces dernières années, que la mitochondrie est aussi un organite clé dans l'induction et le contrôle de l'apoptose. Plusieurs auteurs ont montré que la mitochondrie constitue le point commun d'intégration de la plupart des voies d'initiation de l'apoptose (Petit et al., 1997 ; Susin et al., 1998 ; Kroemer & Reed, 2000).

Dans un grand nombre de modèles cellulaires d'induction de l'apoptose, la première perturbation cellulaire détectable est la chute du potentiel mitochondrial membranaire ($\Delta\psi_m$), avant les modifications nucléaires et/ou les modifications de la membrane plasmique. L'intégrité mitochondriale dépend en partie du maintien du gradient électrique $\Delta\psi_m$ dont la chute intervient précocement et marque un point de non retour dans la cascade apoptotique (Petit et al., 1997). Cette chute fait intervenir les pores de transition de perméabilité ou PTP, « Permeability Transition Pores ».

Le PTP est un mégacanal oligoprotéique constitué, au niveau de la membrane externe par la porine (ou VDAC : « Voltage Dependent Anion Channel »), au niveau de la membrane interne par l'ANT (« Adenine Nucleotide Translocator ») et d'une protéine matricielle la cyclophiline D (Kroemer & Reed, 2000). L'ouverture de ces pores entraînent entre autre, dans le processus apoptotique, l'augmentation de la concentration du calcium cytosolique, l'oxydation du glutathion, la surproduction d'anions superoxydes et le relargage de molécules apoptogènes situés dans l'espace intermembranaire :

- Smac/DIABLO, « Second mitochondria-derived activator of caspase / direct IAP binding protein with low pI », favorise l'apoptose en liant les protéines IAPs, (« Inhibitor of Apoptosis Proteins ») empêchant ainsi leur activité inhibitrice sur les caspases (Du et al., 2000 ; Verhagen et al., 2000).
- le facteur AIF « Apoptosis Inducing Factor ». Après libération, il est acheminé vers le noyau.
- le cytochrome c qui va ensuite interagir avec tout un ensemble de protéines pour former l'apoptosome (Figure 5).

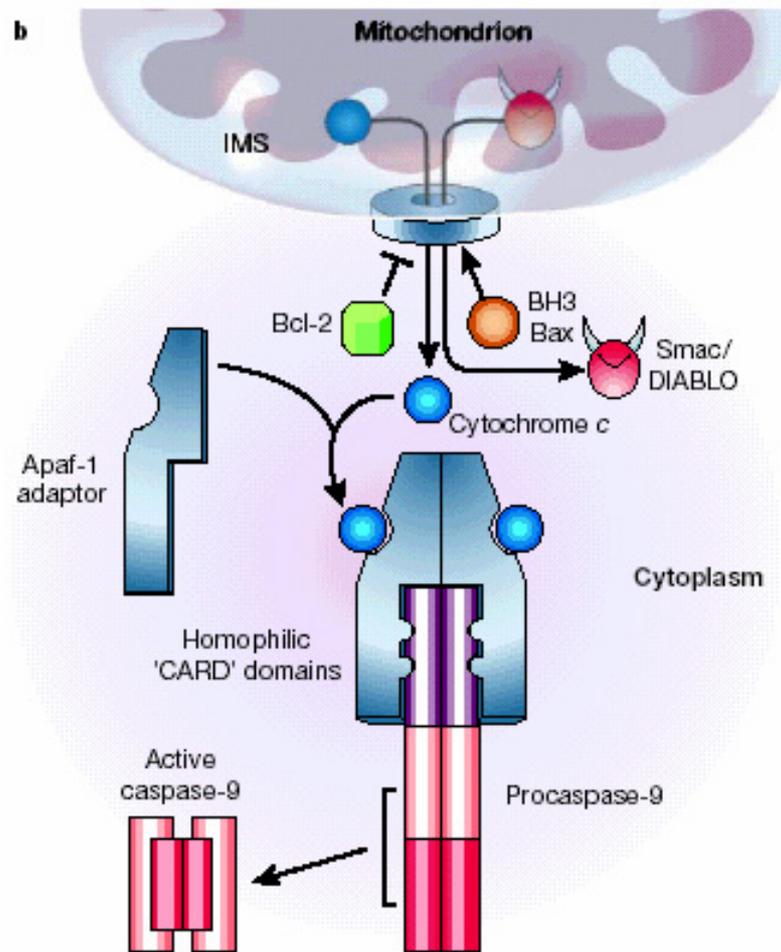


Figure 5 : Formation de l'apoptosome (Nicholson, 2000).

Néanmoins le processus de relargage du cytochrome c, ainsi que sa cinétique de libération reste aujourd'hui encore sujet à débat. Il a été montré que les membres pro-apoptotiques Bax ou Bak ajoutés à des mitochondries isolées, peuvent induire la perte de potentiel mitochondrial membranaire $\Delta\psi_m$, ainsi que la fuite de cytochrome c (Adams & Cory, 1998 ; Gross et al., 1999 ; Antonsson & Martinou, 2000), et pourraient être régulées par le PTP. Deux hypothèses ont été alors proposées :

- Bax ou Bak induisent un changement conformationnel du canal VDAC, le pore ainsi transformé permettrait le passage des différentes molécules apoptogènes,
- Bax ou Bak interagissent directement (par association) avec le canal VDAC et ainsi agrandissent le pore.

L'équipe de Doug Green a démontré que la libération du cytochrome c se faisait en une seule fois (Goldstein et al., 2000). La mitochondrie intègre alors les différents signaux pro-apoptotique et une fois le seuil atteint, la totalité du cytochrome c est relarguée, bien que, les mitochondries d'une même cellule ne répondent pas toutes en même temps.

Ces auteurs ont alors identifié un complexe multiprotéique indispensable à la maturation et à l'activation de la caspase-9. Ce complexe est composé de trois sous-unités Apaf-1, Apaf-2 (le cytochrome c) et Apaf-3 (la procaspase-9) (« Apoptosis Protein Activating Factor ») (Li et al., 1997). Le facteur Apaf-1 contient à son extrémité N-terminale un domaine CARD, impliqué dans les interactions protéines – protéines avec les caspases. Ce domaine est suivi d'une région qui possède un site de fixation nucléotidique et des répétitions dites « WD », connues pour intervenir dans les interactions « protéines – protéines » des protéines régulatrices. L'action d'Apaf-1 requiert absolument la présence du cytochrome c et de dATP qui vont permettre un changement de conformation d'Apaf-1 nécessaire à la liaison du cytochrome c libéré par la mitochondrie (Li et al., 1997 ; Zou et al., 1997). Ce pré-complexe peut alors recruter la procaspase-9 et convertir le précurseur en enzyme mature active. Ce complexe multimoléculaire est appelé apoptosome (Zou et al., 1999) (Figure 5).

IV.2. Phase de régulation

IV.2.1. L'apoptose : un processus génétiquement contrôlé

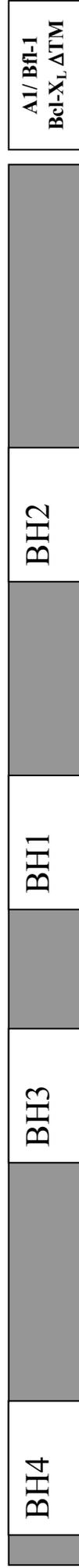
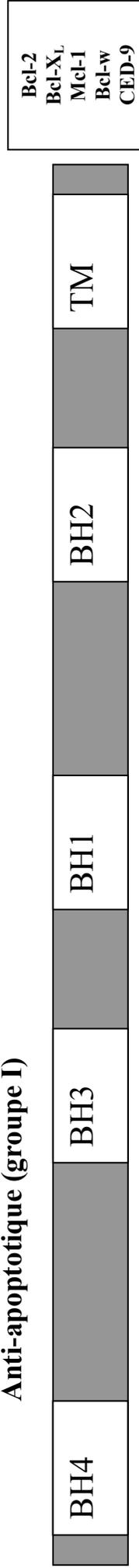
Nos connaissances actuelles sur les mécanismes biochimiques de l'apoptose, proviennent de l'étude d'un petit ver nématode : le *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Au cours de son développement embryonnaire, 131 des 1090 cellules somatiques qui le constituent, soit un peu plus de 15%, vont s'autodétruire par apoptose et être ingérées par les cellules environnantes (Horvitz, 1999).

L'existence d'informations génétiques impliquées dans le contrôle de l'apoptose a été apportée par les études fondamentales menées par le groupe d'Horvitz, sur des mutants de ce nématode. Onze gènes sont impliqués dans la régulation de ce processus chez *C. elegans*. Parmi ces gènes, 4 ont été identifiés comme des régulateurs clé de l'apoptose dans toutes les cellules somatiques du nématode, il s'agit de *ced-3*, *ced-4*, *ced-9* (« *Caenorhabditis elegans* death genes ») et *egl-1* :

- *ced-3* code pour une protéine Ced-3 qui est une cystéine protéase à substrat aspartate ou caspase, synthétisée sous la forme d'un précurseur inactif,
- *ced-4* code une protéine Ced-4 qui en se fixant au précurseur inactif Ced-3, favorise la maturation et la libération de la protéine Ced-3 active,
- *ced-9* code une protéine Ced-9 qui séquestre Ced-4, empêchant ainsi l'activation de Ced-3,
- *egl-1* code une protéine Egl-1 qui en se fixant à Ced-9 empêche la séquestration de Ced-4 par Ced-9 et ainsi favorise l'activation de Ced-3.

Une mutation entraînant une perte de fonction au niveau d'un des trois gènes *ced-3*, *ced-4* ou *egl-1*, provoque la survie des 131 cellules programmées pour mourir au cours du développement embryonnaire du nématode (Hengartner & Horvitz, 1994 ; Horvitz et al., 1994). De même une mutation entraînant une augmentation de l'activité du gène *ced-9* provoque la survie des 131 cellules condamnées à mourir ; à l'inverse une mutation entraînant une perte d'activité du gène *ced-9* provoque une mort cellulaire massive (Hengartner et al., 1992 ; Meier et al., 2000).

Anti-apoptotique (groupe I)



Pro-apoptotique (groupe II & III)

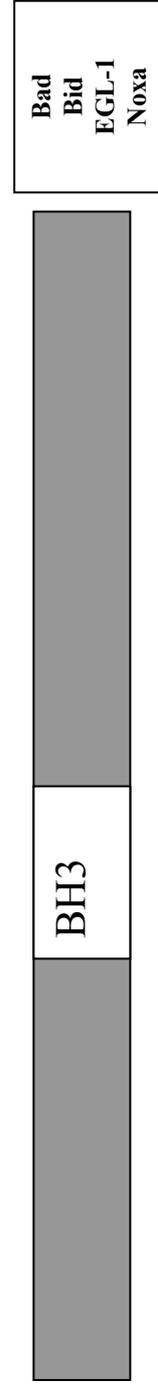
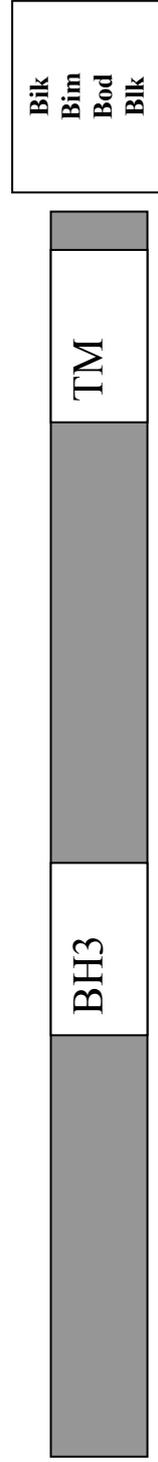
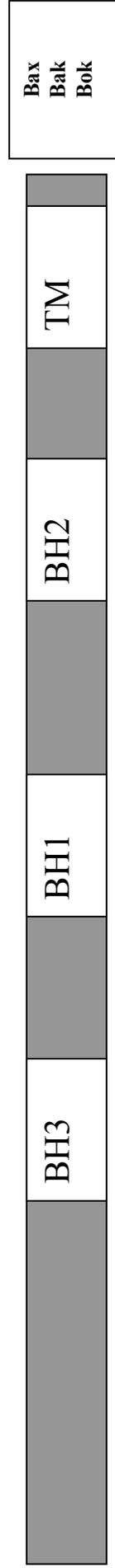


Figure 6 : Les membres de la famille Bcl-2.

Les autres gènes *ced* du nématode *C. elegans* sont impliqués dans la régulation du processus apoptotique. Ainsi, les gènes *ced-6* et *ced-7* interviennent dans la digestion des cellules apoptotiques et contrôlent l'expression de certaines protéines membranaires permettant l'adhésion intercellulaire des macrophages, qui participent à l'élimination des cellules apoptotiques par phagocytose (Liu & Hengartner, 1998 ; Wu & Horvitz, 1998).

Le clonage de ces différents gènes a révélé que du nématode aux vertébrés, en passant par la drosophile ou la souris, la structure des différentes grandes familles de protéines impliquées dans l'apoptose étaient conservées :

- Ced-3 est l'homologue de l'enzyme de conversion de l'interleukine1 β ou ICE : « IL-1 β Converting Enzyme », aussi appelée caspase-1,
- Ced-4 présente des homologies avec la protéine Apaf-1,
- Ced-9 est homologue à la protéine anti-apoptotique Bcl-2,
- Egl-1 présente des homologies avec la protéine Bax.

IV.2.2. Les membres de la famille Bcl-2 (Figure 6)

Bcl-2 est une protéine proto-oncogène retrouvée dans la plupart des lymphomes folliculaires de type B (Tsujimoto & Croce, 1986). Depuis, plusieurs homologues ont été découverts et constituent la famille Bcl-2.

Cette famille est divisée en trois groupes basés sur les similitudes structurelles et des critères fonctionnels :

- les membres du groupe I, tels que Bcl-2, Bcl-x_L..., sont caractérisés généralement par quatre courts domaines conservés BH₁-BH₂-BH₃-BH₄ (BH : «Bcl-2 Homology»). Ils présentent des activités anti-apoptotiques.
- les membres du groupe II, tels que Bax, Bad, Bak ont des activités pro-apoptotiques et une structure très proche des membres du groupe I, mais ils ne possèdent pas le domaine BH₄ N-terminal.
- les membres du groupe III, tels que Bid ont tous une activité pro-apoptotique, mais ils ne possèdent que le domaine BH₃, soit environ 12-16 acides aminés.

La plupart des membres de la famille Bcl-2 possèdent un domaine C-terminal hydrophobe, qui leur permet de s'ancrer au niveau des feuillettes externes des membranes de la mitochondrie, du réticulum endoplasmique ou du noyau (Akao et al., 1994). Toutefois certains membres, comme Bad et Bid qui ne possèdent pas cette région, se retrouvent dans le cytosol mais peuvent migrer et s'associer, par leur domaine BH₃, aux membres présents à la surface des différents organites.

Bcl-x_L, Bcl-2 et Bax peuvent former des pores dans des organites tels que la mitochondrie (Muchmore et al., 1996). Ce sont des canaux ioniques qui modifient la perméabilité membranaire de certains ions. Par exemple, Bcl-2 forme un canal à cations monovalents (comme K⁺ et Na⁺), tandis que Bax est plutôt spécifique des anions (Schlesinger et al., 1997). De plus, Bcl-2 est capable d'inhiber la formation des pores par Bax (Adams & Cory, 1998 ; Reed et al., 1998).

Les pores formés par Bax dans le feuillet externe mitochondrial interviendraient dans la fuite du cytochrome c vers le cytosol et les phénomènes apoptotiques en découlant.

La régulation de l'activité des membres de la famille Bcl-2 s'effectue soit par dimérisation, soit par phosphorylation.

Les membres de la famille Bcl-2 ont la capacité de former des homo- ou des hétérodimères. Cette propriété explique la fonction des membres de la famille Bcl-2. Bcl-2 ou Bcl-x_L forment des homodimères par interaction de leurs domaines BH₁ et BH₂. Bax ou Bak interagissent avec Bcl-2 ou Bcl-x_L par l'intermédiaire de leur domaine BH₃ (Zha, H. et al., 1996 ; Sattler et al., 1997 ; Simonen et al., 1997). Les homodimères Bcl-2 ou Bcl-x_L sont anti-apoptotiques, les hétérodimères sont pro-apoptotiques. Ainsi, la survie cellulaire dépendrait de la proportion des dimères pro et anti-apoptotiques formés (Sedlak et al., 1995), donc des taux relatifs de transcription des gènes *bax* et *bcl-2*.

Bad ou Bid ne peuvent pas former d'homodimères parce qu'ils ne possèdent pas de domaines BH₁ et BH₂. Toutefois, ils peuvent s'associer avec les membres anti-apoptotiques par leur domaine BH₃, empêchant l'homodimérisation de ceux-ci. Bad et Bid ont donc un rôle pro-apoptotique indirect. La quantité relative des différentes protéines de la famille Bcl-2 est donc cruciale pour la régulation de leur activité. La quantité de protéines est modulée au niveau transcriptionnel par certaines cytokines et par le gène suppresseur de tumeur p53. Cependant, une régulation post-traductionnelle peut aussi avoir lieu (Rich et al., 2000).

CASPASES	SYNONYMES	ESPECE	SEQUENCE CIBLE	PRODOMAINE	PROTEINE ADAPTATRICE
Caspase-1	ICE	Humain Souris	YVAD↓X YEVD↓X WEHD↓X	Long	
Caspase-2	ICH-I NEDD2	Humain Souris	DVAD↓X DEHD↓X	Long	RAIDD
Caspase-3	CPP32/Yama Apopain	Humain Souris	DEVD↓X DMQD↓X	Court	
Caspase-4	ICE _{relII} Tx ICH-2	Humain	LEVD↓X (W/L)EHD↓X	Long	
Caspase-5	ICE _{relIII} Ty	Humain	(W/L)EHD↓X	Long	
Caspase-6	Mch2	Humain Souris	VEHD↓X	Court	
Caspase-7	Mch3 CMH-1 ICE-LAP3	Humain Souris	DEVD↓X	Court	
Caspase-8	Mch5 FLICE MACH	Humain Souris	IETD↓X LETD↓X	Long	FADD
Caspase-9	Mch6 ICE-LAP6	Humain	LEHD↓X	Long	APAF-1
Caspase-10	Mch4 FLICE-2	Humain	IEAD↓X	Long	FADD
Caspase-11	ICH-3	Souris (homologue à la caspase- 4 ?)		Long	
Caspase-12		Souris		Long	
Caspase-13	ERICE	Humain		Long	
Caspase-14	MICE Viz	Souris		Court	

Tableau 3 : Famille des Caspases (Rathmell & Thompson, 1999 ; Budihardjo et al., 1999 ; Reed, 2000).

Seules les caspases identifiées chez les mammifères sont représentées.

Dans les cellules hématopoïétiques stimulées par l'interleukine-3 (Il-3), Bad est phosphorylée (Bad-P) puis est séquestrée dans le cytosol. Elle ne peut plus s'associer à Bcl-2 ou Bcl-x_L qui vont exercer donc leur activité anti-apoptotique en formant des homodimères.

En cas de privation d'Il-3, Bad, n'étant plus phosphorylée, forme des hétérodimères avec Bcl-2 ou Bcl-x_L et bloque ainsi leur action (Zha, J. et al., 1996). La phosphorylation de Bad empêche son activité pro-apoptotique.

Pour les membres anti-apoptotiques, il existe différentes phosphorylations qui augmentent ou diminuent leur activité. Bcl-x_L est inactivée par phosphorylation (Chang et al., 1997). Pour Bcl-2, la phosphorylation peut être activatrice ou inhibitrice en fonction du résidu phosphorylé (Haldar et al., 1995).

IV.2.3. Régulation de la mitochondrie

La mitochondrie est principalement sous contrôle des membres de la famille Bcl-2 : Bax, Bcl-2 ou Bcl-x_L sont capables d'interagir avec les protéines composant le PTP. De plus, il a été montré que Bax interagissait avec VDAC (Narita et al., 1998 ; Shimizu et al., 1999) et l'ANT (Shimizu et al., 1999).

De fait, Bax (ou Bak) favoriserait la chute du $\Delta\psi_m$ et la sortie du cytochrome c, alors que Bcl-2 ou Bcl-x_L assurerait le maintien des fonctions du PTP et empêcherait le relargage du cytochrome c, favorisant ainsi la survie cellulaire (Adams & Cory, 1998 ; Gross et al., 1999 ; Antonsson & Martinou, 2000).

Bcl-2 et ses partenaires interviendraient soit en contrôlant l'ouverture des pores et donc la libération des facteurs mitochondriaux, soit en séquestrant à la membrane mitochondriale Apaf-1 empêchant ainsi l'activation des caspases. Ainsi la protéine Bcl-2 inhiberait l'apoptose en retenant le pré-complexe Apaf-1/Caspase à la membrane mitochondriale. Inversement, l'accumulation de Bax entraînerait la libération par la mitochondrie des facteurs mitochondriaux, libérant et permettant la formation de l'apoptosome qui à son tour activerait les caspases et induirait l'apoptose (Hengartner, 2000).

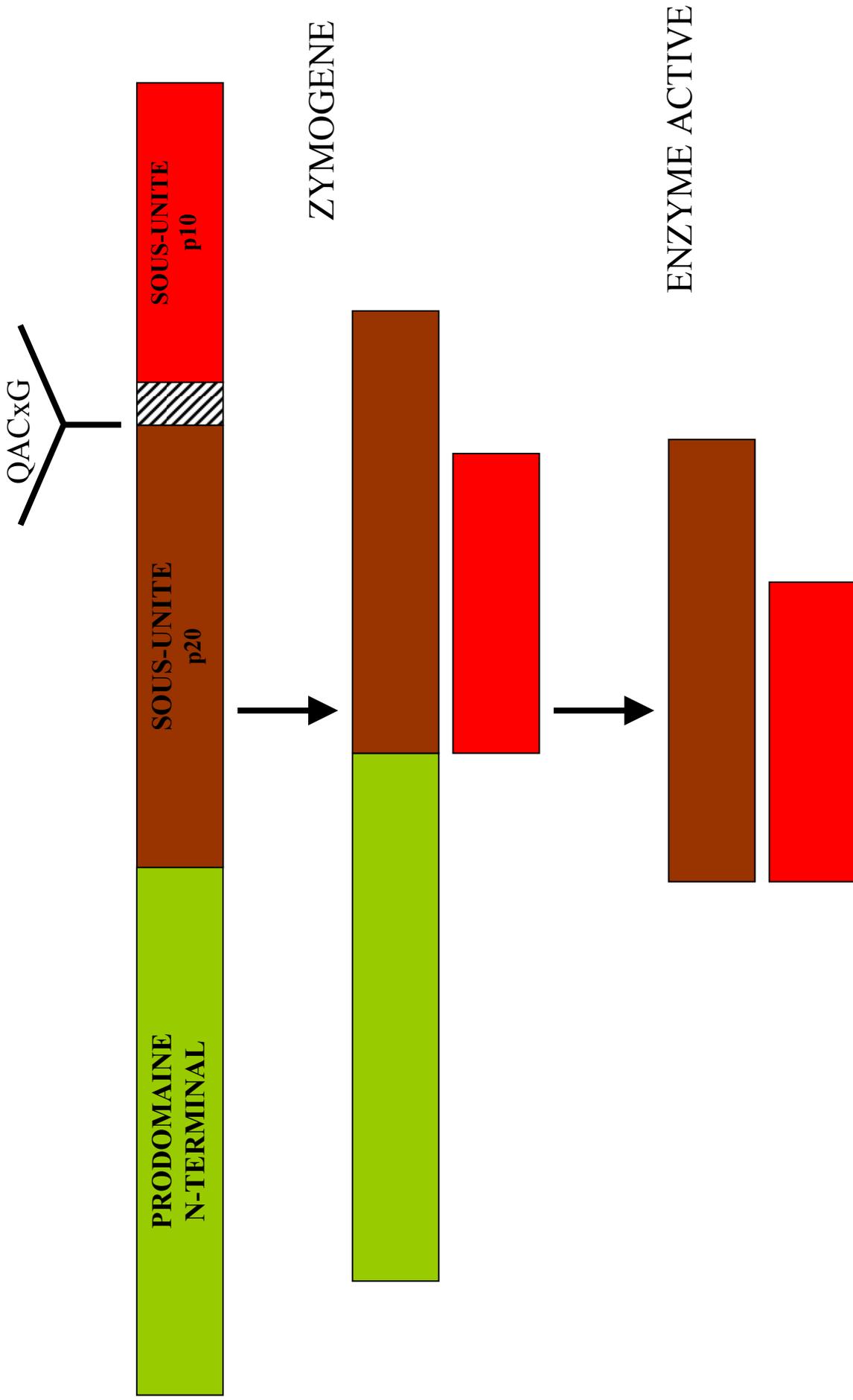


Figure 7 : Structure et activation des caspases (Rathmell & Thompson, 1999).

IV.3. Phase d'exécution

La plupart des modifications morphologiques observées dans les cellules apoptotiques résultent de l'activation des caspases. Les caspases sont hautement conservées au cours de l'évolution, elles sont retrouvées chez les hommes, les mammifères, ainsi que les insectes et les nématodes (Budihardjo et al., 1999 ; Earnshaw et al., 1999).

IV.3.1. Nomenclature et structure (Tableau 3)

Les caspases sont des protéases à cystéine (le site catalytique de l'enzyme contient un résidu cystéine) qui possèdent une spécificité stricte de clivage de leurs substrats après un résidu aspartate (Margolin et al., 1997). Les seules protéases eucaryotes connues avec cette spécificité de clivage sont les caspases et le granzyme B. En 1996, Alnemri et coll. proposent une nouvelle nomenclature qui regroupe les protéases à cystéine sous le nom de CASPASE (Alnemri et al., 1996), où « C » désigne le résidu cystéine du centre catalytique (QACxG) et « ASPASE » définit la spécificité stricte de clivage des substrats de cette famille de protéases après un résidu acide aspartique (Figure 7). La protéine ICE, première caspase de mammifère caractérisée, a donc été rebaptisée caspase-1 (Tableau 3). A ce jour plusieurs caspases ont été identifiées : 13 chez l'Homme, 2 spécifiques à la souris, 1 chez *C. elegans*, 1 chez *D. melanogaster* et 1 chez *S. frugiperda* (Earnshaw et al., 1999).

Les caspases sont synthétisées sous la forme d'un zymogène (pro-enzyme de 30 à 50 kDa). Elles ont une structure très conservée. Le prodomaine N-terminal (23 à 219 acides aminés, en fonction de la caspase considérée) est directement suivi par les séquences codant la grande sous-unité p20 (17-21 kDa, qui porte le centre catalytique) puis la petite sous-unité p10 (10-14 kDa). Chez certaines procaspases ces sous-unités peuvent être séparées par des domaines « spacer » qui sont éliminés lors de la maturation de l'enzyme (Figure 7).

Le prodomaine N-terminal semble jouer un rôle dans les interactions « protéines-protéines » et donc dans la régulation de l'activation de ces enzymes (Thornberry et al., 1997a).

Les caspases avec un prodomaine court (-3, -6, -7 et -14) sont actuellement regroupées sous le nom de **caspases effectrices**. Elles sont activées par des **caspases initiateurices**, ayant un prodomaine long (-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11, -12 et -13) (Tableau 3).

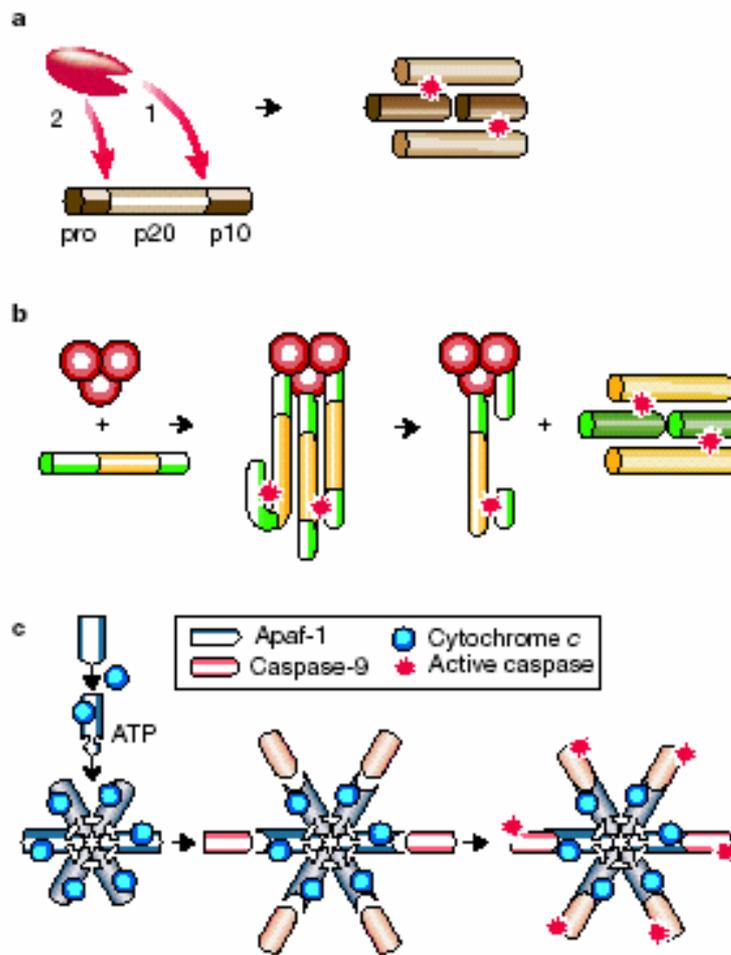


Figure 8 : Les différents mécanismes d'activation des caspases (Hengartner, 2000).

- (a) Clivage protéolytique par une caspase amont
- (b) Activation de la procaspase-8
- (c) Activation de la procaspase-9.

On distingue deux sortes de motifs au niveau des prodomaines : les DEDs et les CARDs. Le motif DED est présent au niveau des prodomaines des caspases -8 et -10 et semble impliqué dans les interactions avec les DED des molécules adaptatrices telles que FADD ou TRADD. Le motif CARD est retrouvé au niveau des prodomaines des caspases-1, -2, -4 et -9 et semble être important dans les interactions entre les caspases et des molécules adaptatrices ou régulatrices.

IV.3.2. Activation et régulation

La maturation de chaque précurseur de caspase en enzyme fonctionnelle, nécessite au moins **deux clivages**, le premier entre le prodomaine et la grande sous-unité, le deuxième entre la grande sous-unité et la petite sous-unité. Ces clivages se font toujours au niveau d'une **liaison Asp-X**. A la suite d'une coupure entre la grande et la petite sous-unité, le prodomaine est libéré (Figure 8). Chaque caspase active provient du clivage de **2 zymogènes** et de l'association des deux grandes sous-unités et des deux petites sous-unités, ce qui aboutit à une **enzyme tétramérique** (p20₂/p10₂). Les caspases peuvent s'auto-activer et/ou être activées par d'autres caspases. Ainsi, une fois les caspases initiatrices activées, elles vont pouvoir cliver d'autres caspases, notamment les caspases effectrices encore à l'état de zymogènes, ce qui entraîne un type d'activation en cascade, une régulation et une amplification du signal (Figure 8).

- régulation transcriptionnelle des caspases :

Bien que l'apoptose puisse être déclenchée dans un grand nombre de cellules, même en absence de transcription ou de synthèse protéique, la régulation de l'expression des gènes de procaspases reste cruciale sous certaines conditions. Les **ARNm des procaspases** sont facilement détectables dans un grand nombre de types cellulaires mais en **quantité variable** (Thornberry et al., 1997b). Ainsi, l'ARNm de la procaspase-3 est fortement exprimé dans des cellules lymphoïdes et myéloïdes matures, alors qu'il ne l'est que faiblement dans l'épithélium mammaire et dans les neurones normaux (Krajewska et al., 1997).

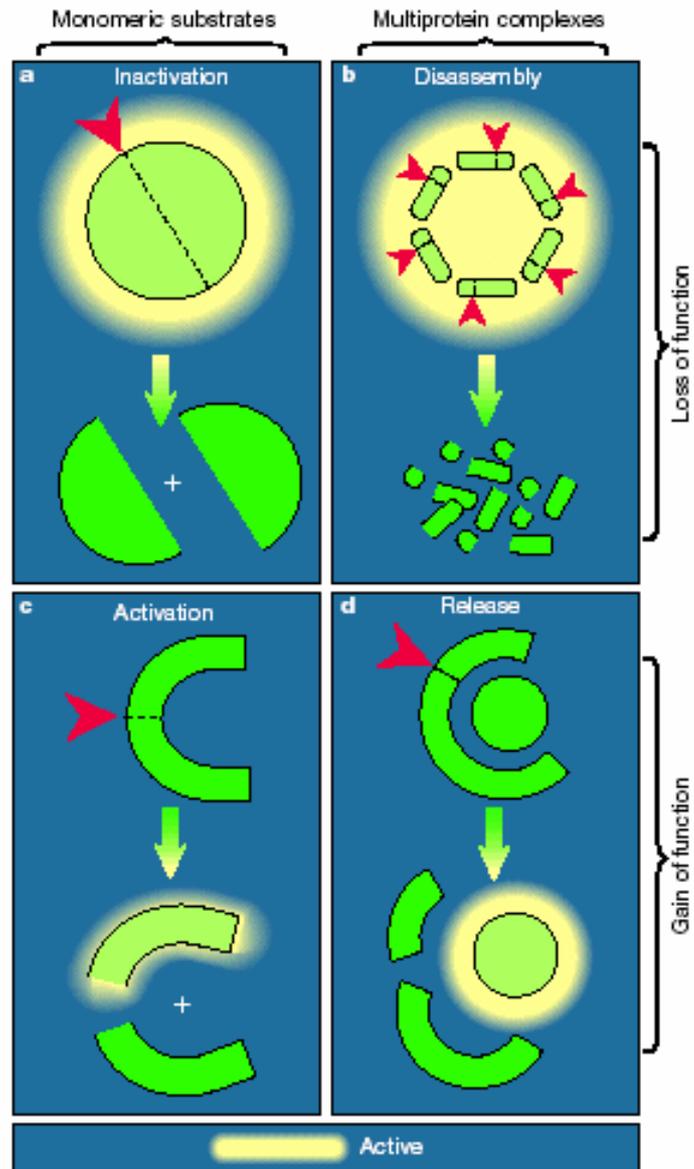


Figure 9 : Les différents types de clivage par les caspases effectrices sur les substrats (Hengartner, 2000).

- régulation par phosphorylation :

Des études sur des lignées leucémiques ont montré que les caspases peuvent être phosphorylées *in vivo* et que cela diminue leur activité enzymatique *in vitro* (Martins et al., 1998). Toutefois, la modulation des activités caspases phosphorylées *in vivo* reste à démontrer. Au cours d'une autre étude, Cardone et coll. ont montré que la kinase Akt peut phosphoryler la procaspase-9 humaine et ainsi inhiber son activation (Cardone et al., 1998). Cependant, il a été montré que Akt ne phosphoryle pas les caspases effectrices (-3, -6, -7). Ainsi, l'identification des kinases responsables de la phosphorylation des caspases effectrices, et le rôle physiologique de cette modification post-traductionnelle nécessitent des études plus approfondies.

IV.3.3. Substrats des caspases

Les caspases sont des enzymes extrêmement sélectives, elles peuvent cliver les protéines cibles à un ou plusieurs endroits dans leurs séquences primaires. Toutes les caspases possèdent un **site actif à cystéine**, qui reconnaît un motif de 4 acides aminés (P4-P3-P2-P1) au niveau des substrats, et les clivent toujours après un résidu aspartate (P1). La spécificité de reconnaissance et de clivage d'un substrat par une caspase donnée est déterminé par la **nature des 4 acides aminés** au niveau du site de clivage (Thornberry et al., 1997b). Dans la plupart des cas, le clivage induit par les caspases inactive la protéine cible. Mais le clivage par les caspases peut aussi activer le substrat cible, soit directement en éliminant un domaine régulateur négatif, soit indirectement en inactivant une sous unité régulatrice (Figure 9).

Récemment, des études menées en parallèle par deux équipes de chercheurs ont permis de comprendre le mécanisme d'activation de la nucléase responsable des « ladder d'ADN », décrits pour la première fois par Wyllie (Wyllie, 1980). Cette nucléase va couper l'ADN génomique entre les nucléosomes, générant ainsi des fragments d'ADN d'environ 180-200 pb (et multiple) donnant après migration sur gel d'agarose un profil en échelle ou « ladder ». Ce sont les groupes de X. Wang (Liu et al., 1998) et S. Nagata (Enari et al., 1998 ; Sakahira et al., 1998) qui ont montré que cette enzyme connue sous le nom de DFF («DNA Fragmentation Factor») ou CAD («Caspase-Activated DNase»), était présente au niveau des cellules sous la forme d'un complexe inactif, associée à sa sous unité inhibitrice nommée ICAD («Inhibitor of Caspase-Activated DNase») (Nagata, 2000). Le clivage de la sous unité inhibitrice ICAD par la caspase-3 aboutit à la libération et à l'activation de la sous unité catalytique CAD (Liu et al., 1998 ; Enari et al., 1998 ; Sakahira et al., 1998).

Le clivage d'autres substrats spécifiques par des caspases explique aussi plusieurs autres traits caractéristiques de l'apoptose. Par exemple le clivage des lamines nucléaires est responsable du rétrécissement et du bourgeonnement cellulaire (Rao et al., 1996 ; Buendia et al., 1999). La perte de la forme générale de la cellule est aussi probablement due au clivage de protéines du cytosquelette comme la fodrine et la gelsoline (Kothakota et al., 1997). De même le clivage de PAK-2 (« P21 Activated Kinase-2»), un membre de la famille des kinases activées par la protéine p21 ras) par les caspases semble être responsable du bourgeonnement observé dans les cellules apoptotiques (Rudel & Bokoch, 1997). Dans ce dernier cas, le clivage entre la sous-unité inhibitrice et la sous-unité catalytique entraîne l'activation constitutive de PAK2.

Une **centaine d'autres substrats** des caspases ont été rapportés ces dernières années : il s'agit de protéines cytoplasmiques ou nucléaires, de protéines impliquées dans le métabolisme et la réparation de l'ADN et des protéines kinases. De plus, des protéines de régulation de l'apoptose et des protéines impliquées dans la transduction du signal, dans l'expression de gènes, dans la régulation du cycle cellulaire ou dans la prolifération sont également des substrats des caspases mais cette liste n'est pas exhaustive (Earnshaw et al., 1999 ; Nicholson, 1999).

IV.3.4. Inhibiteurs des caspases

A ce jour de nombreuses **protéines virales, animales et végétales** (Thatte et al., 2000), ont été décrites comme ayant une activité inhibitrice de l'apoptose. Nous avons déjà parlé des membres de la famille Bcl-2 et de leur rôle dans l'inhibition de l'apoptose. Dans ce paragraphe nous développerons les inhibiteurs de synthèse ainsi que les inhibiteurs cellulaires naturels, les inhibiteurs viraux seront abordés dans le chapitre qui suit.

Les inhibiteurs de caspases de synthèse, disponibles actuellement sont issus de la découverte et de la connaissance des substrats naturels des caspases.

Les études portant sur la spécificité des caspases indiquent qu'il existe deux propriétés très conservées pour ces enzymes : un acide aspartique en position P1, et la présence de 4 résidus d'acides aminés en amont du site de clivage. En déterminant les séquences térapeptidiques reconnues pour une caspase considérée, il a été alors possible de déterminer des séquences consensus et construire des **substrats de synthèse** pour étudier l'activation d'une caspase donnée. De petite taille, les peptides synthétiques miment les sites de clivage des caspases. Pour identifier ou découvrir de nouvelles protéases, divers essais ont utilisé de nouveaux

substrats peptidiques de synthèse qui ont été construits pour s'adapter spécifiquement aux sites actifs de l'enzyme. Ces substrats ont généralement une structure de type Ac-XXXD-AMC, et en fonction de leur séquence ils sont efficacement reconnus et clivés par une caspase déterminée. Par exemple, la séquence -LEHD- est reconnue par la caspase-9, tandis que la séquence -IETD- est reconnue par la caspase-8. Mais certaines séquences ont des spécificités plus ou moins grandes en fonction des activités caspases considérées. Le substrat le plus utilisé est le Ac-DEVD-AMC, actuellement décrit comme spécifique de la caspase-3. La séquence -DEVD- est issue des recherches faites sur la PARP (« Poly-ADP-Ribose Polymerase ») et la DNA-PK (« DNA-Protein Kinase ») qui sont toutes deux des substrats de la caspase-3 (Thornberry et al., 2000). Cependant, il semblerait que la séquence DEVD ne soit pas uniquement reconnue par la caspase-3. C'est pourquoi cette séquence est parfois décrite comme spécifique des caspases « caspase-3 like », la caspase-3 étant la plus affine (Stennicke & Salvesen, 2000).

Les substrats contiennent aussi :

- en N-terminal un groupement « bloquant » qui empêche la digestion par les aminopeptidases. Les groupements « bloquant » sont z (benzoxycarbonyl-) ou Ac (acétyl-).

- en C-terminal un groupement « rapporteur », adjacent au peptide P1 qui est libéré après clivage par la protéase active. Les groupements rapporteurs les plus fréquemment utilisés sont le 7-amino-4-méthylcoumarin (AMC, λ_{ex} 380 nm $\lambda_{ém}$ 460 nm) ou le 7-amino-4-trifluorométhylcoumarin (AFC, λ_{ex} 405 nm $\lambda_{ém}$ 500 nm) en fluorométrie et le *p*-nitroanilide (pNa, Abs : 405-410) en colorimétrie.

Puis sont apparus des **inhibiteurs synthétiques de caspases**. La première démarche a été de remplacer au niveau des substrats existants le groupement « rapporteur » (-AMC...) par un groupement -CHO (aldéhyde) qui réagit avec le site catalytique de la protéase et bloque l'activité protéasique de l'enzyme. Les inhibiteurs Ac-XXXD-CHO ainsi obtenus, ont une action inhibitrice réversible. Le blocage de l'apoptose *via* l'inhibition des caspases avec ce type de composé, est donc très limité dans le temps.

Le groupement -CHO a alors été remplacé par le groupement -FMK (« fluorométhylketone »). En effet les inhibiteurs avec un groupement -FMK forment des liaisons covalentes. Les composés de type z-XXXD-FMK sont des inhibiteurs irréversibles des caspases. En utilisant ce type d'inhibiteur on peut rechercher dans un système d'étude de l'apoptose si une augmentation d'activité caspase enregistrée est la conséquence (i) soit d'une

augmentation de l'activité protéasique intrinsèque de l'enzyme (ii) soit d'une augmentation du nombre d'enzymes activées (Stennicke & Salvesen, 2000).

Les inhibiteurs de type Ac-XXXD-CHO sont plutôt utilisés dans le dosage d'activité caspases au niveau d'extraits cellulaires, tandis que le type z-XXXD-FMK est plutôt utilisé pour bloquer *in situ* l'activation des caspases sur des cellules vivantes. Il existe actuellement un inhibiteur de type z-XXXD-FMK pour chaque activité caspase de mammifères décrite à ce jour. Ainsi, il est maintenant possible d'inhiber spécifiquement une activité caspase, sur des cellules en culture, sans avoir recours à des lignées génétiquement modifiées (Schlesinger et al., 2000).

Il existe aussi des **inhibiteurs naturels des caspases**. Ces inhibiteurs sont présents au niveau des cellules de mammifères. Ils sont regroupés dans la famille des protéines IAP (« Inhibitor of Apoptosis Proteins »). Les produits des gènes *iap* de mammifères, cIAP-1 et cIAP-2, interagissent avec le TNF-R et bloquent l'apoptose (Liston et al., 1996). Les protéines IAP représentent la seule famille d'inhibiteurs de caspases endogènes connu chez les mammifères. Cinq protéines humaines apparentées à la famille IAP ont été identifiées :

- NAIP
- cIAP-1 ou HIAP-2
- cIAP-2 ou HIAP-1
- XIAP ou hILP
- Survivine

Les protéines XIAP, cIAP-1 et cIAP-2 peuvent lier et inhiber efficacement des caspases spécifiques. Ces 3 protéines montrent une haute spécificité pour les caspases 3-, -7 et -9 mais aucune pour les caspases -1, -6, -8 et -10 ou CED-3 de *C. elegans* (Deveraux et al., 1998). Dans la voie mitochondriale, les IAP cellulaires se lient directement à la procaspase-9, empêchant son activation et la formation de l'apoptosome avec le cytochrome c et l'Apaf-1. Par ailleurs, ces protéines ont été décrites comme des inducteurs de l'activation de NF- κ B. Ceci pourrait notamment contribuer à l'effet protecteur de NF- κ B sur l'apoptose induite par le TNF (Chu et al., 1997 ; Wang et al., 1998).

IV.4. Apoptose caspase indépendante

Ces dernières années, sont apparus plusieurs mécanismes de mort cellulaire autres que celui dépendant de la voie des caspases, et ainsi des voies annexes. La **surexpression de Bax** qui conduit à l'activation des caspases et à la mort cellulaire n'est pas inhibée par l'ajout de l'inhibiteur des caspases z-VAD-FMK (Xiang et al., 1996). D'autres stimuli (culture sans sérum, surexpression d'oncogènes c-myc, E1A ou de Bak, dommages de l'ADN...) peuvent également induire une mort cellulaire qui n'est pas bloquée par les inhibiteurs de caspases. Cette voie indépendante des caspases est cependant spéciale car elle présente des caractéristiques à la fois nécrotiques et apoptotiques ; elle se manifeste par une chute du potentiel mitochondrial sans dégradation de l'ADN et la cellule perd son intégrité membranaire tout en conservant l'étape de bourgeonnement de la membrane plasmique (Xiang et al., 1996 ; Hirsch et al., 1997).

Une équipe française a mis en évidence d'un nouveau facteur : l'**AIF**. L'équipe de Kroemer a montré que l'AIF est une molécule apoptogène libérée par la mitochondrie. Son clonage est récent (Susin et al., 1999). L'AIF a une double fonction d'oxydoréductase et de facteur apoptogène. Il est séquestré au niveau de l'espace intermembranaire mitochondrial, puis sous l'influence d'un stimulus apoptotique, il est relargué dans le cytosol. Il est ensuite acheminé vers le noyau où il est capable d'induire, à lui seul, les modifications morphologiques caractéristiques de l'apoptose (condensation cytoplasmique et nucléaire, fragmentation nucléaire de haut poids moléculaire...) sans qu'il y ait activation de caspases (Susin et al., 1999). Cependant ces auteurs ont montré que les deux voies, celle dépendante de l'activation des caspases et celle de l'AIF peuvent coexister dans certains modèles cellulaires.

CHAPITRE II : VIRUS ET APOPTOSE

La réplication d'un virus dans une cellule cible a généralement pour conséquence la production d'un grand nombre de virions, qui vont disséminer et initier à leur tour de nouveaux cycles d'infection (pour la plupart des virus). Les virus codent des protéines hautement efficaces pour optimiser cette réplication. Cependant, l'**organisme** possède des systèmes de **défense** pour **limiter l'infection virale** en tuant les cellules infectées. Une **réplication** virale réussie nécessite donc, non seulement une production et une **dissémination des virions** efficaces, mais aussi un « **échappement** » des virus à ces mécanismes de défense de l'hôte. Ces mécanismes de défense font le plus souvent intervenir les réponses immunitaires et inflammatoires de l'hôte. La plupart des virus, que ce soit des virus à ARN ou à ADN, déclenchent au cours de l'infection, un autre système de défense de l'hôte : **l'apoptose**. L'apoptose est un événement génétiquement programmé et placé sous la dépendance d'effecteurs cellulaires. Elle peut être réprimée par des gènes de survie ou activée par des gènes de mort cellulaire. Mais, face à de tels systèmes de défense, de nombreux **virus** développent tout un **arsenal** de protéines qui interfèrent avec ces gènes de régulation pour inhiber ou retarder ces actions protectrices permettant la production d'un nombre suffisant de virions. Ces protéines virales agissent sur un grand nombre de points stratégiques dans le processus d'apoptose par liaison directe, mimétisme fonctionnel ou homologie structurale. Ces **interactions** sont particulièrement bien illustrées dans certains modèles : Adénovirus, virus Epstein-Barr, VIH, virus de l'hépatite C.... L'action de ces protéines virales peut avoir lieu : (i) au niveau des **récepteurs** du signal initial membranaire (Fas), (ii) au niveau de la transduction du signal aux **gènes de régulation** (p53, pRb, bcl-2) ou par transactivation des **protooncogènes** (c-myc, c-fos, c-jun), (iii) au niveau de la **phase effectrice** mettant en jeu les caspases (Roulston et al., 1999).

Cette apoptose peut être le résultat d'une réponse cellulaire à l'infection, mais elle peut aussi être la conséquence inévitable de l'action de certaines protéines virales. De plus, il semble que **certains virus** codent des protéines qui induisent et **se servent de l'apoptose** comme moyen pour tuer et sortir des cellules, tout en favorisant la dissémination des virions. Dans ce cas, une très fine régulation entre l'inhibition et l'induction de l'apoptose est mise en place par l'expression séquentielle de protéines virales.

FAMILLE	GENRE	VIRUS		GENOME	PROTEINES	FONCTIONS
<i>Adenoviridae</i>		Adenovirus humain		ADN db	E1B-19K E3-14.7K RID (E3 10.4/14.5K) RID (E3 10.4/14.5K) E1B-19K E1B-55K E4orf6 E1B-55K/Eorf6 complex	Activité anti-apoptotique, homologue de Bcl-2 Bloque l'action PLA2 Bloque l'action PLA2 Dégrade Fas Interagit avec FADD Lie p53, réprime la transactivation et bloque l'apoptose Lie p53, réprime la transactivation et bloque l'apoptose Dégrade p53
<i>Baculoviridae</i>	<i>Nucleopolyhedrovirus</i>	Autographa californica nuclear polyhedrosis virus Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus Orgyia pseudotsugata polyhedrosis virus Cydia pomonella granulosis virus	AcNPV BmNPV OpMNPV CpGV	ADN db circulaire	p35 p35 Op-IAP Cp-IAP	S et I des caspases S et I des caspases IAP IAP ₁
<i>Hepadnaviridae</i>	<i>Orthohepadnavirus</i>	Baculovirus Hepatitis B virus	HBV	ADN db circulaire	p35 IAP HBx (pX)	Inhibiteur de la famille des protéases ICE Se lie et inhibe TRAFs Lie p53, inhibe la transactivation et l'apoptose
<i>Poxviridae</i>	<i>Orthopoxvirus</i>	Cowpox virus Vaccinia virus		ADN db	CrmB CrmC CrmD CrmA CHOhr E3L K3L E3L B13R (SPI-2) B22R CHOhr (CP77) A53R	Homologue au TNF-R Homologue au TNF-R (soluble) Homologue au TNF-R Serpine Affecte l'organisation de l'hôte Inhibe PKR Inhibe PKR Inhibe RNAse L Serpine Serpine Affecte l'organisation de l'hôte Homologue au TNF-R
	<i>Molluscipoxvirus</i>	Molluscum Contagiosum Virus	MCV		MC159/MC160 MC066L	vFLIPs Antioxydant
	<i>Leporipoxvirus</i>	Myxomavirus (Sanarelli) Rabbitpox virus Shope fibroma virus			M-T2 M-T4 M-T5 M11L Serp-2 SPI-1 SPI-2 SFV-T2 NIR	Homologue au TNF-R ? ? Protéine transmembranaire Serpine Serpine Serpine Homologue au TNF-R ?

Tableau 4.1. : Virus ADN inhibant l'apoptose.

Il est maintenant bien établi qu'un grand nombre de virus responsables de pathologies agissent sur les mécanismes moléculaires impliqués dans les processus apoptotiques. Dans ce chapitre, nous choisirons quelques exemples de protéines virales et leurs différentes stratégies, parmi la nombreuse bibliographie déjà publiée. Une liste, non exhaustive, de ces exemples sont cités dans les Tableaux 4 et 5.

I. Stratégies virales de régulation de la voie des récepteurs de mort

I.1. Inhibition de la voie des récepteurs de mort

Les protéines E3-10.4K et E3-14.5K des **Adénovirus** dégradent le récepteur Fas et diminuent ainsi son exposition à la surface des cellules (Tollefson et al., 1998). Le manque en récepteur Fas provoque une résistance aux voies apoptotiques médiées par le FasL.

Le **virus Epstein-Barr** (EBV) a fait l'objet de très nombreuses études sur l'apoptose. Il code une protéine, LMP-1, qui contient plusieurs domaines capables d'interagir avec les molécules adaptatrices du récepteur au TNF, notamment TRAF et TRADD (Sandberg et al., 1997). Ces interactions empêchent le recrutement des caspases donc la transduction du signal apoptotique initiée par la liaison du ligand au TNF-R. Le domaine cytosolique de LMP-1 est aussi capable d'activer le facteur de transcription NF- κ B qui contrôle l'expression de facteurs de survie (Knecht et al., 1999 ; Miller et al., 1998).

La protéine de capsid du **virus de l'hépatite C** (VHC) bloque l'effet pro-apoptotique du TNF α en empêchant l'activation de la procaspase-8 (Marusawa et al., 1999 ; Ray et al., 1998).

La protéine M-T2 du **Myxomavirus** est une protéine homologue au récepteur TNF-R cellulaire mais qui est non fonctionnelle. Cette protéine, quand elle est exprimée à la surface des cellules infectées, entre en compétition avec les TNF-R cellulaires pour la liaison du TNF α . Ainsi, M-T2 diminue voire empêche l'activation de la voie apoptotique induite par le TNF α (Xu et al., 2000). La protéine M-T2 est aussi un homologue à CrmB et CrmD (Cunnion, 1999).

FAMILLE	GENRE	VIRUS		GENOME	PROTEINES	FONCTIONS
<i>Herpesviridae</i>	<i>Simplexvirus</i>	Human herpesvirus-1	HSV-1	ADN db	γ 1 34.5 Us3 γ 1 34.5	Déphosphoryle eIF-2 α ? Inhibe totalement la synthèse protéique cellulaire
		Bovine herpesvirus	BHV-4		BORFE2	vFLIPs, inhibiteur de la caspase-8
	<i>Varicellovirus</i>	Bovine herpesvirus	BHV-1		LRP	Inhibe la progression du cycle cellulaire
		Cytomegalovirus	Human herpesvirus-5	HCMV	IE2 Unknown, (IE1 ?)	lie p53 et l'inactive Séquestre p53 dans le cytoplasme
	<i>Muromegalovirus</i>	Equine herpesvirus-2	EHV-2		E8	vFLIPs, inhibiteur de la caspase-8
		<i>Lymphocryptovirus</i>	Human herpesvirus-4 Epstein-Barr Virus	EBV		LMP-1 BHRF1 EBNA-4 EBNA-5 LMP-1 BALF1 BZLF1
	<i>Rhadinovirus</i>		Human herpesvirus-8	HHV-8		K13 KS-Bcl2 LANA
	<i>"Marek's disease-like viruses"</i>	Saimirine herpesvirus-2	Virus Saimiri		Orf 71 ORF16	vFLIPs, inhibiteur de la caspase-8 Activité anti-apoptotique, homologue de Bcl-2
		Gallid herpesvirus-2	Virus de la maladie de Marek		MEQ	?
	<i>kidovirus</i>	African Swine Fever Virus	ASFV (BA71V)		A179L p21 LIMWS-HL (S-HL) A224L	Activité anti-apoptotique, homologue de Bcl-2 Activité anti-apoptotique, homologue de Bcl-2 Activité anti-apoptotique, homologue de Bcl-2 Homologue de IAP
African Swine Fever Virus		ASFV (Malawi)				
<i>Papillomaviridae</i>	<i>Papillomavirus</i>	Bovine Papillomavirus	BPV BPV	ADN db	E5 E8 E6	Empêche l'apoptose induite par la carence en IL-3 Inhibe l'apoptose induite par les U.V. Dégrade p53 par la voie ubiquitine
		Human Papillomavirus	HPV			
<i>Polyomaviridae</i>	<i>Polyomavirus</i>	Polyomavirus		ADN db	ST MT	Bloque le signal TNF Active PI-3K en réponse à la phosphorylation de Bad via Akt
		Simian Virus 40	SV40 SV40 SV40		LT SV40LT (?) LT	Bloque le signal Fas Activité anti-apoptotique, homologue de Bcl-2 lie p53, bloque l'apoptose

Tableau 4.2.: Virus ADN inhibant l'apoptose (fin).

Le **virus de la variole bovine** (Cowpox virus) produit trois protéines distinctes qui inhibent les voies de signalisation dépendantes de Fas ou du TNF-R : CrmB, CrmC et CrmD. CrmB et CrmD sont des homologues structuraux au TNF-R ; CrmC qui est soluble, lie avec une grande affinité le TNF α et ainsi empêche sa liaison au TNF-R. Le blocage de la voie apoptotique induite par le TNF α se fait donc à deux niveaux (Cunnion, 1999).

La protéine A53R du **virus de la vaccine** présente des similitudes structurales avec la protéine CmrC (Alcami et al., 1999).

Plusieurs **virus Herpes** codent des protéines nommées FLIP pour « FLICE Inhibitory Proteins » qui inhibent l'activation de la caspase-8. Les FLIP virales (vFLIPs) sont des isoformes de la caspase-8 ; elles contiennent deux DED mais pas de site catalytique actif. Ces vFLIPs se lient séparément à FADD et la caspase-8 et ainsi bloquent la formation du DISC. Les vFLIPs bloquent l'apoptose induite par les récepteurs de mort CD95, TNF-RI, TRAMP/DR3 et TRAIL-RI, ce qui laisse supposer que ces récepteurs utilisent la même voie de signalisation pour induire l'apoptose. Les vFLIPs sont codées par différents herpes virus tels que le HHV8 (KSHV) (K13, Djerbi et al., 1999), EHV2 équin (E8, Bertin et al., 1997), BHV4 bovin (BORFE2, Wang et al., 1997) et le virus herpes de saïmiri (Orf71, Wang et al., 1997).

Des vFLIPs ont aussi été identifiées chez un **poxvirus** le virus du *molluscum contagiosum* (MCV) (MC159/MC160, Shisler & Moss, 2001).

I.2. Induction de la voie des récepteurs de mort

La protéine E1A des **Adénovirus** augmente la sensibilité des cellules infectées au TNF α et au FasL, par un mécanisme qui dépendrait de la liaison de p300, une acétyltransférase impliquée dans la régulation de l'expression de nombreux gènes cellulaires. Toutefois le mécanisme d'action de E1A n'est pas complètement élucidé (Shisler et al., 1996).

La protéine moyenne T (« middle-T antigen ») du **polyomavirus** induit aussi une grande sensibilité des cellules infectées au TNF, mais uniquement en absence de la petite protéine T (« small-T antigen ») (Bergqvist et al., 1997).

L'infection par le **virus herpes** humain HHV-6 provoque une augmentation de l'expression du TNF-R, facilitant la mort cellulaire induite par la liaison du TNF aussi bien au niveau des cellules infectées que les cellules non-infectées (Inoue et al., 1997).

FAMILLE	GENRE	VIRUS		GENOME	PROTEINES	FONCTIONS
<i>Flaviviridae</i>	<i>Hepacivirus</i>	Hepatitis C virus	HCV	ARN sb +	Core protein Core protein Core protein	Active NF- κ B => inhibition de l'apoptose médiée via Fas et TNF- α Interagit avec le domaine cytoplasmique du récepteur au TNF Bloque la transcription de p53
<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Influenzavirus A</i>	Influenza A virus		ARN sb -	NS1	Inhibe PKR
<i>Picornaviridae</i>	<i>Cardiovirus</i>	Theiler's murine encephalomyelitis virus	TMEV	ARN sb +	L*	?
<i>Reoviridae</i>		Reovirus		ARN db (+/-)	σ 3	Inhibe PKR
<i>Retroviridae</i>	<i>Lentivirus</i>	Human immunodeficiency virus -1 Human immunodeficiency virus -2	HIV-1 HIV-2	ARN sb +	Tat Vpr	Sur-régule Bcl2 Supprime l'apoptose induite via TcR en inhibant l'activité NF κ B
	<i>Deltaretrovirus</i>	Human T-cell leukemia virus	HTLV-1		Tax	Bloque la transcription médiée par p53
<i>Togaviridae</i>		Classical swine fever virus	CSFV	ARN sb (+)	Erns	?
			γ -HV68		M11	Activité anti-apoptotique, homologue de Bcl-2

Tableau 4.3.: Virus ARN inhibant l'apoptose.

La protéine X du **VHB** semble responsable d'une augmentation de la sensibilité des cellules à l'apoptose induite par le TNF (Su & Schneider, 1997).

Zhu et coll. (1998) ont montré que la liaison de la protéine du core du **VHC** au domaine cytoplasmique du TNF-R1 augmente l'apoptose induite par le TNF α et apparaît alors comme responsable en partie des lésions hépatocellulaires.

II. Les molécules virales homologues de la protéine anti-apoptotique Bcl-2

Un certain nombre de virus codent des protéines homologues de Bcl-2 ; ces protéines ont des propriétés fonctionnelles similaires mais peu d'homologie structurale. Ces molécules Bcl-2 virales interviendraient au niveau de la formation des homodimères et des hétérodimères.

C'est le cas de la protéine E1B-19K des **Adénovirus** (Farrow et al., 1995). Elle est capable de se lier à certains membres pro-apoptotiques tels que Bax, Bik et Bak et inhibe l'apoptose (Perez & White, 2000). Cette protéine interagit aussi avec les lamines nucléaires et cette liaison est nécessaire pour son activité inhibitrice (Rao et al., 1997).

Les **virus herpès** lymphotropes qui codent des v-Bcl-2 sont potentiellement oncogènes. L'expression de KS-Bcl2 est détectée dans les cellules de sarcome de Kaposi et dans les lignées B de lymphome de BCBL (« Body Cavity-Based Lymphoma ») contenant le virus HHV-8. De même, chez le virus herpès de Saïmiri on retrouve l'expression de ORF16 un autre v-Bcl-2 (Nava et al., 1997), mais qui n'est pas retrouvée dans les cellules T humaines transformées ne répliquant pas le virus de façon lytique (Kraft et al., 1998).

Le virus **Epstein-Barr** a développé différentes stratégies pour prolonger la survie de la cellule hôte. Il code un v-Bcl-2 et induit l'expression de c-Bcl-2 et de la protéine anti-apoptotique A₂₀. La protéine virale EBNA-4 est responsable de la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Silins & Sculley, 1995). Les protéines virales BHRF1 et BALF1 sont des homologues structuraux de Bcl-2 et ont les mêmes propriétés protectrices (Kawanishi, 1997). La protéine virale BALF1 empêche le déclenchement de l'apoptose en interagissant avec les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak (Marshall et al., 1999).

FAMILLE	GENRE	VIRUS	GENOME	PROTEINES	FONCTIONS
Adenoviridae		Adenovirus humain	ADN db	E1A E3/ADP E4	Dérégulation du cycle cellulaire ? Se lie à pRb, induit le cycle cellulaire Induit l'accumulation de p53 et l'apoptose p53-dépendante Induit la sensibilité au TNF, sur-régule p53 à travers la stimulation du cycle cellulaire Dislocation du noyau Bloque l'activité de E1B-19K (?) Nécessaire pour l'efficacité de libération des particules virales Induit l'apoptose en absence de p53 Active la phospholipase-2A et induit l'apoptose
Baculoviridae		Baculovirus	ADN db circulaire	IE-1 IE-1	Facteur de transcription ?
Circoviridae		Autographa californica nuclear polyhedrosis virus	ADN sb circulaire	VP3 VP3/apoptin VP3/apoptin	? protéine nucléaire seulement dans les cellules transformées
Herpesviridae		Chicken anemia virus	CAV	?	Implication d'une protéine virale, attachement de la particule virale suffisant pour induire l'apoptose
		Bovine Herpes virus	BHV	?	Implication d'une protéine virale, attachement de la particule virale suffisant pour induire l'apoptose
		Human herpesvirus-1	HSV-1	?	Induction de l'apoptose non affectée par la surexpression de Bcl-2
		Human herpesvirus-3	VZV	?	Sur-régulation du TNF-R1 dans les cellules infectées et voisines
		Human herpes virus 6/7	HHV6/7	?	Se lie à Rb et favorise la progression du cycle cellulaire, comparable à E1A de l'Adenovirus ? , mais uniquement en absence des protéines latentes
		Human herpesvirus-4 Epstein-Barr virus	EBV	EBNA3C EBNA1	
Hepadnaviridae		Hepatitis B virus	ADN db circulaire	HBx	Induit la sensibilité au TNF, active MEKK qui sur-régule c-myc puis p53, mécanisme p53-indépendant inconnu
Papillomaviridae		Human papillomavirus	HPV	E7 E2	Sur-régule p53 à travers la stimulation du cycle cellulaire Supprime l'expression de E6 au cours de l'infection
Polyomaviridae		Polyomavirus hominis		Large T Middle T	Sur-régule p53 à travers la stimulation du cycle cellulaire Induit l'hypermensibilité au TNF
		Simian virus 40	SV40	Large T	Liaison à pRb Sur-régule p53 à travers la stimulation du cycle cellulaire
Parvoviridae		B19 virus	B19	NSP NS1	Protéine nucléaire, se lie à l'ADN, altère la synthèse et la phosphorylation de protéines cellulaires Cause des cassures aux bins d'ADN, induit l'arrêt du cycle cellulaire en G2
		Murine minute virus	MVM	NS1/NS2	Cause des cassures aux bins d'ADN, induit l'arrêt du cycle cellulaire en G2

Tableau 5.1. : Virus ADN activant l'apoptose.

Plusieurs inhibiteurs viraux des caspases sont décrits :

- la protéine **CrmA** « Cytokine response modifier A » est une protéine de 38 kDa, codée par le gène précoce *cmrA* du virus de la **variolo bovine** (Tewari & Dixit, 1995). Elle présente des homologies avec les serpin (serpin : «serine protease inhibitor»), une famille d'inhibiteurs de protéases à sérine. Identifiée au départ comme un inhibiteur de l'activation de IL-1 β par la caspase-1, la protéine CrmA s'est révélée être un inhibiteur fort de l'apoptose induite par certains stimuli de mort (Salvesen & Dixit, 1997), comme :

- la surexpression de la caspase-1
- la privation de sérum
- la carence en NGF
- la ligation à certains récepteurs de mort
- le détachement de la matrice extracellulaire.

La protéine CrmA inhibe aussi la caspase-8 et dans une moindre mesure la caspase-6 (Zhou et al., 1997). La spécificité variable de la protéine CrmA pour les caspases peut être utile pour déterminer quelle caspase est impliquée en fonction de la voie induite. La protéine CrmA peut aussi potentiellement inhiber le granzyme B, une sérine protéase qui montre la même spécificité pour l'acide aspartique que les caspases (Froelich et al. 1998). Des gènes homologues à *cmrA* ont été retrouvés chez le **virus de la vaccine** (SPI-2, Dobbstein & Shenk, 1996).

- la protéine P35 du **baculovirus** est une protéine de 35 kDa qui inhibe l'apoptose induite dans des cellules d'insecte infectées. De plus, l'expression ectopique de P35 prévient l'apoptose chez *C. elegans*, *D. melanogaster* et dans des cellules de mammifères (Clem et al., 1991). La capacité de la protéine P35 à empêcher l'apoptose, a été attribuée à une inhibition directe des caspases. Les caspases 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 et CED-3 de *C. elegans*, mais pas le granzyme B, sont efficacement inhibées par P35. Aucune inhibition significative n'est observée avec les membres représentatifs des autres familles de protéases. L'inhibition par P35 nécessite un site actif accessible sur la caspase. P35 est un inhibiteur des caspases, très utile pour démontrer l'implication des caspases dans différents systèmes expérimentaux (Stennicke et al., 2002). Cependant, l'inhibition des caspases par P35 étant aspécifique, il est alors difficile de déterminer quelle caspase est inhibée et par conséquent quelle voie de transduction du signal est activée.

FAMILLE	GENRE	VIRUS		GENOME	PROTEINES	FONCTIONS
<i>Arenaviridae</i>	<i>Arenavirus</i>	Lymphocytic Choriomeningitis Virus	LMC	ARN sb -	nd	?
<i>Bornaeviridae</i>	<i>Bornaevirus</i>	Infectious Bursal Disease Virus	IBDV	ARN db segmenté	NS VP2	Apoptose inhibée par Bcl-2
<i>Arteriviridae</i>	<i>Arterivirus</i>	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome	PRRSV	ARN sb +	ORF5/p25	Glycoprotéine associée à la membrane des particules virales, action en aval de Bcl-2
<i>Coronaviridae</i>	<i>Coronavirus</i>	Mouse Hepatitis Virus strain 3 Transmissible gastroenteritis coronavirus	MHV-3 TGEV	ARN sb + ARN sb +	? ?	? L'inhibition de l'apoptose n'a pas d'effet sur la réplication virale
<i>Flaviviridae</i>	<i>Hepatitis virus</i>	Hepatitis C Virus	HCV	ARN sb +	Core protein	Se lie au domaine cytoplasmique du TNFR1, inhibe l'activation de NF- κ B
	<i>Flavivirus</i>	Japanese Encephalitis Virus Dengue virus	JEV	ARN sb + ARN sb +	? M et E	Apoptose liée à la réplication virale, bloquée par Bcl-2 dans certaines cellules Apoptose impliquant l'activation de NF- κ B
<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Influenza virus A/B</i>	Influenza A/B virus		ARN sb -	?	Sur-régulation de l'expression de Fas, médié (peut-être) par PKR, inhibitable par Bcl-2
<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Respirovirus</i>	Sendai virus		ARN sb -	C protein Leader region	Apoptose liée à l'activation des caspases-3 et -8 Doit impliquer l'induction de l'interféron
	<i>Rubulavirus</i>	Avian Newcastle disease virus	NDV	ARN sb -	?	Induction de l'interféron et du TNF,
	<i>Morbilivirus</i>	Measles virus		ARN sb -	?	Induit une apoptose qui implique ICAM-1
	<i>Pneumovirus</i>	Human Respiratory Syncytial Virus	RSV	ARN sb -	?	Induction de l'interféron et de la caspase-1
<i>Picornaviridae</i>	<i>Cardiovirus</i>	Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus	TMEV	ARN sb +	?	?
	<i>Hepatovirus</i>	Hepatitis A Virus	HAV		?	?
	<i>Enterovirus</i>	Coxsackievirus B3 Poliovirus			Protease 3C Protease 2A	Apoptose inhibées par z-VAD-FMK
<i>Reoviridae</i>		Reovirus Reovirus strain T3D Reovirus strain T3A Rotavirus		1 ARN db (+/-) segmenté	σ 1 (capside) M2 ? ? NSP4	Protéine capside, se lie à la surface de la cellule ? Apoptose inhibées par Bcl-2 Apoptose inhibées par des inhibiteurs de la calpaïne Perte de la perméabilité de la membrane plasmique (Nécrose ?)

Tableau 5.2. : Virus ARN activant l'apoptose.

Récemment, la première caspase résistante à P35 a été décrite, il s'agit de la caspase de drosophile DRONC, homologue à la caspase-9 (Meier et al., 2000b). L'action de cette caspase ayant lieu en amont du processus apoptotique, cela indique que l'effet inhibiteur de P35 ne s'exerce pas au niveau des étapes initiales de l'apoptose mais plutôt à la fin du processus en bloquant les caspases activatrices.

- les protéines de la famille **IAP**, dont les membres ne présentent pas d'homologies de séquences avec P35 (Duckett et al., 1996), ont été découvertes pour la première fois chez un **baculovirus** d'insecte (Clem et al., 1991). Ces auteurs ont montré l'importance de ces protéines pour la suppression de la mort cellulaire dans les cellules infectées de l'insecte hôte. Là aussi, il a été montré que l'expression ectopique de certains membres de la famille IAP pouvait bloquer la mort cellulaire induite par un grand nombre de stimuli sur des cellules en culture (Deveraux et al., 1998).

IV. Stratégies virales de régulation du cycle cellulaire

La régulation du cycle cellulaire est sous le contrôle d'un grand nombre de facteurs cellulaires, parmi lesquelles **pRb** (« retinoblastoma tumour suppressor protein »), **p21** et **p53**. La protéine p53 joue un rôle central dans le maintien de la stabilité et de l'intégrité du génome cellulaire (Agarwal et al., 1998). La protéine p53 intervient de 2 façons : (i) elle a la propriété de bloquer la transition G1/S du cycle cellulaire, (ii) elle est au centre de la décision entre apoptose et survie cellulaire. En effet, des altérations dans l'ADN, la déplétion en facteurs de croissance et les infections virales peuvent activer la voie apoptotique dépendante de la protéine p53 (Agarwal et al., 1998 ; Evan & Littlewood, 1998).

IV.1. Inhibition de l'apoptose dépendante du cycle cellulaire

Les virus à ADN, tels que les adénovirus humains, le virus simien SV40 ou les papillomavirus humains (HPV), sont capables de se répliquer dans les cellules quiescentes de l'hôte.

L'antigène T du **SV40** est capable de lier p53 (Barry & McFadden, 1998). Cette liaison inhibe l'induction de l'apoptose par la caspase-1 (Jung & Yuan, 1997).

Les protéines E1B-55K et E4orf6 d'Adénovirus inhiberaient l'apoptose en réduisant le niveau d'expression de p53 (Teodoro & Branton, 1997).

FAMILLE	GENRE	VIRUS	GENOME	PROTEINES	FONCTIONS
<i>Retroviridae</i>	<i>Lentivirus</i>	Human Immunodeficiency Virus	ARN +	Gp 120 Gp 41 Gp 120 / gp41 Tat	Augmente l'expression des transglutaminases Activation des cellules T Sous-régule Bcl-2 Sous-régule Down-régule Bcl-2 Crosslink avec les molécules CD4 des cellules non-infectées Interagit avec le récepteur chemokine CXCR4 des neurones Facteur de transcription Sur-régule de l'expression de Fas, down-régule l'expression de Bcl-2 Sur-régule le promoteur FasL, augmente l'état oxydatif des cellules T infectées
		Simian Immunodeficiency Virus	SIV	Gp 160 Vpr Protéase	Forme des agrégats, augmente le calcium intracellulaire Induit l'arrêt du cycle cellulaire en G2
		Human T-cell Leukemia Virus	HTLV	Tat Tax	Action sur les résidus acide-aspartiques (Caspases ?)
		Moloney Murine Leukemia Virus	MMLV	?	Facteur de transcription Sur-régule le promoteur FasL, augmente l'état oxydatif des cellules T infectées ?
<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Vesiculovirus</i> <i>Lyssavirus</i>	Vesicular Stomatitis Virus	ARN sb -	?	Apoptose liée à la synthèse de glycoprotéine et la production de particules virales
		Rabies Virus		G	Apoptose liée à la synthèse de glycoprotéine et la production de particules virales, sur-régulation de Bax et de caspase-1
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	Sindbis Virus	ARN sb +	nd E2 nd	?
		Semliki Forest Virus Rubella Virus		E1 E2 NS region ? ? ?	Glycoprotéine transmembranaire Surexpression de Bcl-2, persistance Sur-régulation de NFκB (dans les neurones) Sur-régulation de NFκB (dans les neurones) apoptose inhibée par z-VAD-FMK Apoptose p53-dépendante

Tableau 5.3. : Virus ARN activant l'apoptose (suite et fin).

Les **papillomavirus** humains ont développé d'autres mécanismes : l'interaction de la protéine E7 de HPV avec pRb va l'inactiver, tandis que l'inhibition de l'apoptose induite par p53 sera assurée par la protéine E6 de HPV qui induit l'ubiquitination de p53, puis sa dégradation par les protéasomes (Münger et al., 1989 ; Seavey et al., 1999).

Récemment, il a été découvert que **HHV8** code un inhibiteur de p53, nommé LANA (Sarid et al., 1999).

L'activité de la protéine X, du **virus de l'hépatite B** (VHB) est plus complexe. Elle est capable de séquestrer p53, de réguler le cycle cellulaire et de moduler l'apoptose dépendante de p53. Des niveaux élevés d'expression de la protéine X induisent l'apoptose, tandis qu'une faible expression de pX inhibe l'apoptose. Cependant, en absence de p53, la protéine X s'y substitue et favorise la prolifération cellulaire au lieu d'induire l'apoptose (Barnabas et al., 1997 ; Barry & McFadden, 1998 ; Chirillo et al., 1997 ; Elmore et al., 1997 ; Lin et al., 1997 ; Su & Schneider, 1997 ; Takada et al., 1997). La protéine X du VHB joue un rôle important dans l'induction d'hépatocarcinome en diminuant la liaison à l'ADN et la transactivation de p53, inhibant ainsi son activité pro-apoptotique. Cette protéine peut aussi exercer un effet anti-apoptotique indépendamment de p53, en bloquant la division cellulaire en phase G1/S. Enfin, les protéines X extraites de carcinomes hépatocellulaires ont perdu leur capacité d'induire l'apoptose, ce qui suggère que le pouvoir carcinogène du VHB serait corrélé à l'inactivation de cette protéine (Sirma et al., 1999).

Le virus **Epstein-Barr** code deux protéines qui se lient à p53. La protéine EBNA-5 (EBNA-LP) interagit avec pRb et p53 et perturbe le cycle cellulaire (Szekely et al., 1993). La protéine BZLF1 se lie à la partie C-terminale de p53 et bloque la transactivation (Dreyfus et al., 2000). BZLF1 contrôlerait le passage de l'infection latente à l'infection lytique qui serait bloquée par l'expression élevée de p53.

IV.2. Induction de l'apoptose dépendante du cycle cellulaire

L'antigène T du **SV40** est capable de lier pRB (Barry & McFadden, 1998), et ainsi déclenche l'apoptose (Kolzau et al., 1999).

La protéine E1A des **Adénovirus** augmente l'expression de p53 ce qui induit l'apoptose (Lowe & Ruley, 1993).

La protéine E2 de **HPV** stimule la transcription de p53 tout en exerçant un contrôle négatif sur l'expression de E6 et E7 (Desaintes et al., 1997) ; la délétion du gène viral codant E2 contribuerait à l'oncogénicité des protéines E6 et E7.

L'infection par le **virus de la rubéole** induit la surproduction de la protéine p53 qui va ensuite activer l'expression de la protéine inhibitrice du cycle cellulaire, p21 (Megyeri et al., 1999). Cette activation serait responsable de l'activation des voies apoptotiques liées aux caspases (Duncan et al., 1999). Lors d'une rubéole congénitale, le retard de croissance intra-utérin et les malformations du fœtus pourraient être la conséquence d'une destruction des tissus par une apoptose non contrôlée (Megyeri et al., 1999).

V. Stratégies virales de modulation du « système IFN »

Les IFNs sont généralement regroupés en deux groupes (Samuel, 1991) :

- les IFNs de type I ou « **IFNs viraux** » (IFN- α , IFN- β et IFN- ω) sont produits suite à une infection virale.
- Les IFNs de type II ou « IFNs immuns » sont induits par des stimuli mitogéniques ou antigéniques.

Le « système IFN » qui met en jeu les IFNs de type I (IFN I), représente un mécanisme précoce de défense de l'hôte, avant le début de la réponse immunitaire. Il comprend (i) les **cellules qui synthétisent** des interférons en réponse à un stimulus externe, tel que l'infection par un virus, et (ii) les **cellules qui répondent** aux IFN I en maintenant un « état antiviral », par la production de protéines régulées qui inhibent la multiplication virale (Pestka et al., 1987). La plupart des cellules infectées sont capables de synthétiser les IFN- α/β , l'IFN- β étant essentiel à une réponse antivirale efficace. Ils jouent donc un rôle important dans le **réponse de l'hôte suite à une infection**.

Les IFN I sont aussi capables d'induire l'apoptose, en agissant sur de nombreux gènes cellulaires, notamment le gène de la **PKR** « dsRNA-dependent serine/threonine protein kinase » (Samuel, 1993). La PKR est présente sous une forme latente dans le cytoplasme de la plupart des cellules. Au cours de la réplication virale, la production d'ARN double-brin peut aussi stimuler la PKR et provoquer son **auto-phosphorylation**. La PKR ainsi activée, phosphoryle à son tour le facteur d'initiation de la traduction, e1F-2 α (Everett & Mc Fadden, 1999 ; Katze, 1995). La forme phosphorylée du facteur e1F-2 α est inefficace pour la traduction des ARNm. Il y a donc progressivement un **arrêt des synthèses protéiques** ce qui induit l'entrée en apoptose des cellules infectées. La PKR phosphorylée a aussi la capacité de déclencher directement l'**apoptose** en activant la voie des récepteurs (Balachandran et al., 1998) en passant par la voie de signalisation FADD/caspase-8 puisque la mort induite par les

IFNs est inhibée par des variants négatifs de FADD, des inhibiteurs de la caspase-8 ou dans des cellules déficientes en FADD, mais pas dans des cellules déficientes en Apaf-1.

Une autre conséquence de l'infection virale, est l'activation de la **transcription** d'un très grand nombre de **gènes cellulaires** tels que IRF-3 (« IFN regulatory factor »). IRF-3 est une sous-unité de DRAF (« double-stranded RNA-activated transcription factor complex ») qui agit directement sur l'activation de la transcription au niveau des promoteurs de IFN- α et IFN- β .

Plusieurs virus ont donc développé des stratégies pour se protéger contre les mécanismes de défense de l'hôte pro-apoptotiques et contre les antiviraux faisant intervenir les IFN I.

Les protéines E3L du **virus de la vaccine** (Chang et al., 1992) et $\sigma 3$ du **réovirus** (Denzler & Jacobs, 1994) inhibent l'action de la PKR en se liant à l'ARN bicaténaire, empêchant ainsi l'interaction de PKR avec l'ARN viral. La protéine K3L du virus de la vaccine (Davies et al., 1993), qui ressemble à e1F2 α , agirait en interférant dans l'interaction entre PKR et e1F2 α . La protéine NS1 du **virus influenza A** se lie à PKR et empêche la phosphorylation et l'inactivation de e1F2 α (Lu et al., 1995).

La protéine virale $\gamma_134.5$ de l'**HSV-1** a la capacité de bloquer la voie apoptotique médiée par la PKR (Chou & Roizman, 1992). Elle préserve l'activité du facteur d'initiation de la traduction e1F-2 α en recrutant la phosphatase 1 α cellulaire et le complexe hétéro-dimérique $\gamma_134.5$ /phosphatase 1 α maintiendrait le facteur e1F-2 α sous sa forme active déphosphorylée (He et al., 1997).

VI. Stratégies virales sur le contrôle du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est principalement impliqué dans l'acheminement des protéines vers les voies de sécrétion. Au cours d'infection virale, la synthèse protéique augmente en fonction de l'avancée dans l'expression génétique du virus. Une accumulation de protéines virales dans le RE pourrait alors contribuer à la **perte de l'intégrité fonctionnelle** de ce compartiment. En réponse à ce flux de protéines virales, le RE induit un grand nombre de voies de transduction signal (Pahl & Baeuerle, 1997), qui peuvent directement induire l'**apoptose** (Ng & Shore, 1998 ; Granville et al., 1998 ; Zinszner et al., 1998). Toutefois, le rôle du RE ainsi que les mécanismes induits en réponse à une infection virale, ne sont pas encore clairement connus (Everett & Mc Fadden, 1999).

L'infection par le **virus dengue** (DEN) provoque l'apoptose dans différents types cellulaires : neurones murins, hépatocytes humains et cellules de Küpffer (Desprès et al., 1996 ; Desprès et al., 1998 ; Duarte Nunes dos Santos et al., 2000 ; Marianneau et al., 1999). Il semble que l'accumulation des glycoprotéines d'enveloppe prM et E de ce virus, dans la lumière du RE, soit à l'origine d'un stress induisant le processus apoptotique (Marianneau et al., 1998a ; Marianneau et al., 1998b). En outre, il a été démontré que l'expression des glycoprotéines prM et E du virus DEN était à elles seules, suffisante pour induire l'apoptose dans des cellules de neuroblastome murin. Dans le cas d'une infection par le virus DEN sur des hépatocytes, le déclenchement du processus apoptotique nécessiterait l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Marianneau et al., 1997), mais les gènes impliqués dans ce processus apoptotique n'ont pas été identifiés.

Pour le **virus de la rage**, l'induction du processus apoptotique dans des neurones murins est liée à la réplication du virus (Theerasurakarn & Ubol, 1998). Il semble que l'accumulation de la glycoprotéine d'enveloppe G du virus rabique soit, là aussi, l'événement déclenchant l'apoptose (Morimoto et al., 1999 ; Thoulouze et al., 1997).

Le RE est aussi un des compartiments impliqués dans la rétention du calcium intracellulaire et le maintien de l'**homéostasie calcique**. Même si le mécanisme déclencheur de l'apoptose dépendante du RE n'est pas clairement identifié, il semble impliquer la régulation de l'homéostasie calcique (Bratton & Cohen, 2001). Dans le cas d'une infection par le **virus DEN**, la perte progressive de l'intégrité fonctionnelle du RE serait à l'origine d'une fuite de calcium du RE vers le cytosol, les ions Ca^{2+} ainsi libérés pouvant activer de la cascade apoptotique *via* une stimulation des mitochondries (Desprès et al., 1996 ; Marianneau et al., 1998a ; Marianneau et al., 1998b).

Les protéines qui fixent les ions calciques, comme la calmoduline, interviennent dans la régulation de la concentration en Ca^{2+} . Ainsi, l'interaction de la gp160 avec la calmoduline et la perturbation de la régulation de l'homéostasie calcique qui en résulte, serait l'un des mécanismes initiateurs du processus apoptotique au cours de l'infection par le **VIH-1** (Micoli et al., 2000 ; Sasaki et al., 1996).

L'importance du RE en tant qu'organel capable de réagir à une infection en induisant un processus apoptotique, comme la mitochondrie, n'est pas encore clairement démontré. Toutefois, il semble que certains virus trouvent un intérêt stratégique à contrôler le RE. La caractérisation de la protéine M-T4 du **myxoma virus** qui empêche l'induction de l'apoptose

dans les lymphocytes infectées en interagissant avec le RE (Barry et al., 1997), va dans ce sens.

VII. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

Volontairement dans ce paragraphe, nous ne citerons que quelques exemples de protéines virales et leur implication dans l'apoptose induite par le VIH.

Le syndrome d'immunodéficience associé à l'infection par le **VIH** est caractérisé par la diminution progressive dans le sang du nombre de lymphocytes T exprimant le récepteur CD4. Les lymphocytes T CD4 constituent une population importante du système immunitaire, avec un rôle auxiliaire indispensable au développement d'une immunité cellulaire et humorale en réponse à une infection virale. La réponse initiale induite en réponse à l'infection par le VIH pendant la phase aiguë est généralement intense et met en jeu d'une part, des lymphocytes T CD4 auxiliaires qui produisent des cytokines, régulent la réponse cytotoxique et la production d'anticorps spécifiques du VIH, et d'autre part, des lymphocytes T CD8 cytotoxiques (CTL) qui détruisent les cellules infectées. Toutefois, elle ne permet pas l'élimination du virus ni même le contrôle de sa réplication. Cette incapacité conduit à la destruction des tissus lymphoïdes où sont générés les effecteurs de l'immunité et où a lieu la réponse immunitaire. La disparition régulière de clones lymphocytes T CD4 qui en résulte, donne naissance à un système immunitaire déficient dans sa capacité à reconnaître des antigènes microbiens, avec le développement ultérieur d'infections opportunistes.

L'infection par le VIH de lymphocytes T CD4 conduit rapidement à leur destruction par un processus d'apoptose. Dans les **cellules infectées**, l'apoptose est déclenchée par la liaison de la protéine d'enveloppe du VIH (gp120) au récepteur CD4. Des expériences effectuées en présence d'AZT ont indiqué que l'induction du programme de mort cellulaire programmée nécessite la **réplication du virus**. Par ailleurs, des cellules chroniquement infectées par le VIH peuvent aussi servir d'inducteur d'apoptose *in vitro* dans des **cellules non infectées**. Ce processus est déclenché au cours de la formation de **syncytia**, issus de la fusion entre une cellule infectée exprimant la protéine gp120 et une cellule non infectée exprimant le récepteur CD4.

Le tropisme du VIH-1 pour le lymphocyte T4 et le macrophage est dû à l'affinité de la gp120 pour la protéine CD4, dont la fonction normale est de reconnaître le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, présente à la surface des cellules présentatrices d'antigène, et

que le virus utilise comme récepteur. Récemment identifiés, les **co-récepteurs** CCR5 et CXCR4 coopèrent avec la molécule CD4 pour permettre l'entrée du virus dans la cellule (Barré-Sinoussi, 1997). On sait ainsi que le tropisme préférentiel des virus est largement déterminé selon que les cellules expriment le récepteur CD4 et :

- le co-récepteur **CCR5**, les cellules sont alors infectables par le virus de **tropisme M** (pour monocytes/macrophages) et aussi par les formes virales à double tropisme M et T (pour les lymphocytes T CD4) capables d'utiliser les deux co-récepteurs CCR5 et CXCR4.
- le co-récepteur **CXCR4**, les cellules sont infectables par les seuls virus à **tropisme T**.

Cette notion d'utilisation préférentielle de co-récepteurs cellulaires est liée à la diversité des formes virales qui coexistent chez un individu infecté.

Il a été décrit par des auteurs des possibilités d'infection de cellules ne passant pas par la fixation au CD4 (Harouse et al., 1989). La gp120 a en effet la propriété de se fixer sur **d'autres récepteurs**. On a ainsi décrit sa fixation sur le récepteur nicotinique (Bhat et al., 1992 ; Bracci et al., 1992) ; le galactosyl céramide (GalC), un glycosphingolipide retrouvé sur la surface des oligodendrocytes (Esiri et al., 1991 ; Bhat et al., 1992)...

VII.1. Les protéines du VIH autres que gp120 qui ont des effets pro-apoptotiques

La protéine trans-activatrice **Tat** est un des produits des gènes précoces du VIH : elle sensibilise certains types cellulaires à la mort apoptotique en interagissant avec les voies du Fas ou TNF- α (Bartz & Emerman, 1999 ; Westendorp et al., 1995). Elle augmente la sensibilité à l'apoptose *via* Fas en sur-régulant la caspase-8 (Bartz & Emerman, 1999). La forme sécrétée de la protéine Tat est capable d'induire l'apoptose des cellules non-infectées (Westendorp et al., 1995). Ce phénomène de déplétion cellulaire médiée par Tat contribue en partie à l'immunodéficience liée à l'infection par le VIH-1. La conséquence de cet excès d'apoptose prématurée est la destruction des effecteurs antiviraux, et notamment les lymphocytes T « helper » producteurs de cytokines de type I (IL2, IFN γ), essentiels au maintien d'une réponse cytotoxique CD8 antivirale. De plus, Tat induirait la production de ROI («Reactive Oxygen Intermediates») : intermédiaires réactifs de l'oxygène), l'activation de caspases, et l'activation du NF- κ B, de AP-1, et de JNK sous dépendance de p56^{lck} (Manna & Aggarwal, 2000). Ces auteurs suggèrent que la liaison du VIH au récepteur CD4 active la protéine p56^{lck} et d'autres événements de signalisation qui préparent la cellule pour la

production de virions VIH (dans le cas de l'activation de NF- κ B), mais aussi qui induisent l'apoptose. Tat diminuerait également l'expression de Bcl-2, une protéine cellulaire anti-apoptotique. En outre, la protéase du VIH cliverait Bcl-2 (Strack et al., 1996 ; Korant et al., 1998).

Des études *in vitro* ont montré que les cellules infectées par le VIH sont plus sensibles à l'apoptose induite par Fas (Casella et al., 1999). Les auteurs ont montré que l'augmentation de sensibilité des cellules infectées par le VIH à la voie Fas est associée au produit du gène **vpu** du VIH.

D'autre part, il a été montré que **Nef**, une autre protéine virale, augmente l'expression à la fois de Fas et de FasL, à la surface des cellules, et que la capacité de Nef à interagir avec des kinases cellulaires était requise pour l'augmentation de ces expressions et pour l'apoptose (Zauli et al., 1999).

Enfin, une des protéines accessoires du VIH, **Vpr**, induit aussi l'apoptose de cellules T non infectées. En effet l'ajout de protéine synthétique Vpr sur des cellules T intactes, provoque une chute rapide du potentiel mitochondrial membranaire, ainsi que la libération du cytochrome c et une apoptose cellulaire (Jacotot et al., 2000). Ces données sont accord avec celles de Macho et coll. qui ont montré que les cellules T provenant d'individus VIH⁺ avaient des mitochondries non fonctionnelles, un potentiel mitochondrial membranaire réduit et une production accrue d'anion superoxyde (Macho et al. 1995). Une autre fonction de Vpr est l'arrêt du cycle cellulaire aussi bien dans les cellules infectées que dans les cellules non-infectées (Poon et al., 1998). La protéine Vpr bloque les cellules en phase G2 du cycle cellulaire en inhibant l'activation de la protéine p34^{cdc2} ou cycline B dont l'activité est critique pour l'entrée en mitose (He et al., 1995 ; Re et al., 1995). Dans les cellules exprimant la protéine Vpr, la phosphatase cdc25C qui responsable de l'activation par déphosphorylation de la cycline B, est inactivée, suggérant que la cible de Vpr soit la protéine cdc25C ou un régulateur en amont de cdc25C. L'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 induit par Vpr permet la production d'un plus grand nombre de virions, malgré l'induction de l'apoptose (He et al., 1995 ; Re et al., 1995). De façon intéressante, Nishizawa et coll. ont montré que la partie C-terminal tronquée de Vpr induit l'apoptose par un arrêt du cycle en G1 (Nishizawa et al., 2000). Une autre étude a montré que l'apoptose induite par Vpr nécessitait l'activation des caspases (Stewart et al., 2000). L'ensemble de ces données amène à penser que Vpr puisse réguler un grand nombre de fonctions cellulaires, comme le cycle cellulaire, et induire l'apoptose grâce à des voies de signalisation nombreuses et complexes.

D'autres lentivirus servent de modèle pour des études, plus ou moins approfondies, sur l'apoptose viro-induite. Ainsi, il a été montré que le CAEV (Gendelman et al., 1997), le FIV (Bishop et al., 1993) et le SIV (del Llano et al., 1993) induisent l'apoptose sur des cellules en culture, le SIV étant souvent utilisé à titre de comparaison avec le VIH. Toutefois aucun travaux n'avaient été effectués sur le virus Visna-Maedi.

CHAPITRE III : LE VIRUS VISNA-MAEDI

Le virus Visna-Maedi appartient au genre *Lentivirus* de la famille des *Retroviridae* (Pépin et al., 1998) (Tableau 6). Il est responsable de deux infections contagieuses chez les ovins et les caprins. Les maladies se caractérisent :

- soit par une **pneumopathie interstitielle** d'évolution lente et progressive appelée Maedi qui signifie « dyspnée » en islandais,
- soit par une **encéphalopathie** d'évolution également lente, appelée Visna qui signifie « dépérissement » en islandais (Palsson, 1976).

I. Historique

En 1923, furent décrits pour la première fois les symptômes d'une pneumopathie interstitielle chronique sévère chez des moutons du Montana (USA) qui aboutissaient à l'épuisement puis généralement à la mort des animaux atteints (Marsh, 1923). Près de trente ans plus tard, une nouvelle forme de pneumonie progressive appelée **Maedi** fut identifiée chez des moutons islandais par Sigurdsson (Sigurdsson et al., 1952). On observa également, dans les troupeaux islandais déjà atteints par la maladie Maedi, les signes neurologiques d'une encéphalite chronique caractérisée par une paralysie de l'arrière train et un dépérissement de l'animal. Ces troubles furent nommés **Visna** (Sigurdsson et al., 1957). A la suite d'importantes études épidémiologiques, il apparut que l'émergence des maladies Maedi et Visna, en Islande, ont été la conséquence de l'importation, en 1933, d'une vingtaine de moutons de race Karakul en provenance d'Allemagne, où ces maladies étaient inconnues (Zinck & Johnson, 1994).

Les maladies Maedi et Visna deviennent alors, en Islande le sujet d'études épidémiologique, pathologique et virologique très intenses. Les travaux de Bjorn Sigurdsson, publiés à partir de 1952, montrent que ces deux maladies sont dues à des virus qui, à la différence de virus plus conventionnels, entraînent des pathologies au bout d'une période d'incubation bien plus longue. Cette définition aboutira à une **première classification des lentivirus** et au concept de « **maladies à virus lents** ». Ces maladies se caractérisent en effet par une très longue période d'incubation initiale s'étalant sur plusieurs mois voire plusieurs années, un développement progressif et régulier des signes cliniques évoluant irrémédiablement vers la

Lentivirus	Hôte	Principales Cellules Cibles	Manifestations cliniques
Virus Visna-Maedi VMV	Ovins	monocyte/macrophage	pneumonie, encéphalite, mammite, arthrite
Virus de l'Arthrite Encéphalite Caprine CAEV	Caprins	monocyte/macrophage	pneumonie, encéphalite, mammite, arthrite
Virus de l'Anémie Infectieuse Equine EIAV	Equins	monocyte/macrophage	fièvre, anémie
Virus de l'Immunodéficience Humaine HIV-1, -2	Humains	lymphocytes CD4 ⁺ monocyte/macrophage	déficit immunitaire, encéphalopathie, myélopathie, infections opportunistes (SIDA)
Virus de l'Immunodéficience Simienne SIV-1, -2	Singes	lymphocytes monocyte/macrophage	déficit immunitaire, infections opportunistes
Virus de l'Immunodéficience Féline FIV	Félins	lymphocytes CD4 ⁺ et CD8 ⁺ lymphocytes B monocyte/macrophage	déficit immunitaire, infections opportunistes
Virus de l'Immunodéficience Bovine BIV	Bovins	lymphocytes T lymphocytes B cellules T γ , δ monocyte/macrophage	déficit immunitaire, infection sous cliniques

Tableau 6 : Le genre Lentivirus (Pépin et al., 1998).

mort. Elles ont une spécificité limitée généralement à une seule espèce hôte et un tropisme lié à un organe ou à un système tissulaire. Rétrospectivement il a été montré chez les chevaux que l'anémie infectieuse équine, mise en évidence antérieurement, était due aussi à une infection à lentivirus.

L'épizootie islandaise s'est alors développée avec une telle ampleur et la perte des animaux a été si importante, que l'assainissement de tout le cheptel islandais a été décidé par le gouvernement. L'éradication de la maladie s'est étalée sur dix ans de 1944 à 1954, au cours desquels 650.000 moutons ont été abattus (Palsson, 1978). Par la suite la maladie fut identifiée dans de nombreux autres pays (Bouchard et al., 1980).

La méthode d'éradication de la maladie Visna-Maedi appliquée en Islande au cours de la première moitié du 20^{ème} siècle n'est pas sans rappeler les mesures drastiques prises au début du 21^{ème} siècle pour stopper l'extension de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB). Pendant longtemps le concept des « maladies progressives lentes » est resté étendu à d'autres maladies connues à cette époque comme la Scrapie ou tremblante du mouton. Ce n'est que beaucoup plus tard qu'ont été identifiés deux types d'agents pathogènes différents, d'une part les lentivirus d'autre part les prions.

Le genre *Lentivirus* comprend également les virus **CAEV** chez les caprins (CAEV : «Caprine Arthritis-Encephalitis Virus»), **BIV** chez les bovins (BIV : «Bovine Immunodeficiency Virus»), **FIV** chez les félins (FIV : «Feline Immunodeficiency Virus»), **SIV** chez les singes (SIV : «Simian Immunodeficiency Virus»), **HIV** chez l'Homme (HIV : «Human Immunodeficiency Virus»), et **EIAV** chez les équins (EIAV : «Equine Infectious Anemia Virus») (Tableau 6).

II. Structure et génome du Visna-Maedi

En 1960 le virus Visna a été isolé pour la première fois en culture cellulaire, par SIGURDSSON et ses collaborateurs, à partir d'un cerveau de mouton atteint par la maladie (Sigurdsson et al., 1960). Quelques années plus tard, en 1964, SIGURDARDOTTIR isole un virus d'un poumon ovin atteint par la maladie Maedi (Sigurdardottir & Thormar, 1964).

Les virus Visna et Maedi ne sont en fait qu'**un seul et même virus** qui selon son tropisme différentiel entraîne soit une encéphalopathie progressive démyélinisante (forme Visna) soit une pneumopathie progressive (forme Maedi) (De Boer, 1975 ; Harter et al., 1973).

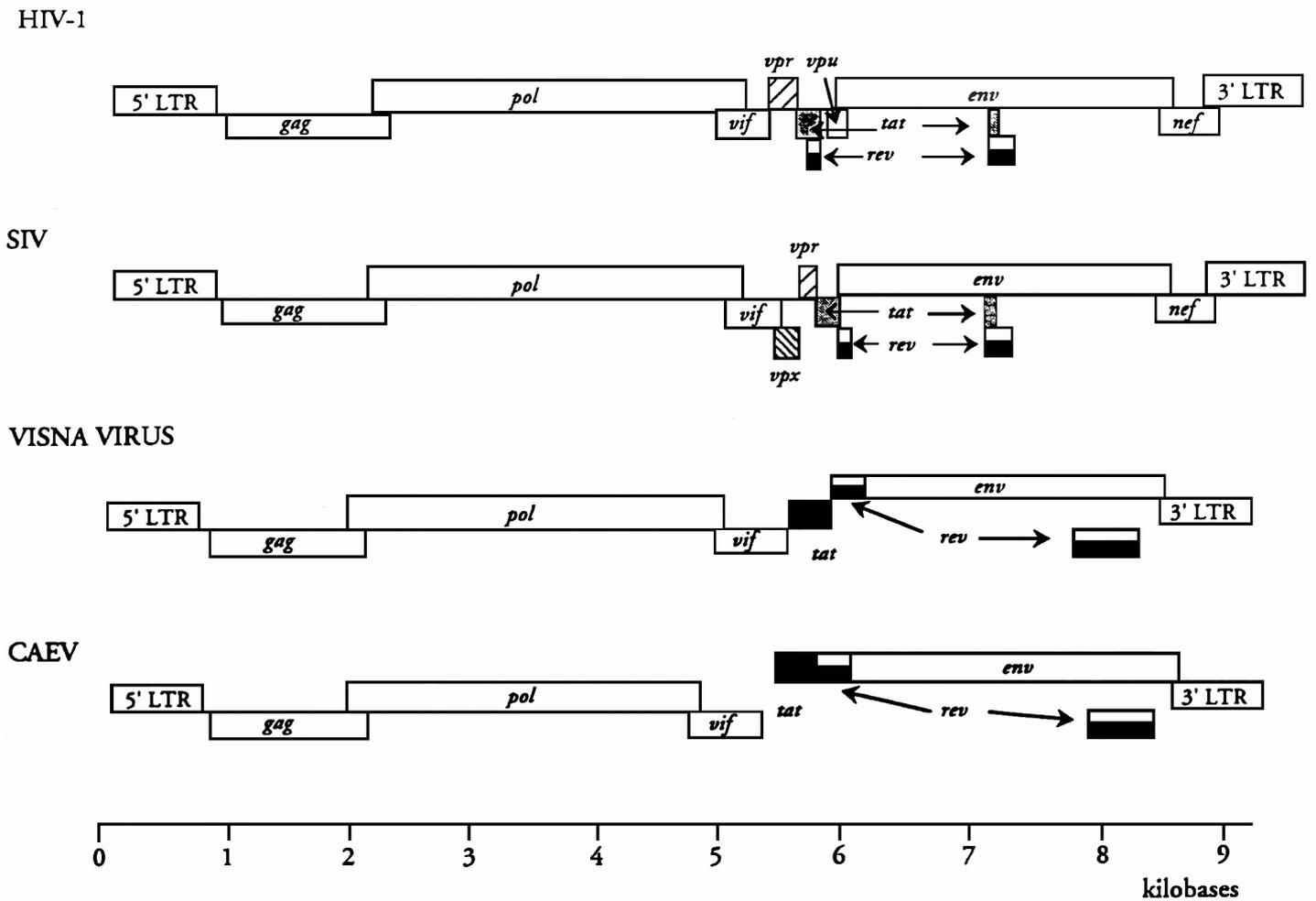


Figure 10 : Organisation génomique de quelques Lentivirus (Clements & Zinck, 1996).

La morphologie du virus Visna-Maedi observé au microscope électronique se présente sous la forme de particules sphériques de 80 à 140 nm de diamètre. En coupes ultra fines, les particules virales sont caractérisées par :

- une **enveloppe externe**, hérissée de spicules (glycoprotéines virales) se projetant vers l'extérieur
- une **membrane interne** qui enveloppe le nucléoïde central (ARN + protéines)
- un **nucléoïde central** ou «core », dense aux électrons, qui a la forme d'un bâtonnet ou d'un cône tronqué chez les lentivirus.

II.1. Le génome (Weiland & Bruns, 1980)

Le virus Visna est constitué de deux molécules d'**ARN simple brin**, de même polarité que les ARNm, soit (+). L'ARN génomique obtenu après extraction et purification a un coefficient de sédimentation compris entre 60 et 70 S.

Cet ARN 60-70 S est constitué de **deux sous-unités de 36 S**, de séquences identiques et de poids moléculaire 3.10^6 daltons, associées par des liaisons non covalentes au niveau des extrémités 5'. L'extrémité **5' est coiffée**. L'extrémité **3' est polyadénylée**. Chaque molécule d'ARN servira de matrice lors de la réplication virale, pour la synthèse de l'**ADN proviral**. Le génome viral sous la forme ADN a une longueur de **9,2 Kb** (Pépin et al., 1998) (Figure 10).

Comme tous les rétrovirus, le génome du virus Visna-Maedi contient les trois séquences majeures : **gag**, **pol** et **env**. A côté de ces gènes essentiels, le génome présente aussi des cadres de lecture supplémentaires, **vif**, **tat** et **rev**, qui régulent l'expression génétique virale, la maturation des ARN et l'infectivité (Pépin et al., 1998) (Figure 10).

Les trois gènes principaux : gag, pol et env codent des précurseurs qui sont ensuite clivés pour donner les protéines structurales et enzymatiques du virus (Tableau 7). Ainsi :

- le gène **gag** (« group-specific antigen ») code pour un précurseur Pr55^{gag} qui sera scindé en trois protéines : p25, p14 et p17 correspondantes aux protéines structurales internes de la nucléocapside.
- le gène **pol** (« polymerase ») code les enzymes virales, essentielles à la réplication et à la maturation : transcriptase inverse, endonucléase / intégrase et protéase.

GENES	PRODUITS	
	PRECURSEURS	PRODUITS FINAUX
gag	Pr55gag	matrice (MA) : p17 capside (CA) : p25 nucléocapside (NC) : p14
pol	Pr gag-pol	reverse transcriptase (RT) intégrase (IN) protéase (PR) Rnase H dUTPase
vif		Vif
tat		Tat
rev		Rev
env	Env : gp160	Glycoprotéine de surface (SU) : gp135 Glycoprotéine transmembranaire (TM) : gp44

Tableau 7 : Produits des gènes du Visna-Maedi (Pépin et al., 1998).

- le gène **env** (« envelope ») constitue un troisième cadre de lecture. Ce gène code une glycoprotéine précurseur gp160 clivée par la protéase virale en deux sous-unités : la glycoprotéine de surface (SU, gp135) et la glycoprotéine transmembranaire (TM, gp44).

A côté de ces cadres majeurs de lecture, le génome du virus Visna-Maedi renferme trois petits gènes, codant pour des protéines régulatrices de la transcription (Pépin et al., 1998) :

- le gène **vif** (« viral infectivity factor ») code une protéine de 29 KDa. Elle est présente chez tous les lentivirus excepté l'EIAV (Camaur & Trono, 1996),
- le gène régulateur **tat** (« trans activator of transcription ») est situé immédiatement après vif. Il est aussi présent chez tous les lentivirus,
- enfin, le gène **rev** (« regulator of virion protein expression ») comprend deux séquences : l'une située en 3' du gène env et l'autre en 5' de ce même gène. Ce gène est également retrouvé chez tous les lentivirus.

A chaque extrémité du génome, on trouve les séquences répétées ou LTR (long terminal repeat). Elles assurent l'initiation en cis de la transcription et l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire. Elles contiennent aussi les signaux nécessaires à la régulation des ARNm et à l'encapsidation des ARN viraux.

A la différence des virus HIV et SIV, le virus Visna, ainsi que le CAEV, ne possède pas les gènes codant les protéines Nef, VpU, VpR ou VpX (Figure 10).

II.2. Protéines et enzymes virales (Narayan & Clements, 1989) (Tableau 7)

II.2.1. Protéines virales

Le virus est constitué de **deux protéines d'enveloppe** :

- une glycoprotéine de surface, **gp135 SU** (de poids moléculaire 135000), qui détermine le tropisme cellulaire du virus. Elle porte les déterminants antigéniques qui seront les cibles des anticorps neutralisants et des cellules T cytotoxiques dans la réponse immunitaire dirigée contre le virus,
- une glycoprotéine transmembranaire, **gp44 TM**, qui participerait au processus de fusion et de pénétration du virus dans la cellule hôte.

La sous-unité TM de la glycoprotéine d'enveloppe du virus est ancrée à la bicouche lipidique. La glycoprotéine SU est liée de façon non covalente à TM. Les glycoprotéines d'enveloppe

des lentivirus ont des fonctions biologiques importantes et contiennent les épitopes responsables à la fois de l'induction d'anticorps neutralisants et de l'interaction des virus avec le ou les récepteur(s) à la surface des cellules hôtes. Ainsi la distinction qui existe entre le virus Visna-Maedi et le CAEV, deux lentivirus très proches de part leur structure et la séquence de leur génome, peut s'expliquer par des épitopes de nature différente contenus dans leur glycoprotéine d'enveloppe respective (Chebloune et al., 1996).

Les **protéines de capsid** sont les protéines de structure codées par le gène gag : p25, p14 et p17. La protéine de **matrice** (MA ou p17) est responsable de l'association du précurseur Pr55^{gag} avec la membrane cellulaire. MA est localisée entre l'enveloppe virale et la protéine de **capsid** (CA ou p25) du virus. CA est la protéine majeure, elle forme le core hydrophobe. CA qui correspond au déterminant antigénique de chaque lentivirus, provoque une forte réponse anticorps, utilisée pour des tests de dépistage. La **nucléoprotéine** (NC ou p14) recouvre le génome ARN viral.

Les autres polypeptides correspondent aux protéines issues des gènes vif, tat et rev. Ils jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'infectiosité du virus et de l'expression génétique virale :

- la protéine **Vif** induit, chez les animaux naturellement infectés, une faible réponse immunitaire qui peut être détectée par Western Blot. L'importance de Vif pour la réplication du virus Visna-Maedi n'est pas clairement déterminée, mais chez le CAEV ou le VIH, il semble que Vif joue un rôle crucial dans les stades tardifs du cycle viral, notamment au cours de la morphogenèse du core (Harmache et al., 1995 ; 1996). Vif serait aussi capable d'augmenter l'infectivité des particules virales, mais cette fonction est dépendante du type cellulaire infecté (Camaur & Trono, 1996).
- **Tat**, une protéine de 10 KDa, induit l'accumulation d'ARNm viraux *via* les sites de liaison AP-1 et AP-4 présents au niveau de la séquence U3 des LTR (Gdovin & Clements, 1992 ; Saltarelli et al., 1993), ou *via* les facteurs cellulaires tels que c-Fos et c-Jun (Neuveut et al., 1993). Récemment, il a été montré que la protéine Tat du virus Visna-Maedi appartient au groupe des protéines Tat caractérisées par un faible potentiel de transactivation. La protéine Tat du virus Visna-Maedi contribuerait elle-même à la pathogenèse virale en induisant des désordres lymphoprolifératifs folliculaires dans de nombreux organes (Hayman et al., 1993 ;

Vellutini et al., 1994). L'action de Tat pourrait être médiée par la stimulation de gènes cellulaires, tels que les gènes de cytokines (Philippon et al., 1994).

- la protéine **Rev**, 19 KDa, joue un rôle majeur dans le transport des ARNm non épissés du noyau vers le cytoplasme (Mazarin et al., 1990). La protéine Rev contient les signaux d'exportation nucléaire qui permettent à la protéine de franchir la membrane nucléaire et d'exercer son rôle de régulateur *via* les éléments de réponse RRE (« *rev responsive element* ») localisés au niveau du gène env. Ainsi il a été montré que les virus mutants *rev*⁻ sont non infectieux (Pépin et al., 1998).

II.2.2. Enzymes virales

Elles sont codées par la polyprotéine précurseur Pr^{gag-pol} (Pépin et al., 1998).

La première enzyme est une ADN polymérase ARN dépendante ou **transcriptase inverse**. Cette enzyme joue un rôle clé dans le cycle de réplication des rétrovirus. Elle transcrit l'ARN en ADN monocaténaire puis bicaténaire, formant ainsi le provirus, susceptible de s'intégrer dans le génome de la cellule hôte. Les propriétés de cette enzyme font du virus Visna-Maedi un lentivirus typique : son activité dépend strictement de la présence dans le milieu d'un cation métallique divalent, avec une nette supériorité de l'ion Mg²⁺ par rapport à l'ion Mn²⁺, ce dernier étant nécessaire à l'activité de certains oncovirus. La transcriptase inverse a aussi une **activité RNase H** qui élimine l'ARN matrice.

La deuxième enzyme possède une activité **endonucléase / intégrase**. Elle est capable d'introduire des coupures sur la chaîne d'ADN circulaire et participe également au mécanisme d'intégration du génome viral avec celui de la cellule hôte.

La troisième enzyme est une **protéase** : son activité protéolytique est essentielle pour la maturation des virions infectieux. Elle est responsable du clivage des polyprotéines précurseurs gag-pol et Pr55^{gag} en enzymes virales et protéines de structure. La protéase virale par sa structure tridimensionnelle, ressemble aux protéases cellulaires à acide aspartique.

Enfin, la dernière enzyme est une **dUTPase** que l'on ne retrouve pas chez lentivirus de primates (Pépin et al., 1998). Cette enzyme semble diminuer la fréquence des mutations G→A. Cependant une souche de virus Visna-Maedi déficiente en dUTPase semble être tout aussi pathogène *in vivo* que la souche sauvage (Petursson et al., 1998).

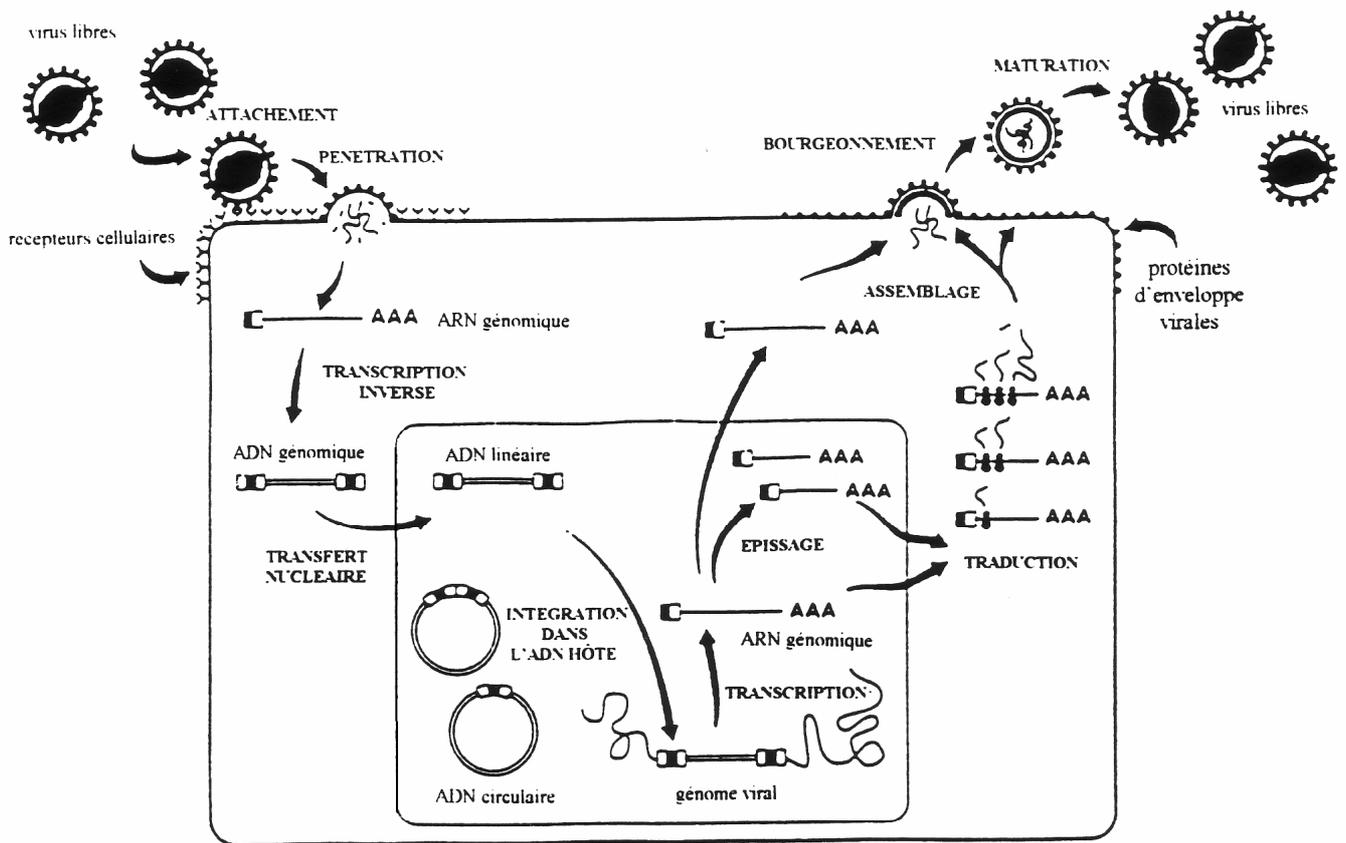


Figure 11 : Cycle de réplication des Lentivirus (Gonda & Oberste, 1992).

III. Tropisme cellulaire et cycle de réplication (Zinck & Johnson, 1994 ; Clements et al., 1994)

Les cellules cibles du virus Visna-Maedi sont essentiellement les cellules de la lignée **monocytes / macrophages**. Au départ, seuls quelques monocytes et promonocytes issus de la moelle sont infectés ; la réplication virale est limitée et le virus reste sous la forme d'ADN proviral. Au cours de la maturation et de la différenciation des monocytes en macrophages, la sensibilité à l'infection est augmentée par augmentation du nombre de récepteurs viraux et la production de certains facteurs cellulaires stimulent la transcription virale.

Certaines cellules du système nerveux central sont également la cible du VMV : les **cellules épithéliales** et les **fibroblastes de plexus choroïde (PC)**, ainsi que les **astrocytes** et les **oligodendrocytes** de la substance gliale. Cependant, s'il est clairement établi aujourd'hui que la principale cible du lentivirus ovin est bien la lignée monocyttaire, d'**autres cellules** peuvent également être infectées *in vivo*, comme des lymphocytes. Le pourcentage de lymphocytes infectés reste malgré tout assez faible et la réplication virale au sein de ces cellules semble non productive. *In vitro* le cycle de réplication du virus Visna-Maedi a surtout été étudié sur cellules de plexus choroïde de mouton.

Ce cycle présente les mêmes phases de réplication que les lentivirus et en particulier le HIV (Gonda & Oberste, 1992) (Figure 11). Il se divise en trois grandes étapes :

- une phase de reconnaissance, de fixation et de pénétration
- une phase d'éclipse,
- une phase de production virale.

Le virus Visna-Maedi reconnaît des récepteurs spécifiques à la surface de la cellule cible, se fixe à la surface de cette cellule par interaction entre sa glycoprotéine d'enveloppe gp135 et le récepteur cellulaire. Puis, après fusion, le virus pénètre dans la cellule par un phénomène de pinocytose : sa capsid est dégradée, libérant ainsi le nucléoïde dans le cytoplasme.

Le ou les récepteurs d'entrée du virus dans ces cellules étaient jusqu'alors inconnus. Cependant, la capacité du virus à se répliquer dans une large gamme de cellules suggère qu'il utilise, soit une molécule très commune, soit différents récepteurs. Récemment, l'équipe de J.E. Clements (Bruett et al., 2000 ; Barber et al., 2000) a identifié un récepteur cellulaire du virus Visna-Maedi.

Lors de la **phase d'éclipse**, au niveau du cytoplasme, après décapsidation, l'ARN parental est **rétro-transcrit** en ADN grâce à l'ADN polymérase ARN dépendante. Il y a formation d'un hybride ARN-ADN qui sert de modèle à la synthèse d'un ADN bicaténaire, transporté dans le noyau. Cet ADN linéaire va alors s'**intégrer** au génome de la cellule hôte par l'intermédiaire de son endonucléase : l'ADN cellulaire est transmis aux cellules filles, permettant ainsi la propagation du virus à l'abri des défenses de l'hôte. On parle alors de **provirus** et cette phase de latence peut se poursuivre jusqu'à ce que des facteurs extérieurs ou des signaux physiologiques induisent la reprise de la transcription.

A la faveur d'une activation, la transcription peut commencer, donnant d'une part un ARN viral monocaténaire et d'autre part des ARNm qui, liés aux polyribosomes cytoplasmiques, seront traduits en différentes protéines virales.

La dernière étape est la phase de **production virale**. A la fin de la synthèse protéique, les différents constituants viraux s'assemblent avec des molécules d'ARN génomique. L'ensemble migre vers la membrane cytoplasmique, et le virion est expulsé par bourgeonnement, hors de la cellule où il va subir des processus de maturation (Figure 11).

IV. La maladie

Sur le plan clinique, trois caractéristiques de la maladie sont essentielles :

- **l'incubation est très longue** ; les signes cliniques ne se manifestent pas chez l'animal très jeune et pas avant l'âge de 2 ou 3 ans. La maladie Maedi a une période d'incubation comprise entre 2 à 5 ans, la maladie Visna de 9 mois à 5 ans,
- parmi les animaux infectés, **peu développent des signes cliniques**,
- les animaux qui extériorisent la maladie évoluent **inexorablement vers la mort**.

Dans la **forme Maedi** (Zinck & Johnson, 1994 ; Savey et al., 1982 ; Pekelder et al., 1994), les premiers signes sont d'abord discrets et peu évocateurs. L'éleveur constate une altération de l'état général, l'animal manque de vigueur et il présente une toison en mauvais état. Apparaît ensuite une **gêne respiratoire** à l'effort ; la fréquence respiratoire est anormalement élevée et l'évolution se fait progressivement vers une **polypnée permanente**, observée même au repos. Cette évolution est apyrétique. Le jetage est absent et la toux sèche inconstante. Malgré un

bon appétit, l'animal devenu **cachectique** ne se lève plus et succombe en **anoxie**, généralement à la suite de surinfections bactériennes ou parasitaires.

La phase clinique peut durer plusieurs mois, parfois plus d'une année. L'évolution fatale est notablement accélérée en cas de gestation, d'allaitement ou de maladies intercurrentes microbiennes ou parasitaires.

Une lymphocytose est surtout décelée au début de la maladie ; à l'autopsie le volume et le poids des poumons est multiplié par 2 ou 3. Les ganglions lymphatiques trachéo-bronchiques et médiastinaux sont hypertrophiés et œdémateux. L'examen histologique révèle une pneumopathie interstitielle avec hyperplasie lymphoïde péribronchique et périvasculaire.

La **forme Visna** (Pépin et al., 1998) est définie comme une leucoencéphalomyélite enzootique ovine, maladie démyélinisante lente, à évolution toujours fatale. Comme pour la forme Maedi, on note au départ une altération de l'état général. Le mouton traîne à l'arrière du troupeau et tombe parfois sans raison au début. Une **anomalie de la démarche** s'observe au niveau du train postérieur, lorsque l'animal est amené à trotter. La parésie des muscles postérieurs évolue lentement vers la paraplégie et l'animal perd du poids. On observe parfois un **tremblement au niveau des lèvres** et des muscles faciaux, et les mammites sont des complications observées quelquefois chez les brebis. La parésie progresse lentement vers une **paralysie complète**. L'état général de l'animal se détériore inéluctablement. L'évolution clinique, là aussi apyrétique, dure quelques semaines à plus d'un an. La mort survient après une période de coma. Le LCR présente une pléiocytose mononuclée.

Les lésions histologiques sont celles d'une **réaction inflammatoire** puis plus tardivement d'une **démyélinisation** et d'une **destruction de la substance blanche** dans le cerveau, le cervelet et la moelle épinière.

Il n'existe pour le moment **aucun traitement spécifique de ces deux maladies**. Plusieurs études *in vitro* ayant pour but de cribler un certain nombre de molécules pouvant présenter une activité antirétrovirale ont été réalisées. Cependant, si ces travaux font l'objet de recherches et si des activités antirétrovirales potentielles sont testées sur des lentivirus animaux, et notamment sur le virus Visna-Maedi, c'est avant tout en vue d'une **application au traitement du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA)** humain induit par le VIH.

La prophylaxie médicale est pour l'instant inexistante. Les tentatives de vaccination menées jusqu'ici ont échoué. Les seules mesures prophylactiques prises sont l'éradication des animaux, à l'exportation, séropositifs en immunodiffusion ou ELISA.

PARTIE EXPERIMENTALE

MATERIELS ET METHODES

I. Culture cellulaire

Les cellules utilisées comme support pour la culture du virus Visna-Maedi sont des **cellules primaires** ; elles sont issues de **plexus choroïde (PC)** prélevés sur de jeunes ovins de moins de 2 ans, provenant de l'abattoir de Limoges. Les cultures primaires sont obtenues à partir de la technique des explants de PC de mouton. Elle est très proche de celle que Sigurdsson a décrite pour isoler le virus (Sigurdsson et al., 1960). Les cellules de PC se présentent sous la forme de membranes richement vascularisées situées au niveau des deux ventricules cérébraux. Ceux ci sont récupérés à la pince et mis en suspension dans une boîte de pétri contenant du milieu de culture sans sérum de veau fœtal (SVF, Gibco-BRL), additionné d'antibiotiques (100 UI/mL de pénicilline, et 0,2 mg/mL de streptomycine).

Le **milieu de culture** est le DMEM, milieu nutritif de base, reconstitué à partir des produits suivants :

MEM (Sigma)	9,6 g
Eau distillée	890 mL
HEPES (Sigma)	4,76 g
Bicarbonate de Sodium (Sigma)	1 g
Acides aminés non essentiels (Sigma)	10 mL

La solution obtenue, ajustée à pH 7,4, est filtrée stérilement (Sterivex-GV, Millipore) puis répartie dans des flacons stériles. Le pH de la préparation finale est de 7,2 et le DMEM est conservé au réfrigérateur à +4°C.

Les plexus choroïdes sont découpés en petits fragments et lavés plusieurs fois dans le milieu. Les explants ainsi obtenus, sont disposés à raison d'une dizaine dans des flasques de culture de 25 cm² (Corning). Dans chacune des flasques on a préalablement introduit 200µL de plasma de poulet (Sigma) réhydraté avec de l'eau distillée stérile. Les flasques sont placées à l'étuve à 37°C pendant 1 heure, puis on ajoute 5 mL de milieu de culture à 20% de SVF, additionné d'antibiotiques. Les cellules de PC sont mises à incuber à 37°C, sous 5% de CO₂ en atmosphère humide (l'étuve Jouan IG150).

Au bout de 4 à 5 jours, les cellules fibroblastiques commencent à se développer à partir des extrémités de chaque explant, adhèrent et prolifèrent sur la paroi du flacon.

Une semaine après l'explantation, le milieu de culture est remplacé par du milieu de culture à 10% de SVF additionné d'antibiotiques. L'obtention d'un tapis cellulaire à confluence

nécessite environ 15 jours d'incubation au total à 37°C. A confluence les cellules subissent l'inhibition de contact, elles ne se multiplient plus.

Les cellules fibroblastiques de PC, sont des cellules adhérentes, qui s'étalent en monocouche sur la paroi du flacon de culture. Lorsque les cellules sont à confluence elles sont trypsinées et repiquées dans de nouvelles flasques de culture ou tout autre support (microplaques, Slideflask...).

Après avoir retiré le milieu de culture, les cellules sont rincées une première fois avec du PBS (« phosphate buffer saline »), puis une deuxième fois avec de la trypsine (solution saline de trypsine à 0,05% (p/v) et d'EDTA disodique à 0,02%, Sigma). Ensuite, 1 mL de trypsine/EDTA est ajouté sur les cellules ; la flasque est placée à l'étuve pour environ 5 mn. Lorsque le tapis cellulaire est détaché, on ajoute 5 mL de milieu de culture, et les cellules sont dispersées par flux et reflux successifs. A ce stade les cellules sont dénombrées sur cellule de Malassez (Preciss). La suspension est alors ajustée à la concentration cellulaire désirée.

Le repiquage se fait en moyenne tous les 4 jours. Les cellules de PC peuvent en théorie subir une vingtaine de passage, mais ce nombre peut varier en fonction des lots cellulaires. Pour que les conditions de viabilité cellulaires soient maximales, nous nous limitons au maximum à 10 générations de sous-culture parce qu'en vieillissant les cellules sont moins résistantes.

A la troisième sous-culture, les **cellules peuvent être congelées** et constituent une réserve de cellules primaires. Les cellules, sont mises en suspension dans du milieu de culture contenant 10% de SVF et 10% de DMSO. La concentration cellulaire doit être de 1 à $1,5 \cdot 10^6$ cellules/mL. Cette suspension cellulaire est ensuite répartie dans des cryotubes (environ 1,5 mL par tube). Ceux-ci sont alors placés à -80°C dans un récipient permettant une chute de température progressive, avant d'être conservés dans l'azote liquide.

La suspension cellulaire est **décongelée rapidement** au bain-marie, puis mise en culture dans des flasques de 25 cm² de surface (ou 2 cryotubes pour une flasque de 75 cm²). Un volume adéquat de **milieu standard** (milieu de culture à 10% de SVF) est ajouté. Le milieu de culture est changé 12 h plus tard afin d'éliminer les cellules mortes et le DMSO potentiellement cytotoxique.

II. Le virus Visna et son titrage

Au cours de nos expériences nous avons utilisé une souche virale : la souche Visna K1514 (Laboratoire Pourquier, Montpellier, France) souche de référence isolée par Sigurdsson (Sigurdsson et al., 1960) et séquencée par Sonigo (Sonigo et al., 1985). Cette souche est

conservée au congélateur à -80°C , sous forme d'aliquots de surnageants de cultures cellulaires infectées. Les virus contenus dans le surnageant des cultures cellulaires infectées servent d'inoculum pour infecter de nouvelles cultures cellulaires et pour le titrage de la souche virale.

La **constitution d'un pool viral** se fait à partir d'une culture cellulaire présentant un tapis à 80% de confluence. Dans un premier temps, le milieu de culture est retiré, puis le flacon de culture est rincé avec du DMEM afin d'éliminer toute trace de sérum de veau fœtal qui inhibe le développement du virus. On inocule alors 2 mL de surnageant de culture infectée sur le tapis cellulaire, pour un flacon de 75 cm^2 de surface. Après 1 h d'incubation à $+37^{\circ}\text{C}$, le surnageant est retiré et remplacé par 10 mL de **milieu de survie** c'est à dire le milieu de base additionné de 2% de SVF. Le flacon de culture est replacé à l'étuve jusqu'à l'apparition des premiers effets cytopathologiques (ECP). Le surnageant est alors récolté, et remplacé par un volume égal de milieu de survie. Le flacon de culture est à nouveau replacé à l'étuve. Cette opération est répétée toutes les 24 h jusqu'à épuisement du tapis cellulaire. A chaque recueil, les surnageants sont centrifugés pendant 10 mn, à 2000 g et $+4^{\circ}\text{C}$ (Jouan CR312). Ainsi débarrassé des débris cellulaires en suspension les surnageants sont congelés à -80°C .

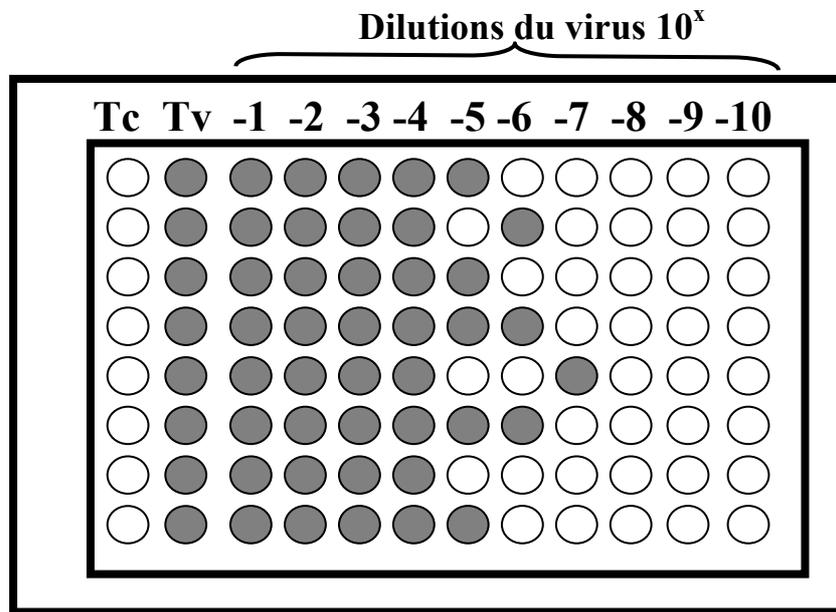
Déterminer le **titre infectieux** d'une suspension virale signifie dénombrer, par unité de volume, les particules virales capables d'infecter des cellules permissives. Le virus est titré selon la micro méthode du laboratoire (Larroutou, 1993), basée sur l'apparition des effets cytopathologiques caractéristiques du virus Visna-Maedi (formation de syncytia et lyse cellulaire).

Après trypsination d'un tapis cellulaire à confluence, les cellules sont dénombrées sur cellule de Malassez ; la suspension cellulaire est ajustée à 2.10^5 cellules/mL avec du DMEM à 5% de SVF. 50 μL de la suspension cellulaire finale sont distribués dans les cupules d'une plaque 96 puits à fond plat (Nunc). Par ailleurs 50 μL de dix séries de dilution décimale, préparées à partir de la suspension virale initiale, sont distribués dans une colonne de 8 cupules, contenant déjà les cellules. Deux colonnes de 8 puits sont réservées : l'une au « témoin cellule » (cellules non infectées additionnées de 50 μL de milieu DMEM avec 5% de SVF), l'autre au « témoin virus » (cellules infectées par 50 μL de suspension virale non diluée).

La plaque 96 puits est alors incubée 6 jours à 37°C .

Ensuite, les différents surnageants sont éliminés sans décoller les cellules, qui sont observées après coloration au May-Grünwald Giemsa (MGG).

Après coloration la plaque est observée au microscope inversé (Nikon). Le nombre de cupules positives (+) c'est à dire présentant une lyse cellulaire ou au moins un syncytium, est évalué, en prenant comme référence négative le témoin cellule.



○ **Cupule Négative** ● **Cupule Positive**
Tc : Témoin Cellule **Tv : Témoin Virus**

Le **titre infectieux** du virus est ensuite calculé selon la méthode de **Reed & Muench** (1938). Il est exprimé en dose infectant à 50% les cellules en culture (DICC₅₀ ou « CCID₅₀ ») par millilitre. Cette DICC₅₀ est calculée selon une formule statistique, après avoir déterminé les dilutions encadrant le point d'infection 50% :

$$DICC_{50} = 10^{-(\text{Dilution supérieure à 50\%} + X)}$$

où

$$X = \frac{\% \text{ Dilution supérieure à 50\%} - 50\%}{\% \text{ Dilution supérieure à 50\%} - \% \text{ Dilution inférieure à 50\%}}$$

A partir d'un calcul de DICC₅₀ on déterminera la multiplicité d'infection (MOI) en fonction du nombre de cellules utilisées. Toutes les infections, *in vitro*, par le virus Visna seront réalisées avec une MOI = 0,1.

III. Induction de l'apoptose sur les cellules de PC

III.1. Réactifs :

- Tampon de rinçage PBS « phosphate buffer saline »,

NaCl (Prolabo)	40 g
KCl (Prolabo)	1 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O (Prolabo)	14,5 g
KH ₂ PO ₄ (Prolabo)	1 g
H ₂ O distillée	qsp 5L

ajusté à pH 7.4, stérilisé à l'autoclave et conservé à +4°C,

- Solution de fixation au paraformaldéhyde (PAF, Sigma) à 4% (p/v) dans du PBS en chauffant (100°C). La solution est conservée à +4°C pour utilisation immédiate ou stockée à -20°C,
- DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole, Sigma) 1 mg/mL dans du DMSO, conservé à l'obscurité,
- Gélatine/Glycérol (Sigma) portée extemporanément à fusion avant utilisation.

III.2. Nature des différents stress :

- Privation en sérum de veau fœtal,
- Dexaméthasone (Sigma), solution mère à 10⁻³ M dans l'éthanol,
- Tamoxifène (Sigma), solution mère à 10⁻³ M dans du DMSO,
- Cycloheximide (Sigma), solution mère à 10⁻³ M dans l'éthanol,
- Génistéine (Sigma), solution mère à 10⁻³ M dans l'éthanol,
- Camptothécine (Sigma), solution mère à 10⁻² M dans du DMSO,
- Staurosporine (Sigma), solution mère à 10⁻² M dans le méthanol,
- Irradiation Gamma (Source Cobalt 60, débit de dose : 800 gray/heure).

III.3. Mode opératoire :

Les cellules sontensemencées à une densité de 2,5-3.10⁵ cellules/cm². Pour les drogues et la privation en sérum, les cellules sont cultivées en « plaques 6 puits » (Nunc). Au bout de 24 h

d'adhésion, les cellules sont privées en sérum ou traitées avec les différentes drogues selon une gamme de concentration de 10^{-5} à 10^{-9} M final.

Pour l'irradiation gamma, les cellules sontensemencées sur des supports Slideflask (Nunc).

Au bout de 4 jours d'adhésion, les cellules sont irradiées suivant une gamme de 1 à 20 Gray.

Après traitement, les colorations au DAPI sont effectuées toutes les 6 h pendant 6 jours. La technique de coloration au DAPI est décrite ci-après.

IV. Analyse des modifications nucléaires apoptotiques

IV.1. Marquage nucléaire par le DAPI :

IV.1.1. Réactifs :

- PBS,
- PAF 4%,
- DAPI,
- Gélatine/Glycérol.

IV.1.2 Mode opératoire :

Le DAPI est un agent spécifique intercalant de l'ADN au niveau des bases A=T. Il est couramment utilisé pour l'observation des noyaux de cellules en apoptose.

Les cellules sontensemencées, puis infectées ou traitées à la staurosporine (1 μ M final). A différents temps, les surnageants sont prélevés et les cellules sont fixées au PAF 4% pendant 30 mn à température ambiante.

Les cellules sont ensuite lavées puis colorées avec une solution de DAPI à 0,5 μ g/mL, pendant 1 mn à température ambiante.

Après lavage, les lames sont séchées puis montées avec de la gélatine/glycérol. L'observation s'effectue au microscope à fluorescence (Microscope Leica). Les noyaux présentent une fluorescence bleue (BP 340-380 nm). Les photos sont réalisées au grossissement x200 ou x400 sur une pellicule de 200 ASA.

IV.2. Technique TUNEL

IV.2.1 Réactifs :

- PBS,

- PAF 4%,
- Kit « *In situ* Cell Death Detection Kit, POD » (Roche Molecular Biochemicals), conservé à -20°C . Il est constitué :
 - d'une solution enzymatique (TdT)
 - d'une solution de marquage (FITC-dUTP)
 - du convertisseur (l'anticorps anti-FITC couplé à la peroxydase), prêt à l'emploi,
- Solution de blocage des peroxydases endogènes à 0,3% (v/v) à partir d'une solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), dans du PBS, conservée à -20°C ,
- Tampon citrate est préparé à 0,1% (p/v) dans du PBS,
- Solution détergente de Triton-X100 (Sigma) à 0,1% (v/v) dans du tampon citrate à 0,1%,
- DAB (« Sigma Fast 3,3'-diamidinobenzidine tablet sets », Sigma), substrat de la peroxydase conservé à -20°C , préparé extemporanément dans de l'eau distillée stérile,
- Gélatine/Glycérol.

IV.2.2 Mode opératoire :

La technique TUNEL (« TdT-mediated dUTP-X nick end labelling ») est réalisée avec un kit qui permet « la détection et la quantification de l'apoptose au niveau cellulaire » (Roche Molecular Biochemicals). Au cours de ce test nous utilisons l'enzyme TdT (« Terminal deoxynucleotidyl transferase ») qui va marquer spécifiquement les extrémités 3'-OH générées lors de la fragmentation de l'ADN. En fait, la TdT rajoute à ces extrémités des nucléotides dUTP couplés à la fluorescéine (fluorescéine-dUTP).

Les cellules sont infectées aux même temps que ceux utilisés pour le marquage DAPI et fixées au PAF.

Après lavage, elles sont immergées dans une solution à 0,3% de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) 30 mn à température ambiante pour bloquer les peroxydases endogènes.

Les membranes cellulaires sont ensuite perméabilisées à l'aide d'une solution détergente de Triton X-100, pendant 2 mn sur de la glace.

Les cellules sont lavées, puis incubées avec 50 μL de mélange réactionnel contenant l'enzyme (TdT, 1 volume) et les marqueurs dUTP-FITC (9 volumes), pendant 60 mn à 37°C . Après lavage, les lames sont montées avec de la gélatine/glycérol.

L'observation et les photos des lames se font au microscope à fluorescence. Les noyaux présentent une fluorescence verte (BP 450-490 nm).

Le kit permet aussi de visualiser la fragmentation chromatinienne, en microscopie photonique : la sensibilité du marquage FITC est amplifiée en utilisant un anti-corps «convertisseur» dirigé contre la FITC et couplé à la peroxydase (HRP, « Horse Radish Peroxydase »). Après le marquage, les cellules sont lavées, puis incubées avec l'anticorps couplé à la peroxydase, dirigé contre le fluorochrome FITC, pendant 30 mn à 37°C. Après rinçage, une nouvelle incubation est réalisée avec un substrat de la peroxydase : la 3,3'-diamidinobenzidine (DAB, Sigma) à température ambiante. Les lames sont lavées, séchées puis montées. Les noyaux apparaissent colorés en marron foncé.

IV.3. Technique de double marquage DAPI/TUNEL

IV.3.1. Réactifs :

- PBS,
- PAF 4%,
- Kit « *In situ* Cell Death Detection Kit, POD » (Roche Molecular Biochemicals),
- Solution de blocage des peroxydases endogènes à 0,3% (v/v) H₂O₂,
- Solution détergente à 0,1% Triton-X100 dans 0,1% citrate,
- DAPI,
- Gélatine/Glycérol.

IV.3.2 Mode opératoire :

Pour réaliser ce double marquage il est nécessaire d'effectuer en premier le marquage TUNEL, puis en second la coloration DAPI. De plus, il faut arrêter la technique TUNEL à l'étape du marquage enzymatique avec la TdT, et ne pas réaliser l'étape de conversion du signal avec l'anticorps couplé à la peroxydase. La coloration avec le substrat DAB masque tout marquage ultérieur en fluorescence.

Le protocole reprend les mêmes étapes décrites précédemment. L'observation s'effectue au microscope à fluorescence, en utilisant successivement le filtre pour le marquage FITC puis le filtre pour le DAPI. Nous prenons la précaution de ne pas changer le champ d'observation.

IV.4. Migration électrophorétique sur gel d'agarose

IV.4.1. Réactifs :

- PBS,
- Tris-HCl (Sigma) à 1 M, pH 8,
- EDTA.2H₂O (Sigma) à 0,5 M, pH 8,
- SDS (Sigma) à 10%, pH 7,2 (chauffer à 68°C pendant quelques minutes pour favoriser la dissolution),
- NaCl (Sigma) à 6 M,
- Protéinase K (50 unités /mL Roche Molecular Biochemical), à 20 mg /mL, conservée à -20°C,
- Tampon de lyse :
 - 50 mM dans Tris-HCl
 - 0,1 M dans EDTA.2H₂O
 - 0,5% SDS
 - 50 mM NaCl,
- Acétate de sodium.3H₂O (Sigma) à 3 M, pH 5,2 ajusté avec de l'acide acétique (Sigma) « glacial »,
- RNase A (20 unités /mL, Roche Molecular Biochemical), à 10 mg/mL dans de l'acétate de sodium à 0,01 M, pH 5,2. L'enzyme est chauffée à 100°C pendant 15 mn, puis refroidie à température ambiante. Le pH est ajusté à pH 7,4 en ajoutant 0,1 volume de tampon Tris-HCl 1M. L'enzyme est aliquotée et conservée à -20°C,
- Phénol (Sigma),
- Chloroforme (Sigma),
- Isopropanol (Sigma),
- Acétate d'ammonium (Sigma) à 10 M. La solution est stérilisée par filtration (Sartorius Minisart NML),
- Ethanol 70%,
- TBE 10X (Sigma) dilué à 0,5X,
- Agarose (Roche Molecular Biochemicals),
- Tampon de charge (Sigma),
- BET (Sigma) 10 mg/mL.

IV.4.2. Mode opératoire :

Les cellules sont ensemencées et infectées dans des flacons de culture de 150 cm² (Nunc) ou traitées à la staurosporine. A différents temps d'incubation, les cellules sont trypsinées, puis centrifugées à 1000 g, pendant 15 mn, à 4°C. Le surnageant est éliminé.

Lyse des cellules :

- sur les culots sont ajoutés directement 500 µL de tampon de lyse,
- les tubes sont agités,
- on ajoute la protéinase K (0,5 unités enzymatiques/mL, final),
- après agitation les tubes sont placés au bain-marie une nuit sous agitation à 50°C.

Extraction de l'acide nucléique :

- après une nuit, on ajoute directement sur les lysats 1 volume de phénol (v/v),
- les tubes sont agités, puis centrifugés 5 mn à 20000 g 4°C,
- la phase aqueuse supérieure est récupérée dans un tube propre et on ajoute un volume de chloroforme,
- après centrifugation, la phase aqueuse supérieure est récupérée.

Précipitation de l'acide nucléique :

- sur la phase aqueuse on ajoute 1 volume d'isopropanol glacial et 1/10 volume d'acétate d'ammonium,
- les tubes sont placés à -20°C pour la nuit,
- après agitation par retournement on centrifuge 15 mn à 20000g à +4°C.

Préparation de l'acide nucléique :

- les culots sont resuspendus dans 500 µL d'éthanol à 70% et agités,
- ils sont centrifugés 10 mn à 20000 g à +4°C,
- le surnageant est éliminé et les tubes sont recentrifugés 2 mn à 20000g à +4°C,
- le surnageant est retiré avec précaution, et on ajoute 10 µL de tampon Tris-EDTA et 5 µL de RNaseA (4 unités enzymatiques /mL) sur les culots,
- les tubes sont placés au bain-marie pendant 1 h à 50°C, sous agitation, puis 1 h à 68°C,
- les tubes sont placés une nuit à +4°C.

Dépôt de l'acide nucléique :

- après une nuit, les lysats sont dosés en spectrométrie U.V. à 260 et 280 nm,
- pour vérifier si la technique d'extraction est correcte il faut effectuer le calcul suivant :

$$\lambda_1 / \lambda_2 \geq 1,75$$

λ_1 : absorbance de l'échantillon à 260 nm (longueur d'onde de l'ADN)

λ_2 : absorbance de l'échantillon à 280 nm (longueur d'onde de l'ARN)

- la quantité d'ADN est calculée de la façon suivante :

$$Q = \lambda_1 \times \epsilon_{ADN} \times \text{facteur de dilution (vol. de la cuve / vol. d'échantillon)}$$

Q : quantité en ADN ($\mu\text{g/mL}$)

ϵ_{ADN} : coefficient d'extinction molaire de l'ADN double brin = $50 \mu\text{g/mL}$,

- la quantité de matériel déposé sur le gel d'agarose est de $10 \mu\text{g}$ d'ADN par échantillon et par puit,
- le gel est préparé à 1% d'agarose (p/v) dans du TBE, puis on ajoute $1 \mu\text{L}$ de BET pour 100 mL d'agarose, quand le mélange a refroidit,
- le gel est placé dans une cuve d'électrophorèse remplie de TBE 0,5X,
- l'ADN est homogénéisé avec quelques gouttes de tampon de charge puis déposé,
- la migration s'effectue sous un champ à 50 V. Le temps de migration dépend du pourcentage d'agarose et du voltage appliqué.

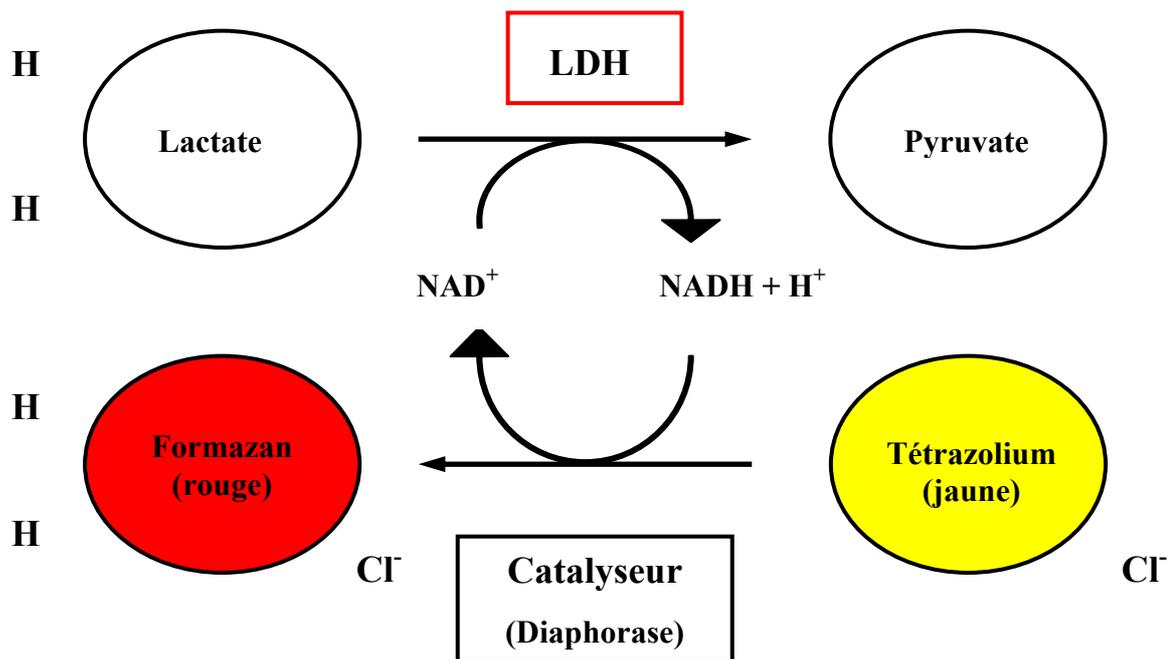
V. Dosage de l'activité Lactate Déshydrogénase (LDH)

V.1. Réactifs :

- Kit « Cytotoxicity Detection kit » (Roche Molecular Biochemicals),
- Solution de lyse : 10% de Triton-X100 (v/v) dans du PBS.

V.2. Mode opératoire :

Cette technique permet de mesurer la libération de la LDH dans le milieu de culture et par conséquent l'intégrité membranaire. Le principe du kit est basé sur une réaction enzymatique entre la LDH et son substrat le lactate qui une fois métabolisé (réaction de réduction), libère des protons H^+ qui réduisent le colorant et modifient sa coloration. La réaction est colorimétrique : plus on a de LDH libérée dans le milieu extracellulaire plus la coloration devient marron pourpre.



Les cellules sont ensemencées sur des plaques 96 puits et infectées. A différents temps post-infection, les surnageants de cultures infectées ou non, sont récupérés. Après centrifugation 3000 g 10 mn à 4°C, 100 µL de chaque échantillon sont alors répartis dans une nouvelle plaque 96 puits.

Le mélange réactionnel contenant du lactate (substrat de la LDH), un colorant (l'iodotétrazolium, indicateur coloré de la réaction) et un catalyseur (la diaphorase/NAD⁺) est préparé extemporanément. 100 µL du mélange sont ajoutés à chaque puits. Après 30 mn d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance (Abs) est mesurée à 490 nm à l'aide d'un lecteur ELISA (MRX, Dynatech).

Pour exprimer les résultats en terme de cytotoxicité, deux contrôles sont réalisés :

- un contrôle témoin (CT), où les cellules sont cultivées sans virus,
- un contrôle positif (CP) qui correspond à 100% de cytotoxicité, réalisé en lysant les cellules avec une solution de Triton X-100, pendant 15 mn à 37°C.

Le pourcentage de cytotoxicité est évalué en calculant le rapport suivant :

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{mes}} - \text{Abs}_{\text{CT}}}{\text{Abs}_{\text{CP}} - \text{Abs}_{\text{CT}}} \times 100$$

où :

Abs_{mes} est l'absorbance de l'échantillon testé

Abs_{CT} est l'absorbance du contrôle témoin

Abs_{CP} est l'absorbance du contrôle positif.

VI. Etude du clivage de la PARP

VI.1 Réactifs :

- PBS,
- PAF 4%,
- Anticorps polyclonal (IgG) anti-PARP produit chez le lapin (anti-PARP p85 fragment pAb, Proméga),
- Anticorps secondaire polyclonal (IgG) anti-lapin couplé à la peroxydase, produit chez le singe (anti-rabbit IgG-HRP conjugate, Proméga),
- Solution de blocage des peroxydases endogènes à 0,3% H_2O_2 ,
- Solution détergente : 0,1% Triton-X100 dans 0,1% citrate,
- Solution de saturation préparée à 0,1% de BSA («bovine serum albumine», Sigma) dans du PBS stérile,
- DAB,
- Hématoxyline,
- Gélatine/Glycérol.

VI.2 Mode opératoire :

La PARP (Poly-ADP-Ribose Polymérase) est une enzyme intervenant dans les mécanismes de réparation transitoire de l'ADN. Elle est efficacement inactivée suite à un clivage protéolytique lors de l'induction d'une mort cellulaire par apoptose. Pour visualiser ce clivage

nous utilisons un anticorps, l'anticorps p85, qui reconnaît la PARP clivée et qui ne peut pas reconnaître la PARP intègre.

Les cellules sontensemencées sur des supports Slideflask et infectées ou traitées à la staurosporine. A différents temps, les cellules sont fixées, lavées, puis immergées dans la solution de blocage des peroxydases endogènes, 30 mn, température ambiante.

Les membranes cellulaires sont perméabilisées, 2 mn sur glace.

Les cellules sont lavées, traitées par la solution de saturation 45 mn, relavées, puis incubées avec 100 µL d'anticorps anti-PARP, pendant 60 mn à température ambiante ou 12 h à +4°C.

Après marquage, les cellules sont rincées et incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase, dirigé contre l'anticorps anti-PARP, pendant 30 mn à 37°C.

Après lavage, les cellules sont incubées avec un substrat de la peroxydase : la DAB, et contre colorées à l'hématoxyline.

Les lames sont rincées, séchées et montées. L'observation des lames se fait au microscope optique. Les cellules présentant une PARP clivée, apparaissent colorées en marron foncé. Les cellules qui ne présentent pas de PARP clivée, sont colorées en violet par l'hématoxyline.

VII. Etude de la libération du cytochrome c

VII.1. Réactifs :

- PBS,
- PAF 4%,
- Anticorps monoclonal (IgG) anti-cytochrome c, produit chez la souris (Anti-Cytochrome c mAb, Proméga),
- Anticorps secondaire polyclonal (IgG) anti-souris, produit chez le lapin, couplé à la biotine (Dako),
- Anticorps tertiaire polyclonal (IgG) anti-lapin, produit chez le porc, streptavidine anti-biotine, couplé au FITC (Dako),
- Solution de blocage des peroxydases endogènes à 0,3%,
- Solution détergente : 0,1% Triton-X100 dans 0,1% citrate,
- Solution de saturation à 0,1% de BSA,
- Gélatine/Glycérol.

VII.2. Mode opératoire :

Le cytochrome c est libéré dans le cytosol suite à une stimulation de type pro-apoptotique de la mitochondrie. Sa libération est une des étapes clés de l'activation des caspases.

Les cellules sontensemencées, infectées, et fixées au PAF.

Les membranes cellulaires sont perméabilisées 2 mn sur la glace, puis incubées avec la solution de saturation 45 mn, à température ambiante.

Après lavage, 100 µL d'anticorps anti-cytochrome c sont rajoutés, et incubés pendant 60 mn à température ambiante ou 12 h à +4°C.

Les cellules sont rincées, puis incubées avec l'anticorps couplé à la biotine, dirigé contre l'anticorps secondaire pendant 1 h. Après rinçage, une troisième incubation est réalisée avec l'anticorps streptavidine anti-biotine couplé au FITC, pendant 1 h à température ambiante.

Les lames sont rincées, séchées puis montées. L'observation des lames se fait au microscope à fluorescence (filtre FITC). Les cellules avec un cytochrome c cytoplasmique, présentent une fluorescence verte.

VIII. Marquage du relargage de l'AIF

VIII.1. Réactifs :

- PBS,
- PAF 4%,
- Anticorps anti-AIF polyclonal (IgG) produit chez le lapin, conservé à +4°C. L'anticorps anti-AIF, nous a été fourni par le Dr N. Zamzami de l'équipe G. Kroemer,
- Anticorps secondaire polyclonal (IgG) anti-lapin, produit chez le porc, couplé au FITC (Dako),
- Solution détergent : 0,1% Triton-X100 dans 0,1% citrate,
- Solution de saturation à 0,1% de BSA,
- Gélatine/Glycérol.

VIII.2. Mode opératoire :

Le facteur AIF est une autre protéine libérée suite à une stimulation pro-apoptotique de la mitochondrie.

Les cellules sont ensemencées sur des supports « Chambre 4 puits Sonic Seal Well » (Nunc), et infectée. A différents temps, les cellules sont fixées, perméabilisées, rincées, puis trempées dans la solution de saturation comme décrit précédemment. Les cellules sont lavées, puis incubées avec 100 μ L d'anticorps anti-AIF, 12 h à 4°C.

Après lavage, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire pendant 1 h.

Les cellules avec un AIF cytoplasmique présentent une fluorescence verte au microscope à fluorescence.

IX. Etude de la translocation de la phosphatidylsérine

IX.1. Réactifs :

- PBS,
- Kit « Annexin-V-Biotin » (Roche Molecular Biochemicals), conservé à -20°C,
- Anticorps streptavidine anti-biotine, couplé au FITC (« SA-FLUOS », Roche Molecular Biochemicals),
- Tampon d'incubation :
 - 10 mM Hepes pH 7,4 (Sigma)
 - 140 mM NaCl
 - 5 mM CaCl₂.

IX.2. Mode opératoire :

La translocation des résidus phosphatidylsérine (PS) est une des premières modifications biochimiques observables chez la cellule entrant en apoptose. L'« Annexin-V » est une protéine qui lie efficacement les résidus PS. Son utilisation permet de visualiser cet événement précoce de la mort cellulaire programmée.

Les cellules sont ensemencées sur des plaques 96 puits à fond plats et infectées.

A différents temps post-infection, les surnageants de cellules infectées ou non, sont éliminés. Les cellules sont lavées, recouvertes avec 50 μ L de solution de marquage diluée au 1/50, et incubées 15 mn à température ambiante. Après lavage, 50 μ L de solution d'amplification sont rajoutés, et incubés à +4°C pendant 20 mn, sous légère agitation.

Les cellules sont lavées avec du tampon d'incubation. La mesure se fait au lecteur de plaque à fluorescence (Fluorolite 1000, Dynatech Laboratories, Dynex Technologies, Labsystems ; λ_{ex} : 450-500nm, $\lambda_{\text{ém}}$: 515-565nm).

X. Dosage des activités caspases

X.1. Réactifs :

- Solution de lyse, à 10% de Triton X-100,
- Tampon d'équilibre à 0,1% de sodium citrate dans du PBS stérile et conservé à +4°C,
- Kit «Bio-Rad Protein Assay» (BIO-RAD), contenant :
 - le réactif de Bradford
 - le standard de protéines («Bio-Rad Protein Assay Standard I», BSA lyophilisée),
- Kit «CaspACE Assay System, Fluorometric» (Promega), contenant :
 - le tampon caspase,
 - un standard d'AMC (7-amino-4-méthyl coumarine),
 - le substrat de la caspase-3 (Ac-DEVD-AMC),
 - l'inhibiteur de la caspase-3 (Ac-DEVD-CHO),
 - le substrat de la caspase-1 (Ac-YVAD-AMC),
 - l'inhibiteur de la caspase-1 (Ac-YVAD-CHO),
- Eau distillée stérile,
- DMSO (dyméthyl sulfoxyde, Sigma),
- DTT (Dithiothreitol, Sigma) 1 M, aliquoté et conservé à -20°C,
- Staurosporine (10^{-6} M),
- Substrat de la caspase-8 (Ac-IETD-AMC) (Bachem Biochimie),
- Inhibiteur de la caspase-8 (Ac-IETD-CHO) (Bachem Biochimie),
- Substrat de la caspase-9 (Ac-LEHD-AMC) (Bachem Biochimie),
- Inhibiteur de la caspase-9 (Ac-LEHD-CHO) (Bachem Biochimie).

Tous les substrats et les inhibiteurs de caspases provenant de Bachem Biochimie sont d'abord dissous dans du DMSO (10^{-2} M), puis dilués dans de l'eau distillée stérile à 2,5 mM final. Ils sont aliquotés et conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

Les substrats ou les inhibiteurs, qu'ils proviennent de Promega ou de Bachem, sont préparés à la même concentration : 2,5 mM.

X.2. Mode opératoire :

Dans un premier temps nous avons utilisé le kit de Promega pour mettre en évidence selon les différentes conditions expérimentales (infection ou traitement à la staurosporine), les activités caspase-3 et -1. Dans un deuxième temps nous avons adapté ce principe de dosage enzymatique à d'autres activités caspases telles que la caspase-8 et la caspase-9.

Les cellules sont ensemencées dans des flacons de culture de 150 cm² (Nunc) et infectées ou traitées à la staurosporine. Après différents temps d'incubation, les cellules sont trypsinées, centrifugées 1000 g, pendant 5 mn à 4°C. Les culots cellulaires sont congelés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Chaque dosage est réalisé en plusieurs étapes selon le protocole suivant :

- après décongélation, on ajoute sur chacun des culots cellulaires 20 µL de tampon de lyse,
- après agitation, on ajoute 200µL de tampon citrate,
- les lysats doivent être bien homogénéisés et sont conservés à +4°C.

X.2.1. Calibrage du spectrophotomètre

La poudre de BSA est réhydratée avec 20 mL d'eau distillée stérile. La solution ainsi obtenue est alors à 1,41 mg de protéines /mL. On effectue alors une gamme de dilutions de façon à obtenir les quantités de protéines suivantes : 1,41 ; 0,282 ; 0,24675 ; 0,2115 ; 0,17625 ; 0,141 ; 0,10575 ; 0,0705 ; 0,03525 ; 0,0282 et 0,0141 mg.

Les absorbances sont mesurées sur spectrophotomètre à $\lambda = 595$ nm (Jasco, V-560).

X.2.2. Dosage des protéines selon la méthode de Bradford (1976)

- 5µL de chacun des lysats sont prélevés dans des tubes à hémolyse et placés sur glace pendant toute la durée du dosage,
- la solution de coloration est préparée en ajoutant 4 volumes d'eau distillée stérile à 1 volume de réactif de Bradford. 5 mL de mélange réactionnel homogénéisés, sont ajoutés dans chaque tube, on laisse incuber pendant 5 mn,
- les absorbances de chaque échantillon sont mesurées à 595 nm, par rapport au «blanc», obtenu avec 5µL de tampon citrate,
- les valeurs ainsi obtenues sont reportées sur la droite étalon. La quantité de protéines totales est exprimée en mg, pour 5 µL d'échantillon.

Pour réaliser le dosage des activités caspases à l'aide du kit, et dans des conditions optimales le volume de lysat ne doit pas dépasser 10 μL et la concentration en protéines totales doit être de l'ordre de 7,5 μg pour 1 μL de lysat ; si la concentration est inférieure, il faut concentrer le lysat en utilisant des unités de concentration par centrifugation "Ultrafree® MC" (Millipore) ; si la concentration est supérieure il peut être nécessaire de diluer le lysat avec le tampon citrate.

Cette quantité de protéines totales (7,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) est donnée comme concentration limite de base par le distributeur du kit pour le dosage des activités caspases. De même il est spécifié que la concentration en protéines totales ne doit pas excéder 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

X.2.3. Etalonnage du spectrofluorimètre

Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de l'AMC sont respectivement 360-380 nm et 460-480 nm. Compte tenu des filtres dont nous disposons et du spectre d'émission de l'AMC (voir ci-après), nous avons utilisé un filtre d'excitation de 365 (± 25) nm et un filtre d'émission de 510 (± 30) nm.

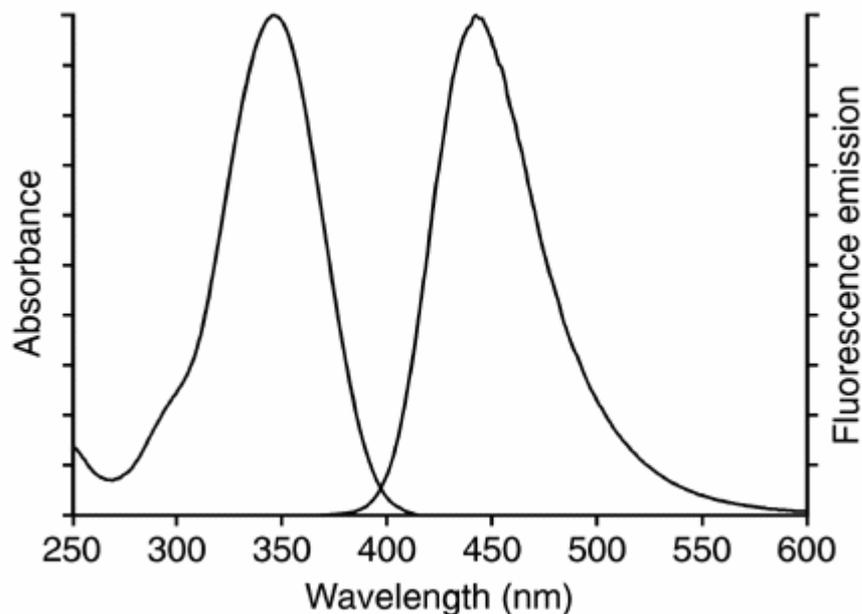


Figure 12 : Spectres d'Absorbance et d'Emission de la 7-amino-4-méthylcoumarine, dans un tampon pH 7,4 (Molecular Probes).

Nous avons ensuite préparé «une solution stock» de l'AMC à 10mM avec du DMSO. Pour confirmer la concentration de la « solution stock » de l'AMC, elle est diluée au 1/400 dans de l'eau. L'absorbance est mesurée à 354 nm. En fonction de l'équation suivante, nous pouvons déterminer la concentration exacte de la solution stock de l'AMC :

$$\text{Concentration (mM)} = (\text{Abs}_{354} \times 400) / \epsilon_{\text{AMC}}$$

$$\epsilon_{\text{AMC}} = 16.10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

A partir de la solution d'AMC, nous réalisons des séries de dilutions d'un facteur 10 dans le DMSO (1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM et 200 µM, 100 µM, 10 µM, 2 µM, 1 µM, 0.2 µM).

Les différents standards d'AMC servant à l'étalonnage du spectrofluorimètre sont préparés en duplicate, comme suit :

Standard AMC	Picomoles d'AMC/ 100µl	Solution stock d' AMC				DMSO	Tampon Caspase	Eau distillée stérile
		0.2 µM	2 µM	10 µM	200 µM			
0	0					10 µl	32 µl	58 µl
10 nM	1	5 µl				5 µl	32 µl	58 µl
100 nM	10		5 µl			5 µl	32 µl	58 µl
200 nM	20		10 µl				32 µl	58 µl
500 nM	50			5 µl		5 µl	32 µl	58 µl
1 µM	100			10 µl			32 µl	58 µl
10 µM	1.000				5 µl	5 µl	32 µl	58 µl
20 µM	2000				10 µl		32 µl	58 µl

Tableau 8 : Obtention des standards d'AMC.

La plaque 96 puits est lue avec le lecteur de plaque à fluorescence.

X.2.4. Préparation des échantillons pour le dosage des activités enzymatiques

Une fois le dosage en protéines effectué, les différents échantillons à tester sont disposés dans une plaque 96 puits «blanches» à fond plat (Nunc), avec les différents réactifs selon le tableau ci-dessous :

	Substrat / Inhibiteur	Substrat	Blanc
Tampon Caspase	32 µL	32 µL	32 µL
DMSO	2 µL	2 µL	2 µL
DTT (1mM)	10 µL	10 µL	10 µL
Lysat Cellulaire	*	*	/
Inhibiteur Caspase (2,5 mM)	2 µL	/	/
H₂O	qsp 98 µL	qsp 98µL	54 µL
	Incuber 30 mn à 37°C		
H₂O	/	/	2 µL
Substrat Caspase (2,5 mM)	2 µL	2 µL	/
	Incuber 2 h à 37°C		

Tableau 9 : Distribution des réactifs pour le dosage des activités caspases

Remarque :

* : le volume de chaque échantillon est toujours ajusté pour avoir une quantité de protéines totales égale à 75 µg. Idéalement ce volume ne doit pas dépasser 10 µL.

Au bout de 2 heures d'incubation la fluorescence est mesurée avec un lecteur de plaque à fluorescence. La fluorescence mesurée, traduit la libération du fluorochrome (AMC) suite au clivage du substrat par la caspase étudiée.

Ainsi, les activités de 4 caspases à différents temps d'infection ou de traitement par la staurosporine ont été recherchées respectivement à partir d'un même lysat cellulaire.

XI. Effets des inhibiteurs synthétiques de caspases sur l'activation des caspases au cours de l'apoptose Visna induite

XI.1. Réactifs :

- Solution de lyse (10% Triton X-100),
- Tampon d'équilibre (0,1% de sodium citrate),
- Kit « Bio-Rad Protein Assay »,
- Kit « CaspACE Assay System, Fluorometric », contenant :
 - le tampon caspase,
 - le substrat de la caspase-3 (Ac-DEVD-AMC),
 - le substrat de la caspase-1 (Ac-YVAD-AMC),
- Eau distillée stérile,
- DMSO,
- DTT,
- Substrat de la caspase-8 (Ac-IETD-AMC),
- Substrat de la caspase-9 (Ac-LEHD-AMC),
- z-DEVD-FMK, [benzyloxycarbonyl-Asp-Glu-Val-Asp(Ome)-fluoromethylketone], inhibiteur irréversible de la caspase-3 (Bachem Biochimie),
- z-VAD-FMK, [benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(Ome)-fluoromethylketone], inhibiteur irréversible à large spectre des caspases (Bachem Biochimie),
- z-YVAD-FMK, [benzyloxycarbonyl-Tyr-Val-Ala-Asp(Ome)-fluoromethylketone], inhibiteur irréversible des caspases de type inflammatoire (Bachem Biochimie).

Les inhibiteurs : z-DEVD-FMK, z-VAD-FMK et z-YVAD-FMK, sont dissous dans du DMSO (10^{-2} M final), et conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

XI.2. Mode opératoire :

Trois inhibiteurs synthétiques, irréversibles et ayant la propriété de pénétrer dans la cellule : z-DEVD-FMK, z-VAD-FMK et z-YVAD-FMK, ont été utilisés en remplacement des trois

inhibiteurs réversibles spécifiques de type Ac-XXXX-CHO normalement employés dans le kit (Ac-DEVD-CHO, Ac-LEHD-CHO ou Ac-IETD-CHO).

z-DEVD-FMK, z-VAD-FMK et z-YVAD-FMK sont employés aux mêmes concentrations (5×10^{-5} M final) que celles recommandées par le fournisseur du kit «CaspACE Assay System, Fluorometric».

Les cellules sontensemencées dans des flacons de culture de 150 cm² (Nunc) et infectées.

A différents temps post-incubation, les cellules sont trypsinées, puis centrifugées à 1000 g, pendant 5 mn à 4°C.

Les culots cellulaires sont congelés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Chaque dosage est réalisé en plusieurs étapes selon le protocole décrit précédemment dans le **paragraphe X.2. : lyse des cellules, dosage des protéines et préparation des échantillons.**

XII. Effets des inhibiteurs irréversibles de caspases sur l'ECP Visna induit

XII.1. Réactifs :

- «Cytotoxicity Detection kit»,
- Solution de lyse : 10% Triton-X100,
- z-DEVD-FMK, à 10^{-2} M dans DMSO,
- z-VAD-FMK, à 10^{-2} M dans DMSO,
- z-YVAD-FMK, à 10^{-2} M dans DMSO.

XI.2. Mode opératoire :

Les cellules, en plaque 96 puits, sont infectées ou non, et dans le même temps, traitées ou non par les inhibiteurs irréversibles de caspases (z-DEVD-FMK, z-VAD-FMK et z-YVAD-FMK) testés chacun à 3 concentrations : $2,5 \times 10^{-5}$, 5×10^{-5} et 1×10^{-4} M final.

Les microplaques sont ensuite placées à 37°C.

A différents temps après incubation (12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h et 192 h) les surnageants sont prélevés, fractionnés en deux échantillons placés respectivement à +4°C et -80°C. Après chaque prélèvement de surnageants, du milieu de culture (milieu de survie), sans inhibiteurs, est rajouté dans tous les puits. La microplaque est remplacée à 37°C.

Les échantillons à +4°C sont utilisés ultérieurement pour suivre la libération de LDH, donc la lyse cellulaire, au cours du temps. Les échantillons à -80°C quant à eux, serviront à déterminer le titre viral (DICC₅₀) aux différents temps d'infection.

XIII. Marquage *in situ* avec le FITC-VAD-FMK

XIII.1. Réactifs :

- « CaspACE FITC-VAD-FMK In Situ Marker » (Promega),
- PBS,
- PAF 4%,
- Gélatine/Glycérol.

XIII.2. Mode opératoire :

Le FITC-VAD-FMK est synthétisé sur la même base que le z-VAD-FMK, il fonctionne donc comme un inhibiteur. Il pénètre naturellement les membranes cellulaires sans qu'il y ait perméabilisation préalable. Ce composé permet un marquage *in situ* sur cellules vivantes, donc une discrimination de l'activation des caspases d'une cellule à l'autre.

Les cellules sontensemencées sur des supports «Chambre 4 puits Sonic Seal Well», et infectées. A différents temps, les surnageants de culture sont remplacés par du milieu de survie contenant le FITC-VAD-FMK à 10^{-4} M final.

Après 8 h à 37°C, le surnageant est retiré, les cellules sont fixées, séchées puis montées. Les cellules contenant des caspases actives, présentent une fluorescence verte.

XIV. Technique de double marquage DAPI/ FITC-VAD-FMK

XIV.1. Réactifs :

- PBS,
- PAF 4%,
- « CaspACE FITC-VAD-FMK In Situ Marker »,
- DAPI,
- Gélatine/Glycérol.

XIV.2. Mode opératoire :

Il faut d'abord mettre en place la technique avec le FITC-VAD-FMK, décrite précédemment, puis dans deuxième temps, toujours sur les mêmes échantillons, on réalise une coloration au DAPI (paragraphe IV.1.).

L'observation s'effectue au microscope à fluorescence, en utilisant successivement le filtre pour le marquage FITC puis le filtre pour le DAPI. Nous prenons la précaution de ne pas changer le champ d'observation. Les noyaux présentent une fluorescence verte et une fluorescence bleue.

XV. Tests statistiques

Les données exprimées sont les moyennes de trois expériences séparées ou plus, \pm l'écart type.

Les analyses statistiques des données sont réalisées à l'aide du programme StatView (SAS Institute Inc., Cary, NC) et comprennent une ANOVA suivie par un test de Fisher (Post-Hoc PLSD), avec un niveau de significativité à 5%.

Une valeur de $P < 0.05$ (*) est considérée comme significative, $P < 0,01$ (**) et $P < 0,001$ (***) sont considérées comme très significatives.

RESULTATS

I. Recherche d'un témoin positif d'apoptose

Afin de valider nos conditions expérimentales d'étude de l'apoptose induite lors d'une infection par le virus Visna, il nous est apparu nécessaire de rechercher des conditions d'apoptose de référence et donc de trouver un stimulus capable d'induire l'entrée en apoptose des cellules de PC. Nous avons testé différents types de stress physique, chimique ou biochimique.

La carence en sérum de veau fœtal n'a induit aucune apoptose sur les cellules de plexus choroïde. Nous n'avons révélé aucune modification morphologique par la coloration au DAPI, et ce pour des périodes allant jusqu'à 2 semaines de culture.

L'exposition aux radiations gamma, n'a pas induit l'entrée des cellules de PC en apoptose, quelle que soit la dose testée, comprise entre 1 et 20 grays.

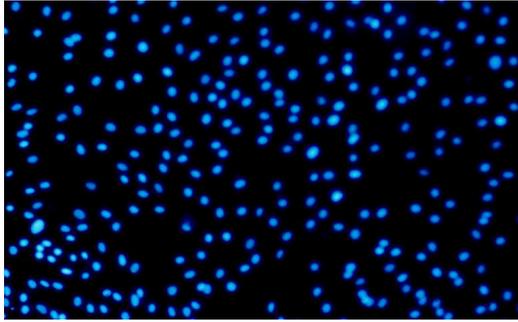
Nous avons étudié, sur les cellules de PC, les effets de plusieurs molécules chimiques décrites comme induisant l'apoptose sur d'autres types cellulaires. Les différentes concentrations d'utilisation de ces substances figurent sur le Tableau 10.

Aucunes de ces molécules, exception faite de la staurosporine, n'induisent l'apoptose sur nos cellules primaires.

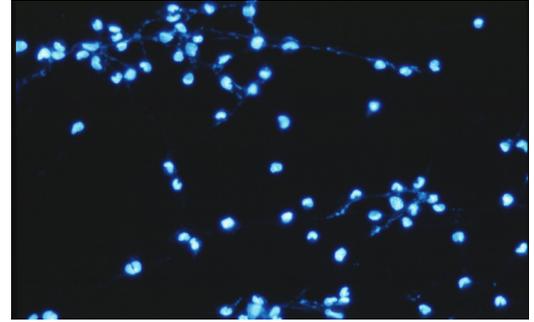
A la concentration 10^{-6} M, et plus, la staurosporine induit une apoptose observable par la technique DAPI dès 4 h de traitement : les cellules s'arrondissent et le cytoplasme se réduit fortement et forme de longs filaments. Au bout de 6 h de traitement, 100% des cellules sont en apoptose : elles présentent toutes un noyau condensé avec une fluorescence accrue (Figure 13). Nous avons donc retenu et utilisé comme témoin positif d'apoptose le traitement par la staurosporine à 1 μ M final pendant 6 h.

Nom	Propriétés	Cellules Sensibles	Cellules de PC				
			10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁹ M
Déxaméthasone	Anti-inflammatoire (glucocorticoïde)	Thymocytes (Ivanov et al., 1998). Lignées leucémiques humaines (Ramdas et Harmon 1998) ...	-	-	-	-	-
Tamoxifène	Antagoniste des œstrogènes non stéroïdiens (anti-œstrogène)	Lignées cancéreuses humaines : mammaires (El Etreby et al., 1998), prostatiques (El Etreby et al., 2000) ...	-	-	-	-	-
Cycloheximide	Inhibiteur de la synthèse protéique	Cellules T (Tang et al., 1999). Cellules ovariennes de Hamster chinois (Goswami et al., 1999) ...	-	-	-	-	-
Génistéine	Inhibiteur des protéines kinases à tyrosine	Lignées cancéreuses mammaires (Constantinou et al., 1998), testiculaires (Kumi-Diaka et al., 1998), prostatiques (Onozawa et al., 1998) ...	-	-	-	-	-
Camptothécine	Inhibiteur de la topoisomérase I	Lignées cancéreuses mammaires (Liu et al., 1998), lymphome de Burkitt (Lauthier et al., 2000) ...	-	-	-	-	-
Staurosporine	Inhibiteur de la protéine kinase C	Thyrocytes (Wang et al., 1999) Neurones (Cagnoli et al., 1996) Cellules Jurkat (Ferrari et al., 1998) Cellules HeLa (Bossy-Wetzel et al., 1998) ...	+	+	-	-	-

Tableau 10 : Molécules apoptogènes testées sur les cellules PC.



A



B

Figure 13 : Marquage nucléaire par le DAPI.

(A) Cellules de PC en culture. Les noyaux présentent une faible fluorescence bleue, résiduelle.

(B) Les cellules de PC sont incubées avec la staurosporine (1 μ M) pendant 6h. Les noyaux présentent une fluorescence bleue intense et une morphologie condensée.

Grossissement x 200.

II. Modifications morphologiques observées au cours de l'infection par le virus Visna

II.1. Condensation et fragmentation cytoplasmique

Pour déterminer si l'infection par le virus Visna est associée, *in vitro*, à l'induction de l'apoptose, nous avons réalisé plusieurs cinétiques d'infection et recherché les temps pour lesquels les noyaux marqués au DAPI montrent des modifications morphologiques caractéristiques et une organisation chromatinienne aberrante.

Après 72 h d'infection, 3% des cellules en moyenne entrent en apoptose (Tableau 11). Après 82 h, l'infection par le virus Visna est associée à l'apparition de cellules avec des modifications caractéristiques de l'apoptose : condensation chromatinienne, rétrécissement cellulaire (Figure 14B) et formation de corps apoptotiques (Figure 14C). Les noyaux sont déformés, parfois en forme de «haricot», et présentent toujours une fluorescence bleue plus intense, par rapport aux noyaux témoins (Figure 14A). Ainsi la caractérisation de noyaux apoptotiques, en utilisant la technique de coloration au DAPI, tient compte à la fois d'une modification de la morphologie des noyaux associée à une fluorescence accrue. A la phase ultime (90 h d'infection), la fragmentation nucléaire se traduit par l'apparition de bourgeons apoptotiques à la surface des cellules, puis leur individualisation en corps apoptotiques (Figure 14D).

Les cellules non infectées ne présentent aucune modifications morphologiques, et montrent une faible fluorescence bleue résiduelle. Le comptage des cellules apoptotiques (Tableau 11) révèle 40% d'apoptose à 82 h, et ce taux augmente en fonction du temps d'infection (60% à 90 h). En raison de la lyse cellulaire qui apparaît pour des temps d'infection prolongés, en général après 92 h et plus, ce taux d'apoptose devient moins significatif : à 96 h post-infection, la lyse cellulaire est si importante que le comptage des noyaux apoptotiques devient impossible à dénombrer (Tableau 11). Il est donc nécessaire, dans notre système, de se placer entre 72 h et 90 h post-infection pour observer les caractéristiques apoptotiques mise en évidence par la coloration au DAPI. Nous avons donc retenu 82 h comme temps de référence pour l'observation des modifications morphologiques.

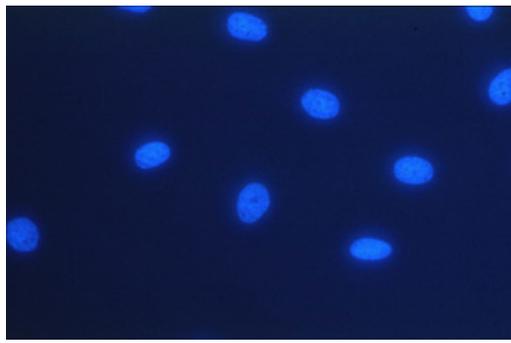
Temps d'infection	DICC ₅₀	Apoptose (%)	Syncytia apoptotiques (%)
<72 h	33000	-	-
72 h	464000	3	-
82 h	2300000	40	15
90 h	1940000	60	18
96 h	547000	ND	ND
>96 h	ND	ND	ND

Tableau 11 : Evolution de l'apoptose et du titre viral au cours de l'infection.

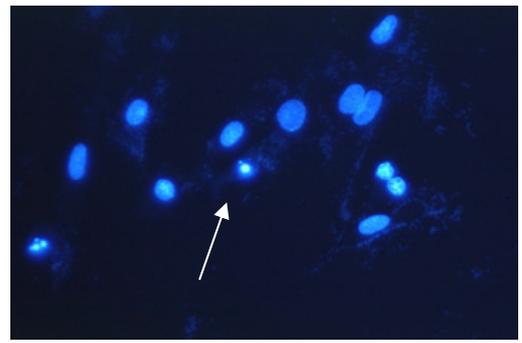
Les cellules de PC sont infectées par le virus Visna. A différents temps les cellules sont marquées au DAPI et le titre viral (DICC₅₀) est déterminé dans les surnageants de culture.

L'apoptose est estimée en comptant les noyaux (300 en moyenne) et les syncytia (100 en moyenne) présentant les modifications morphologiques caractéristiques de l'apoptose observables au DAPI.

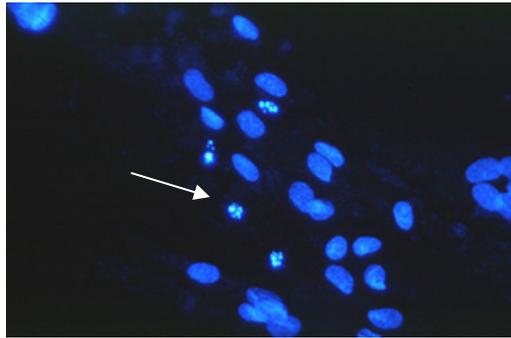
ND : non déterminé.



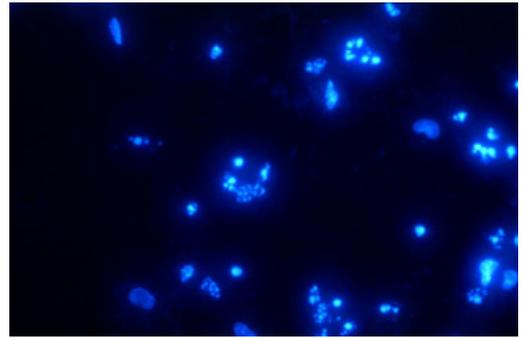
A



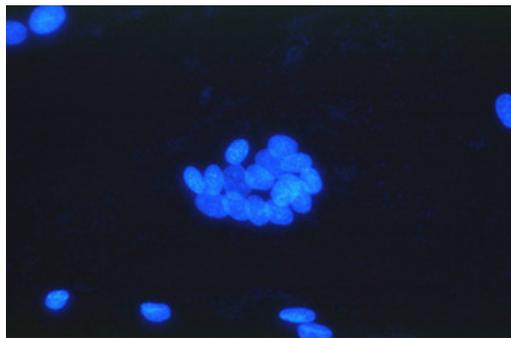
B



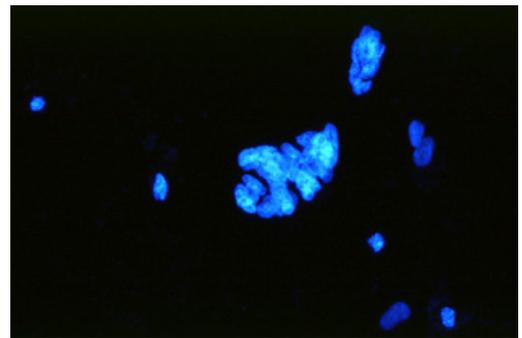
C



D



E



F

Figure 14 : Marquage nucléaire par le DAPI.

(A) Cellules de PC non-infectées.

(B, C, D, E et F) Cellules de PC infectées par le virus Visna.

(B, C) A 82 h post-infection, certains noyaux présentent les modifications morphologiques caractéristiques de l'apoptose (flèches).

(D) A 90 h post-infection, le tapis cellulaire commence à être lysé par endroit, de nombreux corps apoptotiques sont visibles.

(E) Syncytia non apoptotique à 82 h post-infection.

(F) Syncytia apoptotique à 82 h post-infection.

Grossissement x 400.

Une des principales caractéristiques de l'effet cytopathologique (ECP) induit par le virus Visna est la formation de syncytia (Figure 14E). Nous avons alors recherché le devenir de ces syncytia au cours de l'infection. Nos résultats montrent qu'avant même la formation des syncytia, les cellules individualisées présentent un noyau apoptotique (Tableau 11). Puis, en fonction de la durée d'infection, les syncytia apparaissent et deviennent apoptotiques (Figure 14F), mais le pourcentage n'excède jamais 20%, et ce quel que soit le temps d'infection.

II.2. Fragmentation chromatinienne

La phase de fragmentation nucléaire suit la phase de condensation cytoplasmique et nucléaire, et précède l'étape de bourgeonnement et la formation des corps apoptotiques. Nous nous sommes donc placés aux mêmes temps d'infection que pour la coloration au DAPI.

Pour détecter l'ADN fragmenté dans des cellules PC infectées, nous avons utilisé la technique TUNEL qui permet de visualiser spécifiquement par marquage *in situ*, les extrémités 3'-OH.

Les cellules non-infectées n'incorporent pas le fluorochrome, aucune fluorescence verte n'est émise : il n'y a pas fragmentation de la chromatine (Figure 15A).

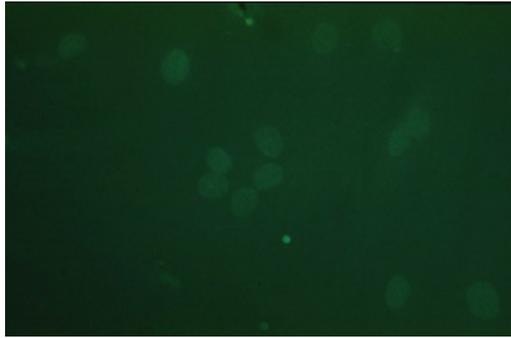
Quand nos cellules de PC sont infectées, de nombreuses cellules individuelles émettent une fluorescence verte, due au marquage par le FITC, leurs noyaux présentent une chromatine fragmentée (Figure 15B).

Comme pour le DAPI, les syncytia sont également marqués (Figure 15C).

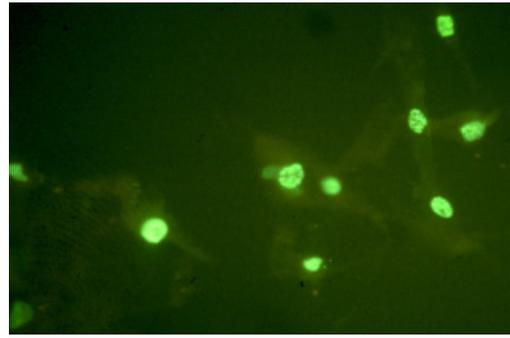
Pour visualiser l'ensemble du tapis cellulaire, nous avons réalisé une conversion du signal permettant l'observation des cellules dans le visible. Les cellules avec une chromatine fragmentée sont alors marquées et colorées en marron (Figure 15D). De la même façon que précédemment, les cellules marquées sont aussi bien des cellules individualisées que des syncytia (Figures 15D et 15E).

Au cours de l'infection par le virus Visna, les cellules individuelles ainsi que les syncytia présentent une fragmentation de la chromatine.

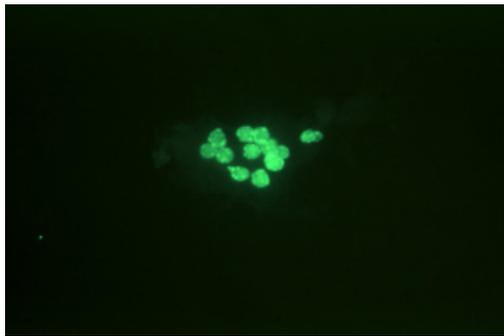
Cependant compte tenu des conditions expérimentales très détergentes mises en œuvre lors de la technique TUNEL, aucune quantification des cellules positives en TUNEL n'a pu être effectuée, le tapis cellulaire étant trop endommagé.



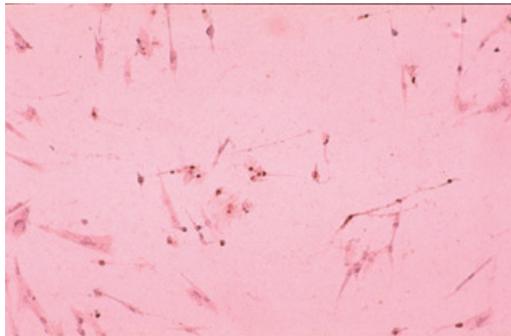
A



B



C



D



E

Figure 15 : Fragmentation chromatinienne, Technique TUNEL.

(A) Les cellules non infectées ne sont pas marquées par la technique TUNEL.

(B, C, D, E) Cellules infectées avec le virus Visna. A 82 h post-infection, la technique TUNEL révèle des cellules individuelles marquées (B, D) et des syncytia (C, E), à chromatine fragmentée.

Noyaux marqués au FITC (B, C) ou avec la DAB (D, E) après conversion du signal.

Grossissement : B et C x400, D et E x200.

II.3. Technique de double marquage DAPI/TUNEL

Pour déterminer si les noyaux avec une condensation nucléaire (positif au DAPI) présentent aussi une fragmentation nucléaire (positif en TUNEL), une technique de double marquage DAPI/TUNEL a été adaptée.

Les figures 16A et 16B montrent le même champ optique à 90 h post-infection, observé soit avec le filtre DAPI (16A) soit avec le filtre FITC (16B). En comparant ces deux figures, nous montrons qu'il y a bien corrélation entre la condensation chromatinienne et la fragmentation de l'ADN nucléaire.

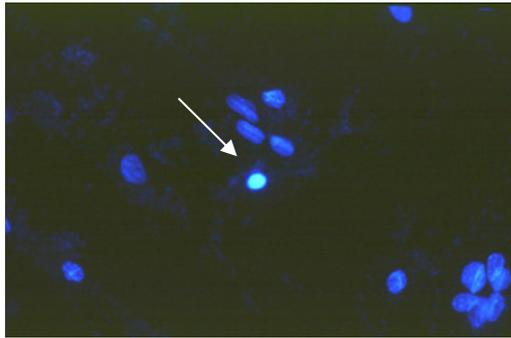
II.4. Electrophorèse d'ADN

Afin de confirmer nos résultats obtenus en TUNEL, nous avons alors voulu réaliser un profil de migration sur gel d'agarose de l'ADN de cellules infectées pour mettre en évidence la fragmentation internucléosomale de l'ADN.

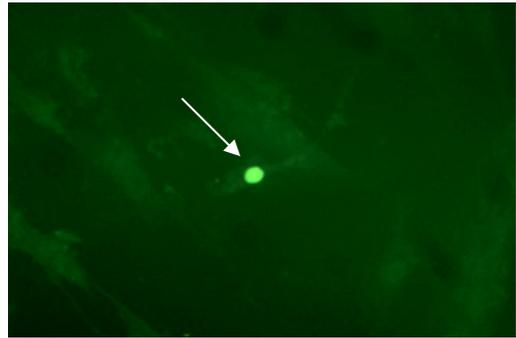
Dans le cas de cellules traitées à la staurosporine (1 μ M), nous obtenons un profil de migration en échelle avec des bandes comprises entre 200 et 600 pb (Figure 17, colonne 4).

L'ADN extrait de cellules non-infectées et non traitées, ne présente aucune migration (colonne 3).

Nous n'avons obtenu aucun profil de migration en échelle dans le cas des cellules infectées, et ce quel que soit le temps d'infection (colonne 2).



A



B

Figure 16 : Double marquage DAPI-TUNEL.

Les photos A et B montre le même champ optique.

Après 90 h d'infection les cellules sont marquées par la technique TUNEL (B), puis colorées au DAPI (A). Il y a corrélation entre les deux marquages.

Grossissement x400.

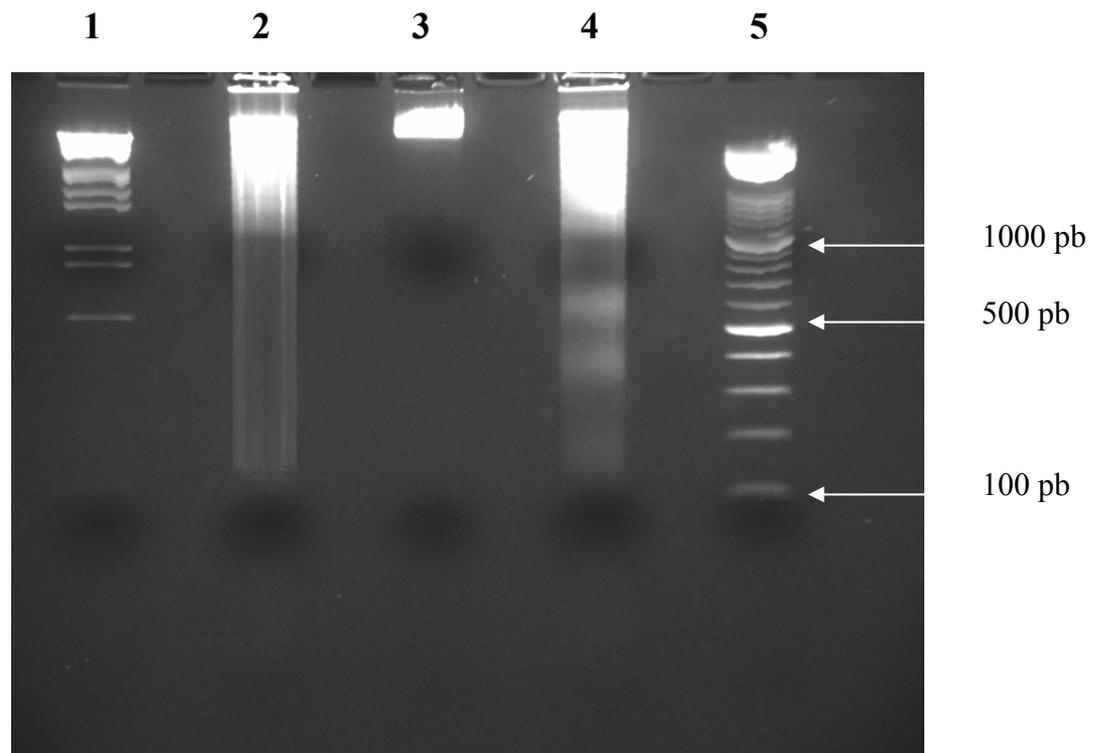


Figure 17 : Fragmentation chromatinienne, migration électrophorétique sur gel d'agarose.

- (1) : marqueur de poids moléculaire (Lambda Hind III, Sigma).
- (2) : cellules infectées.
- (3) : cellules non-infectées.
- (4) : cellules traitées à la staurosporine.
- (5) : maqueurs de poids moléculaire (DNA Molecular Weight Marker XIV, Roche Biochemicals).

III. Etude de l'intégrité membranaire des cellules PC infectées

Le maintien de l'intégrité membranaire est un des traits caractéristiques du processus de mort cellulaire apoptotique. Dans le cas de l'infection par le virus Visna, l'ECP se traduit à terme par une phase de lyse cellulaire massive. Pour suivre l'évolution de l'intégrité cellulaire nous avons dosé la libération de l'enzyme LDH dans le surnageant de cellules infectées ou non.

La figure 18 montre qu'il n'y a pas de libération spontanée de la LDH dans le surnageant de cellules en culture non infectées.

Lorsque les cellules sont infectées, il n'y a pas de LDH libérée jusqu'à 90 h post-infection (Figure 18). Nous constatons qu'il n'y a pas de différences entre les taux de LDH décelés au niveau des surnageants de cellules infectées ou non. A partir de 100 h post-infection, nous observons une augmentation de la LDH. Cela correspondrait à l'apparition du phénomène de lyse cellulaire, caractéristique de l'ECP Visna-induit *in vitro*.

IV. Recherche de la translocation de la phosphatidylsérine

La modification de polarité membranaire est un marqueur précoce des cellules entrant en apoptose. L'exposition accrue de résidus phosphatidyl sérines intervient dans le processus reconnaissance puis de phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages. Pour cela nous avons essayé d'adapter la technique de marquage à l'Annexine V sur nos cellules adhérentes infectées, en utilisant un lecteur de plaque à fluorescence froide. Cette technique devait nous permettre de ne pas détacher les cellules de leur support, étape indispensable pour une étude en cytométrie de flux.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence une augmentation de l'exposition des résidus phosphatidyl sérines marqués par l'Annexine V, comparativement aux cellules «Témoin» non-infectées. Cela peut s'expliquer par le fait que cette technique est normalement utilisée en cytométrie de flux sur des cellules en suspension.

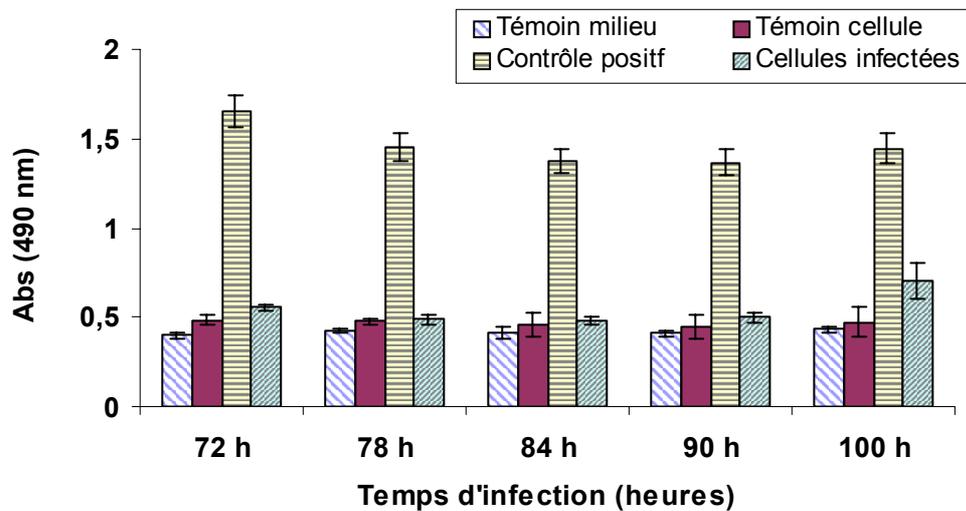


Figure 18 : Cinétique de libération de la LDH.

A différents temps post-infection, l'activité LDH est mesurée dans les surnageants de culture :

- Cellules infectées : cellules de PC infectées par le virus Visna, suivi de l'intégrité membranaire au cours de l'infection.
- Témoign cellule : cellules non-infectées, estimation de la libération spontanée de LDH par les cellules en culture.
- Contrôle positif : cellules lysées avec la solution détergente, détermination de l'activité LDH maximale.
- Témoign milieu : évaluation de l'absorbance du milieu de culture et de son incidence sur les autres valeurs expérimentales mesurées au cours de l'infection.

V. Clivage de la PARP

Au cours de l'apoptose la PARP (« Poly-ADP-ribose polymerase ») est inactivée suite à un clivage protéolytique effectué par la caspase-3. Ce clivage libère deux sous-unités de 85 kDa et 25 kDa. Nous avons utilisé un anticorps dirigé spécifiquement contre la sous-unité de 85 kDa libérée après clivage.

Les cellules non infectées sont colorées par l'hématoxyline, elles ne sont pas colorées en marron par la DAB (Figure 19A), elles ne présentent donc pas de PARP clivée.

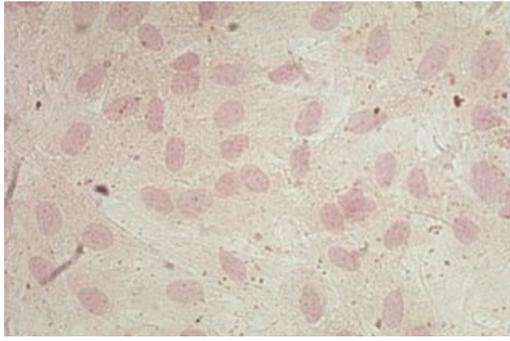
Dans le cas de cellules infectées, quelle que soit la durée d'infection, les cellules sont colorées par l'hématoxyline (Figure 19B) : il n'y a pas de clivage de l'enzyme PARP dans les cellules infectées.

Dans le cas d'un traitement par la staurosporine (1 μ M), les cellules sont colorées en marron (Figure 19C) : le fragment de 85 kDa est libéré, la PARP est clivée.

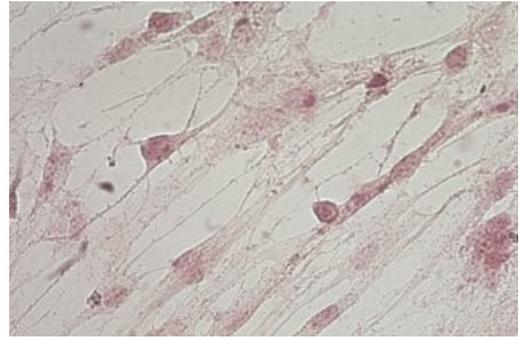
VI. Mise en évidence de l'activation des caspases apoptotiques

VI.1. Calibrage du spectrophotomètre : obtention de la droite étalon pour le dosage de Bradford

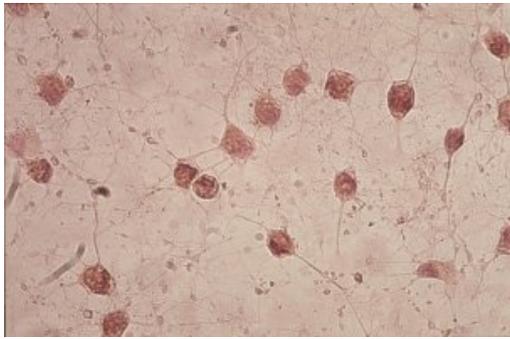
Les valeurs d'absorbance obtenues avec la BSA sont les suivantes :



A



B



C

Figure 19 : Etude du clivage de la PARP.

(A) cellules de PC non-infectées, colorées par l'hématoxyline.

(B) cellules infectées par le virus Visna à 90 h post-infection, colorées par l'hématoxyline.

(C) cellules traitées avec la staurosporine (6 h), colorées en marron par la DAB.

Volume (μL)	Quantité de protéines (mg)	Absorbance (550nm)
1000	1,41	
200	0,282	1,181
175	0,24675	1,104
150	0,2115	0,992
125	0,17625	0,834
100	0,141	0,767
75	0,10575	0,583
50	0,0705	0,428
25	0,03525	0,228
20	0,0282	0,182
10	0,0141	0,109

Nous obtenons la courbe correspondante (Figure 20).

Si nous effectuons une régression linéaire, nous obtenons une droite de type :

$$y = ax + b$$

où :

- a (la pente) = 5,1685
- b (l'origine) = 0,0427

avec un coefficient de régression (R^2) égal à 0,9982.

VI.2. Etalonnage du spectrofluorimètre

Après avoir préparé la solution d'AMC à 10mM, nous avons mesuré l'absorbance de la solution à 354nm, et ainsi déterminé la concentration réelle en AMC de la solution (Figure 21).

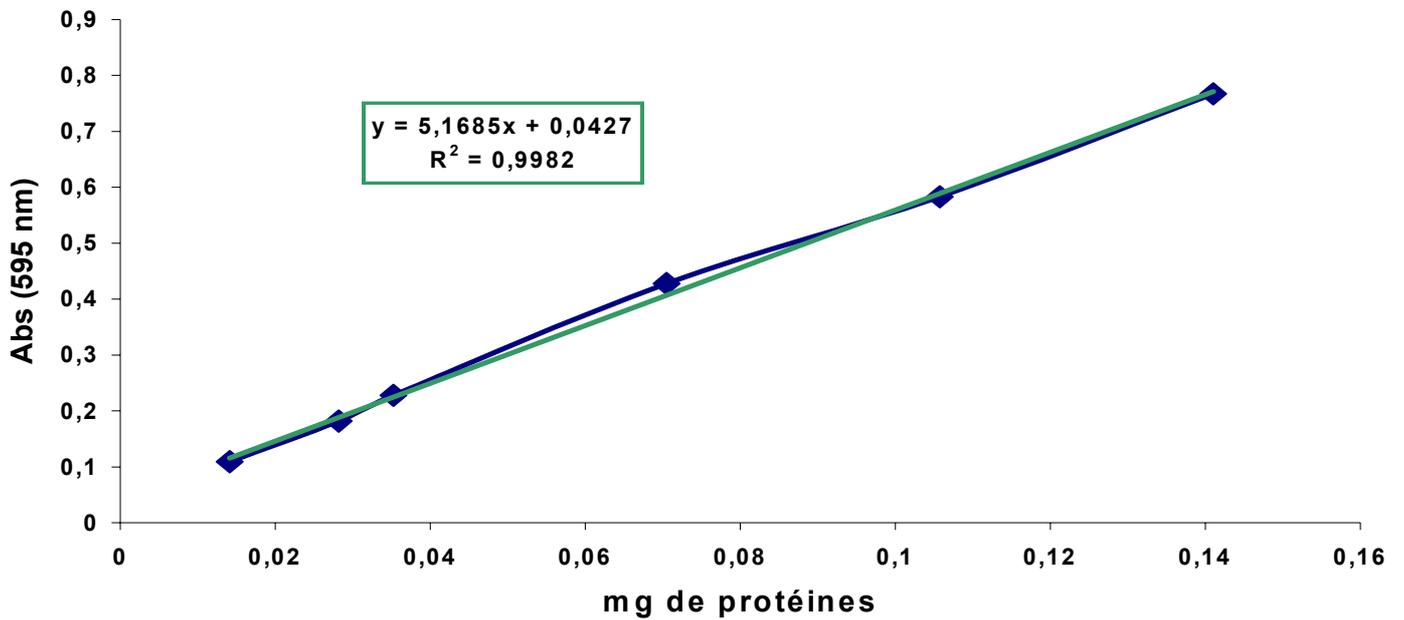
$$\text{Concentration (AMC)} = (\text{Abs}_{354} \times 400) / \epsilon_{\text{AMC}}$$

$$\text{Concentration (AMC)} = (0.3733 \times 400) / 16.10^{-3}$$

$$\text{Concentration (AMC)} = 9.33 \text{ mM}$$

Tenant compte de la concentration réelle en AMC nous faisons les différentes dilutions, et la plaque 96 puits est remplie comme décrit dans le matériel et méthodes.

DOSAGE DE BRADFORD



**Figure 20 : Calibrage du Spectrophotomètre, à l'aide d'une solution de BSA
à 1,41 mg/mL.**

Une absorbance de 0,45 correspond environ à 75 μ g de protéines.

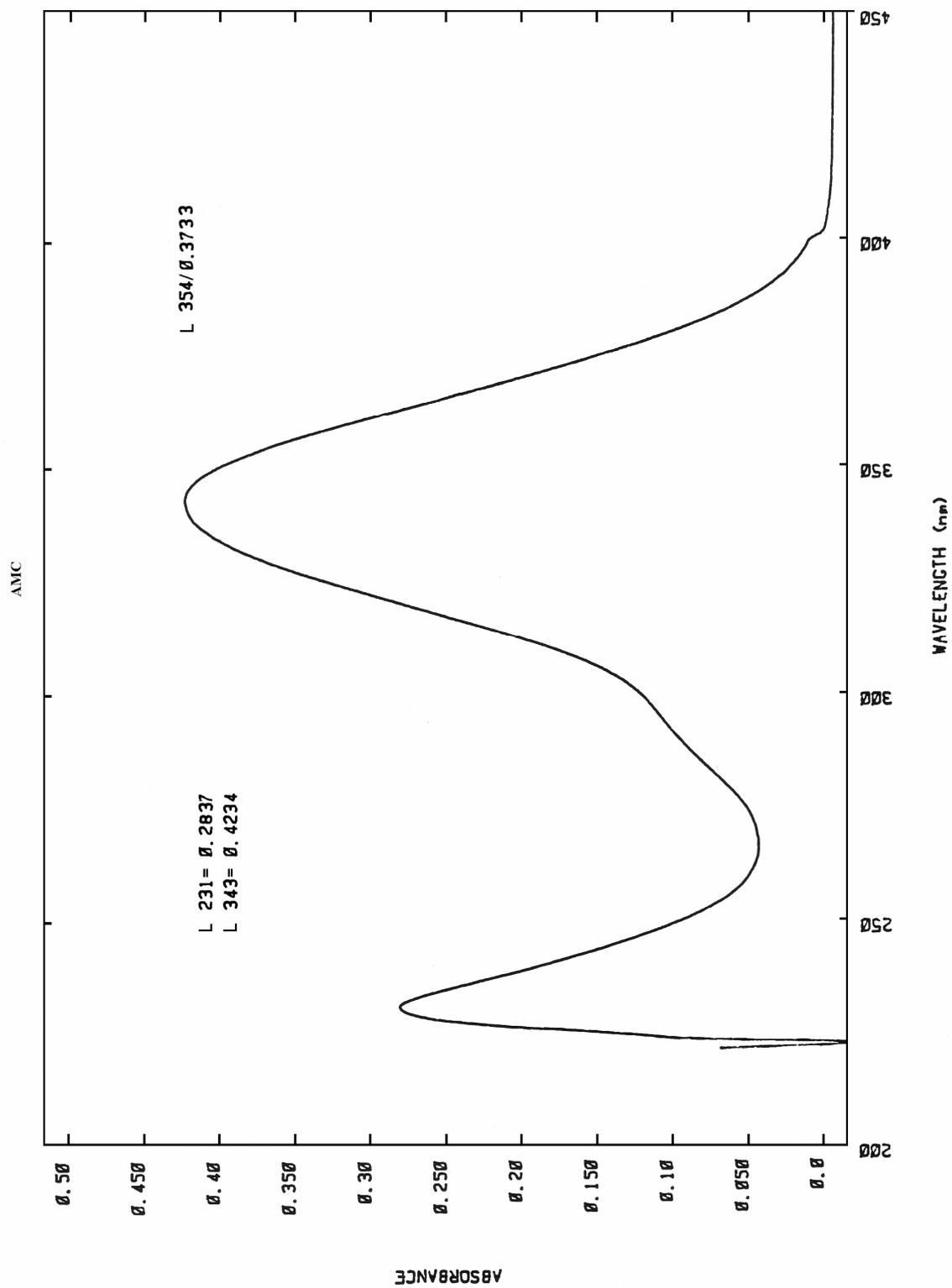


Figure 21: Spectre d'absorption de l'AMC en solution dans du DMSO.

A 354 nm l'absorbance mesurée est 0.3733.

Les différentes valeurs de fluorescence sont portées sur un graphique avec en abscisse la quantité en AMC et en ordonnée les URF (Unité Relative de Fluorescence). Nous obtenons une droite (Figure 22A et 22B). La régression linéaire nous donne la formule :

$$y = ax + b$$

où :

- a (la pente) = 172.22
- b (l'origine) = 23.508

avec un coefficient de régression (R^2) égal à 0,9997.

VI.3. Dosage des activités caspase-3 et caspase-1

Pour chacune des activités caspases testées, nous observons une émission de fluorescence résiduelle dans les conditions témoins (T), à savoir lysats de cellules non-infectées et non-traitées, en présence uniquement du substrat spécifique de chacune (Figures 23 et 24).

Pour l'activité **caspase-3** le couple utilisé est :

- le Ac-DEVD-CHO, inhibiteur réversible
- le Ac-DEVD-AMC, substrat spécifique.

Dans le cas de cellules infectées (Figure 23), en présence du substrat, la caspase-3 est activée et significative dès 54 h post-infection, soit 342 URF contre 176,5 URF pour le témoin. L'activité augmente jusqu'à un maximum à 68 h post-infection, à 1049 URF, puis diminue après 74 h (720 URF). Parallèlement, la fluorescence mesurée avec le couple « substrat + inhibiteur » n'augmente pas. Ce niveau de fluorescence basale est constant et nous permet de confirmer la spécificité du couple substrat/inhibiteur utilisé pour la caspase-3.

Dans le cas des cellules traitées par la staurosporine (Figure 23), l'activité caspase-3 est significative après 3 h de traitement, avec 444,5 URF contre 346,5 URF pour le témoin. Puis elle augmente, passe par maximum après 18 h de traitement, à 3767,5 URF, puis décroît après 24 h (3614 URF à 24 h puis 1903,5 URF à 30 h). Comme précédemment le seuil de fluorescence ne varie pas (condition substrat + inhibiteur), le couple utilisé est adapté à notre étude.

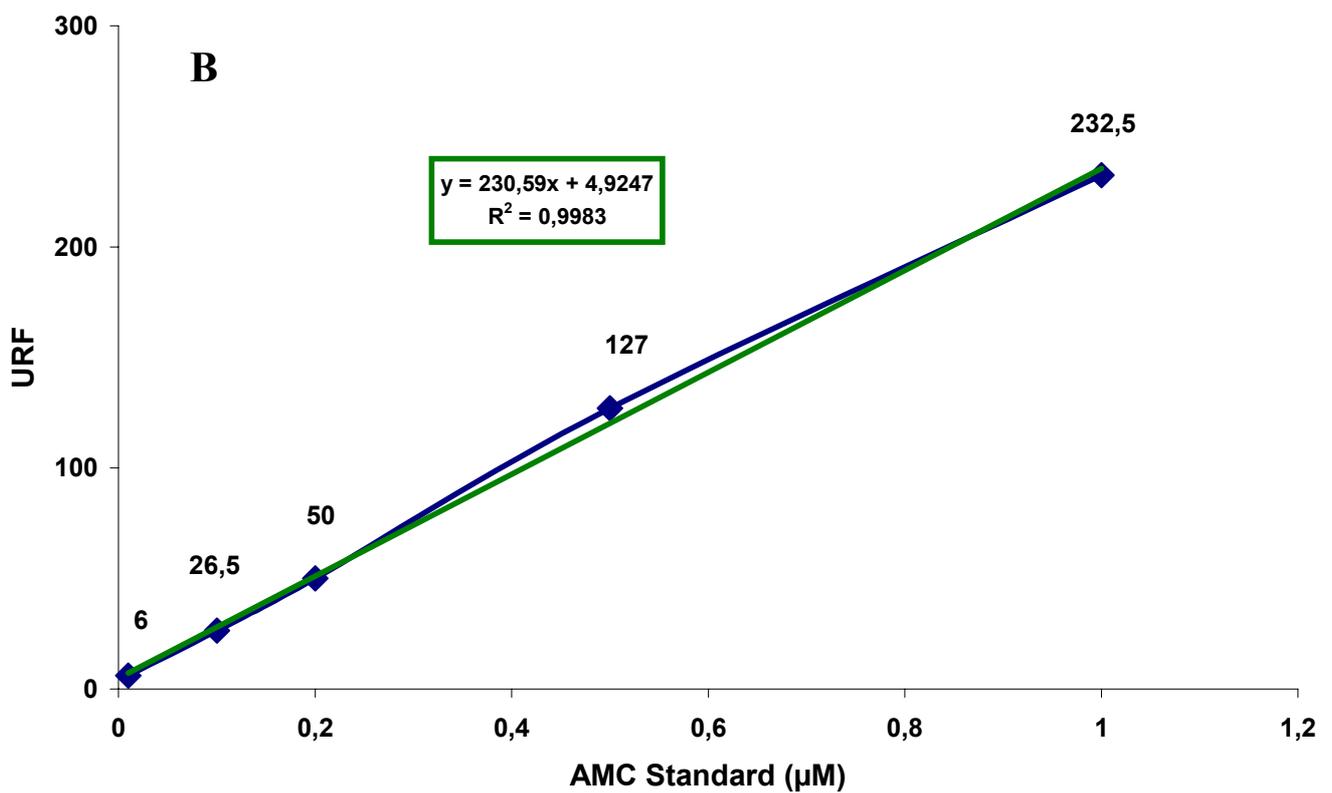
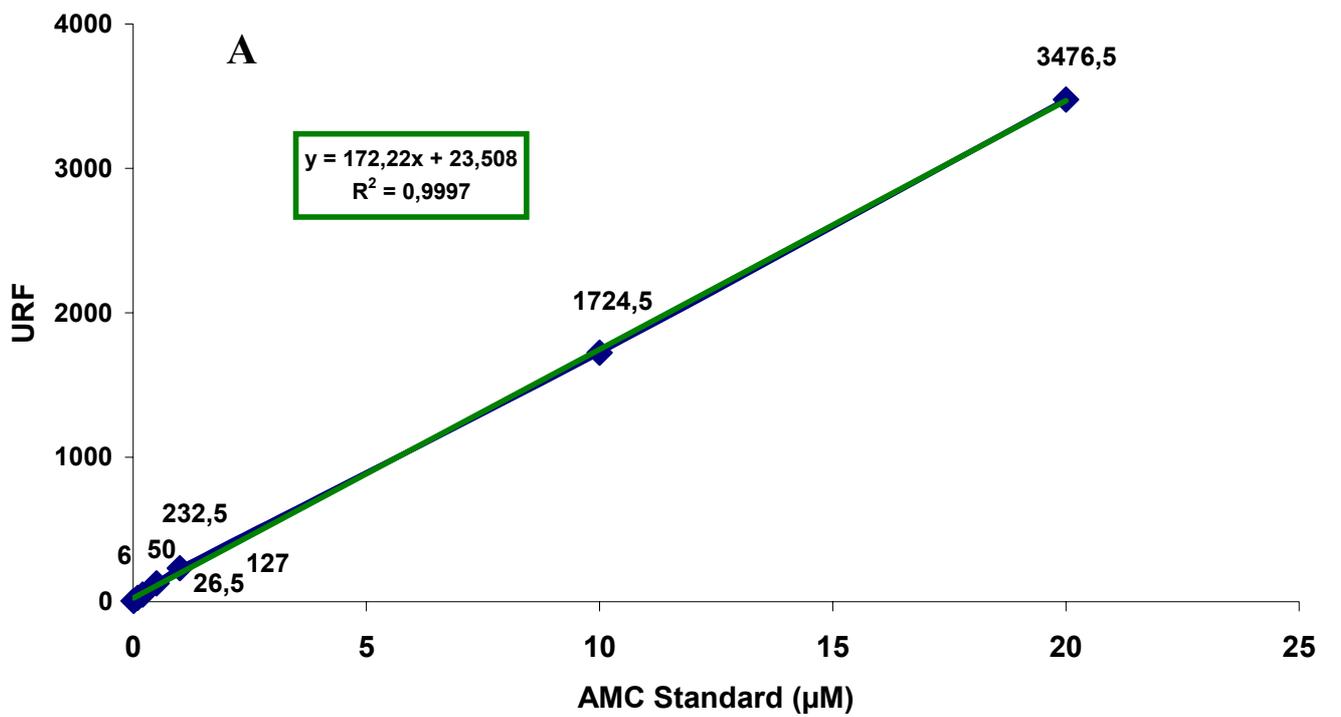


Figure 22 : Calibrage du Spectrofluorimètre.

Amplitude des intensités de fluorescence comprises entre 6 (B) et 3476,5 URF (A) déterminé à partir des différents standard d'AMC.

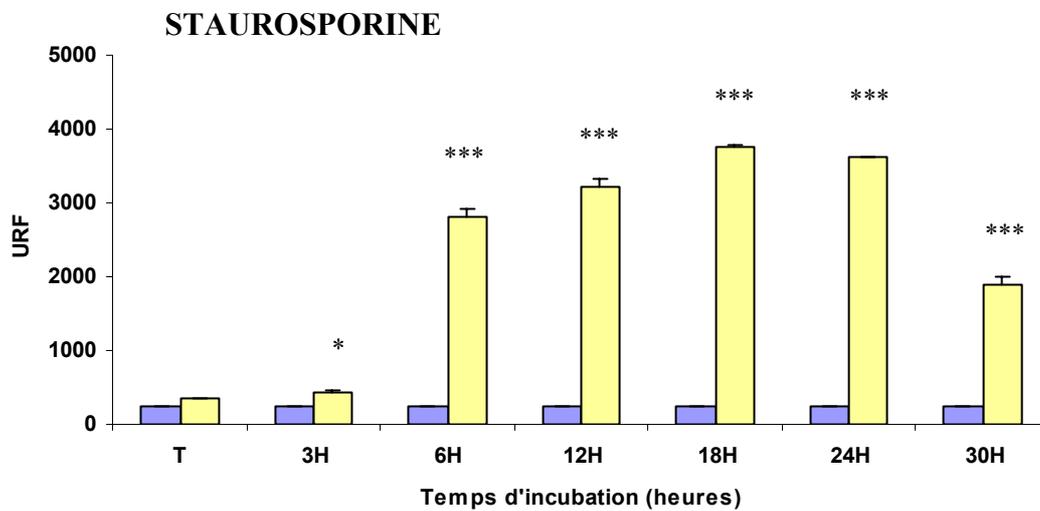
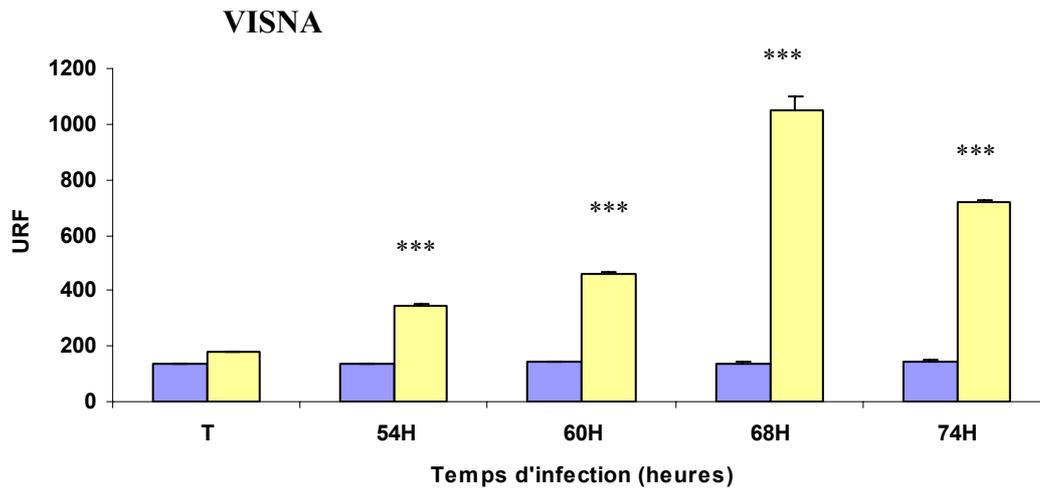


Figure 23 : Dosage de l'activité Caspase-3.

Inhibiteur + Substrat
 Substrat

Les valeurs d'activités sont exprimées en unité relative de fluorescence (URF).

(*) : $P < 0,05$ et (***) : $P < 0,001$.

Si dans les deux cas : (i) infection par le virus Visna et (ii) traitement par la staurosporine, nous avons une activation significative de la caspase-3, nous constatons que :

- la cinétique d'activation de la caspase-3 n'est pas la même en fonction du stimulus considéré : 3 jours dans le cas des cellules infectées et 24 h pour un traitement à la staurosporine.
- au maximum de la réponse, l'activation de la caspase-3 est beaucoup plus forte dans le cas de cellules traitées avec la staurosporine (3767,5 URF à 18 h) que dans le cas de cellules infectées (1049 URF à 68 h post-infection).

L'activité **caspase-1** est décrite comme étant impliquée dans le processus inflammatoire ; elle n'intervient pas dans la mort cellulaire programmée. Nous avons alors recherché l'activité caspase-1 dans notre modèle d'étude.

Pour doser l'activité caspase-1, nous avons utilisé le couple :

- Ac-YVAD-CHO, inhibiteur réversible
- Ac-YVAD-AMC, substrat spécifique.

Nous avons réalisé un dosage sur les mêmes lysats cellulaires que pour la caspase-3. Dans les mêmes conditions expérimentales, infection par le virus Visna (Figure 24) ou traitement par la staurosporine (Figure 24), aucune activation significative de la caspase-1 n'est mise en évidence.

VII. Mise en évidence des différentes voies de transduction du signal induites

VII.1. Voies dépendantes des caspases : la voie de la mitochondrie

VII.1.1. Etude de la libération du cytochrome c :

Dans le cas de cellules infectées ou traitées par la staurosporine, aucune fluorescence n'a été observée. L'anticorps utilisé ne nous a pas permis de mettre en évidence une libération du cytochrome c de la mitochondrie.

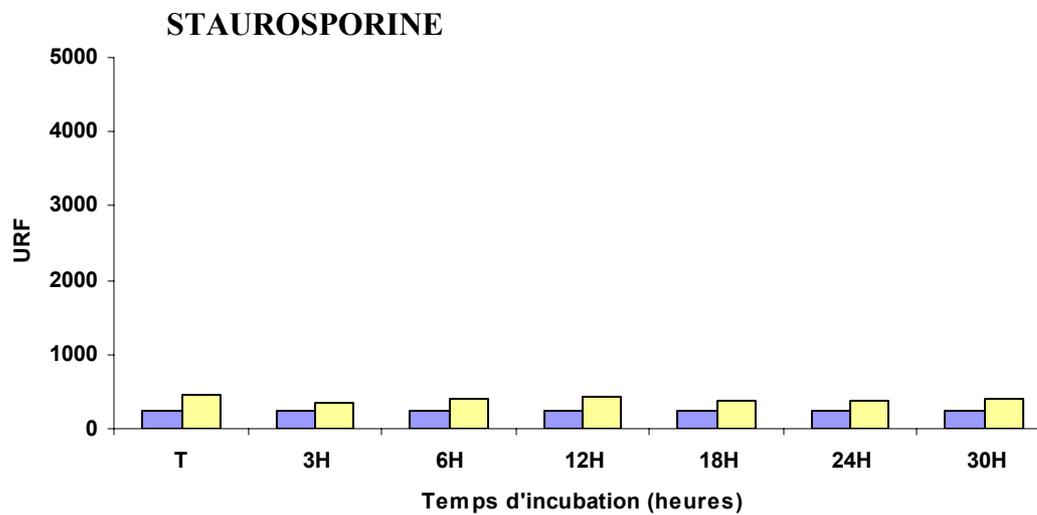
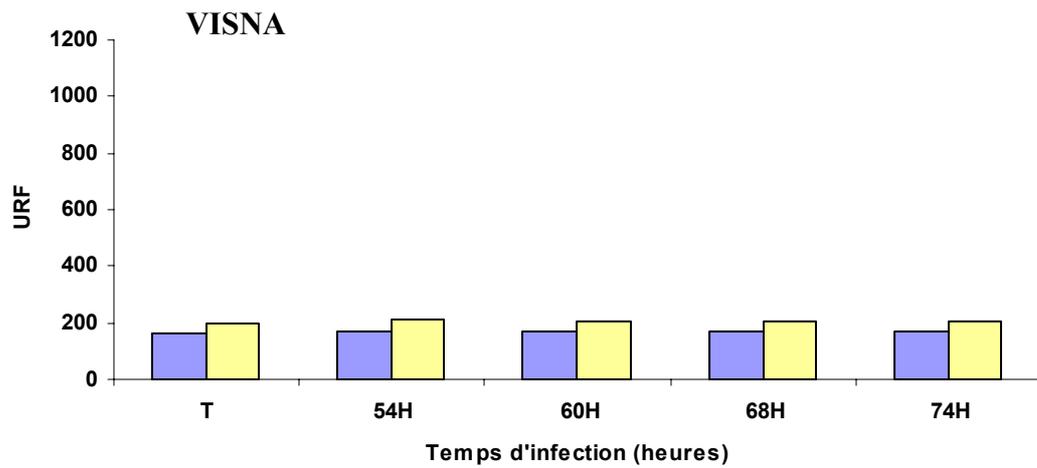


Figure 24 : Dosage de l'activité Caspase-1.



Les valeurs d'activités sont exprimées en unité relative de fluorescence (URF).

VII.1.2. Dosage de l'activité caspase-9 :

L'activation de la caspase-9 apparaît suite à la formation de l'apoptosome. Le cytochrome c est une des protéines indispensables à la réalisation de ce complexe.

Pour cela nous avons utilisé le même kit de dosage que celui des activités caspases-3 et -1, mais en substituant le couple substrat-inhibiteur, par celui spécifique de la **caspase-9** :

- Ac-LEHD-CHO, inhibiteur réversible
- Ac-LEHD-AMC, substrat spécifique.

L'activation de la caspase-9 a été recherchée sur les mêmes lysats cellulaires utilisés que pour les caspases -3 et -1.

Dans le cas de cellules infectées, l'activité caspase-9 augmente en fonction du temps d'infection. Elle est significative dès 54 h de traitement, avec 219 URF, passe par un maximum à 68 h post-infection, 299,5 URF, puis diminue après 74 h, 225 URF (Figure 25).

Dans le cas de cellules traitées par la staurosporine, l'activité caspase-9 augmente en fonction du temps de traitement. Elle est significative dès 3 h de traitement avec 300 URF, atteint un maximum à 18 h, 638 URF, puis diminue après 24 h, 597 URF à 24 h et 490,5 URF à 30 h (Figure 25).

Quelles que soient les conditions, cellules infectées par le virus Visna ou traitées avec la staurosporine, l'évolution de l'activation de la caspase-9 est comparable à celui de la caspase-3. Cependant, les intensités de fluorescence sont plus faibles avec la caspase-9, par rapport à celles de la caspase-3.

VII.2. Voies dépendantes des caspases : la voie des récepteurs

VII.2.1. Dosage de l'activité caspase-8

Nous avons recherché si l'autre voie dépendante des caspases, celle qui implique l'activation de la caspase-8, est induite dans notre système. Comme précédemment pour la caspase-9, nous avons adapté le même protocole, les mêmes lysats, mais en choisissant un couple substrat-inhibiteur spécifique de la caspase-8 :

- Ac-IETD-CHO, inhibiteur réversible
- Ac-IETD-AMC, substrat spécifique.

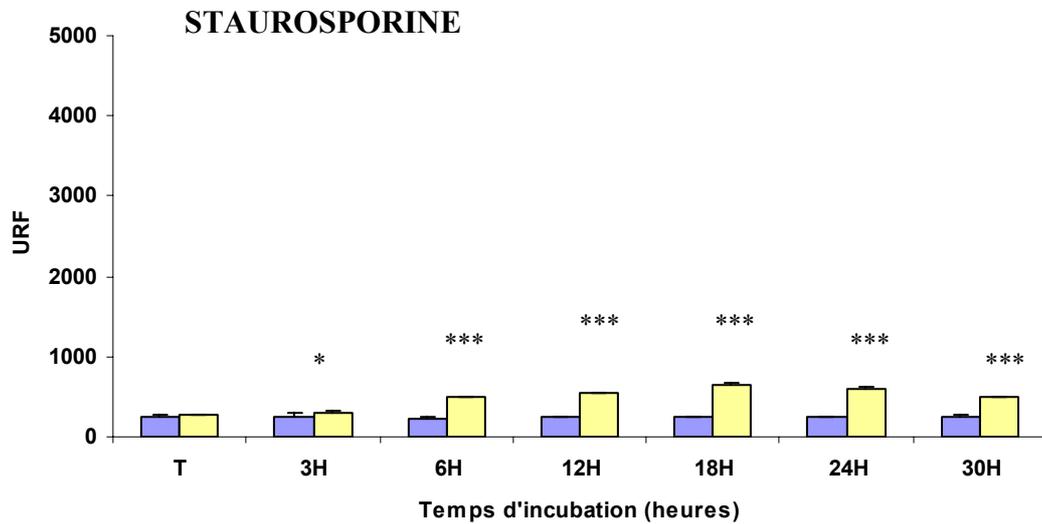
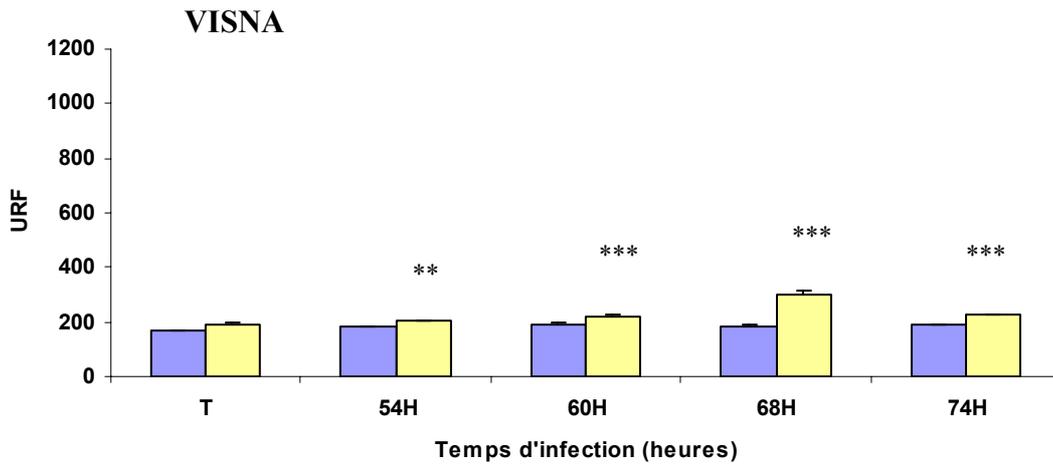


Figure 25 : Dosage de l'activité Caspase-9.



Les valeurs d'activités sont exprimées en unité relative de fluorescence (URF).

(*) : $P < 0,05$; (**) , $P < 0,01$ et (***) : $P < 0,001$.

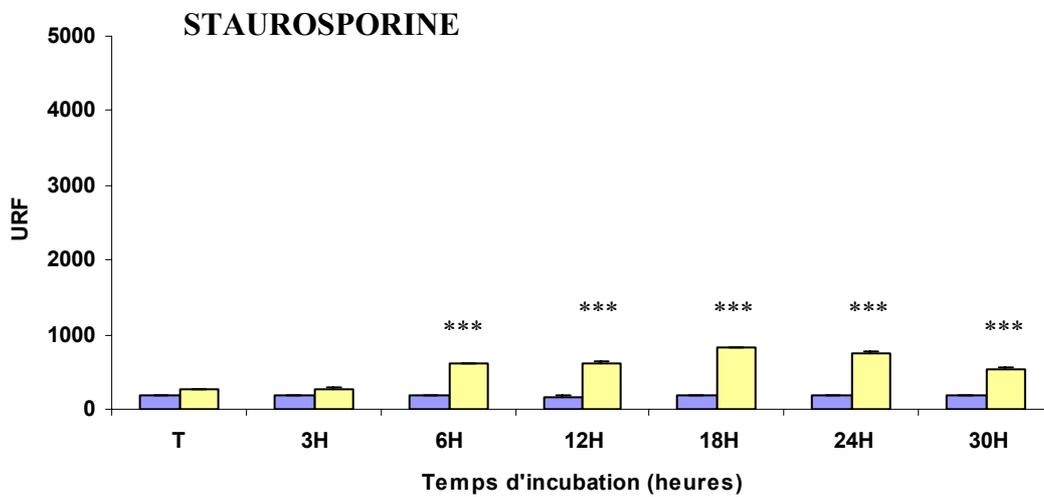
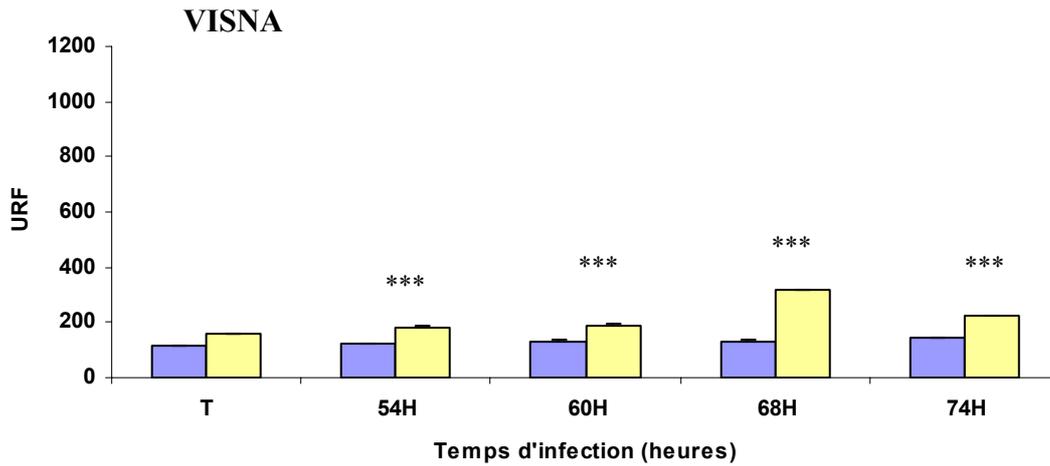


Figure 26 : Dosage de l'activité Caspase-8.



Les valeurs d'activités sont exprimées en unité relative de fluorescence (URF).
 $P < 0,001$ (***)

Dans le cas de cellules infectées, l'activité caspase-8 augmente en fonction du temps d'infection. Elle est significative dès 54 h d'infection, avec 189 URF, passe par un maximum à 68 h post-infection, 318,5 URF, puis diminue avec 223 URF à 74 h (Figure 26).

Dans le cas de cellules traitées par la staurosporine, l'activité caspase-8 augmente en fonction du temps. Elle est significative à partir de 6 h de traitement avec 607 URF, atteint un maximum à 18 h de traitement, 819 URF, puis diminue avec respectivement 759 URF et 545,5 URF à 24 h et 30 h (Figure 26).

Là aussi, nous constatons que le profil d'activation de la caspase-8 suit celui de la caspase-3. Et de la même façon les intensités de fluorescence obtenues sont plus faibles dans le cas de l'activité caspase-8, comparé à celles de l'activité caspase-3. Nous observons aussi que les profils d'activation des caspases-9 et -8 ne sont pas tout à fait identiques : l'activité caspase-8 est significative à partir de 6 heures de traitement, l'activité caspase-9 est significative dès 3 heures de traitement.

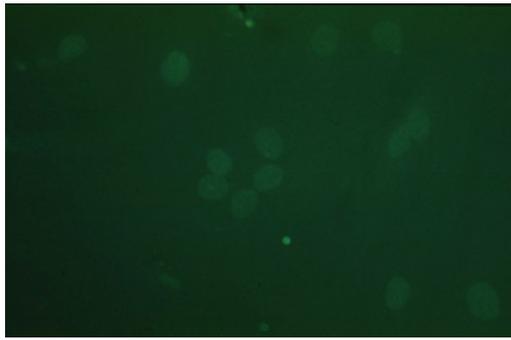
VII.3. Voie indépendante des caspases : la voie de l'AIF

Lors de la stimulation de la mitochondrie plusieurs molécules apoptogènes sont libérées dans le cytosol. Parmi celles-ci, l'AIF est impliqué dans un processus indépendant de l'activation des caspases. Nous avons révélé la libération de l'AIF par un marquage *in situ* à l'aide d'un anticorps anti-AIF.

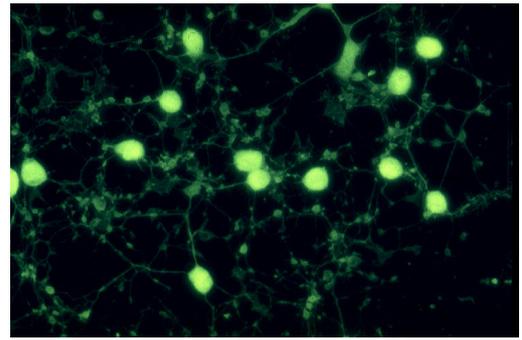
Les cellules non infectées ne présentent aucune fluorescence (Figure 27A).

Dans le cas de cellules infectées, à différents temps d'infection, la libération de l'AIF est mise en évidence par l'observation d'une fluorescence. Cellules individuelles (Figure 27C et 27D) et syncytia sont marqués et témoignent d'une libération d'AIF (Figure 27E).

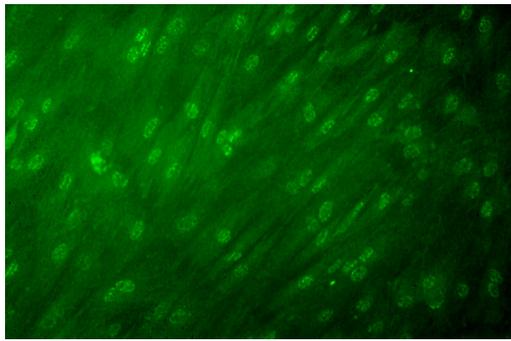
Dans le cas du traitement par la staurosporine, l'intensité de fluorescence est plus importante (Figure 27B).



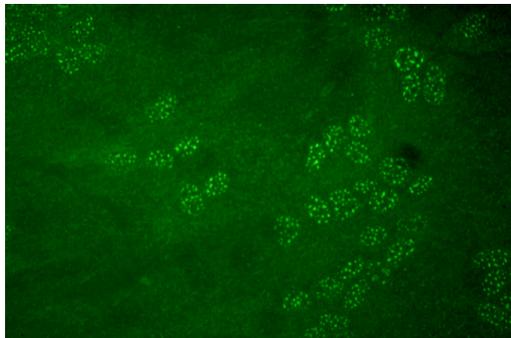
A



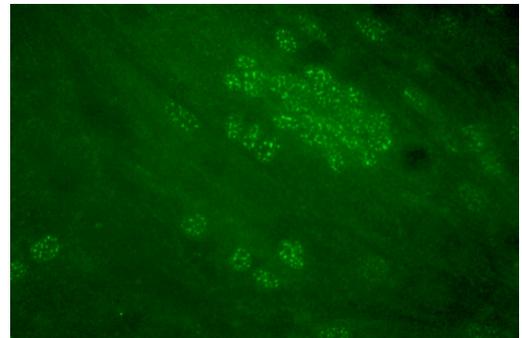
B



C



D



E

Figure 27 : Etude de la libération de l'AIF.

(A) Les cellules non infectées ne sont pas marquées.

(B) Les cellules, traitées par la staurosporine fluorescent, l'AIF est libéré.

A 52 h post-infection, les cellules individuelles (C, D) et les syncytia (E) sont marqués.

Grossissement : B, D et E x 400 ; C x 200.

VIII. Implication des caspases au cours de l'infection par le virus Visna

Après avoir décelé l'activation de plusieurs caspases au cours du processus apoptotique Visna-induit, nous avons voulu déterminer l'implication de ces activités lors du cycle infectieux sur des cellules en culture. En effet, précédemment pour dépister les activités caspases sur des lysats cellulaires, nous avons utilisé des inhibiteurs réversibles en présence de leur substrat respectif.

Maintenant nous employons des **inhibiteurs irréversibles** de caspases, c'est à dire qu'ils pénètrent naturellement les membranes cellulaires et complexent les caspases actives en formant des liaisons irréversibles avec le site catalytique de chaque caspase. L'utilisation de ces inhibiteurs irréversibles doit nous permettre de rechercher l'impact des caspases au cours de l'ECP Visna-induit.

Dans un premier temps, nous avons testé la spécificité de chaque inhibiteur irréversible, dans des lysats cellulaires recueillis. Puis dans un deuxième temps, nous avons recherché l'impact de ces inhibiteurs sur l'ECP, dans les cellules en culture.

VIII.1. Le z-DEVD-FMK et le z-VAD-FMK inhibent les activités caspases

Trois inhibiteurs irréversibles :

- z-DEVD-FMK,
- z-VAD-FMK,
- z-YVAD-FMK

ont été testés respectivement, sur chaque activité caspase, -3, -8 et -9, pour déterminer leur spectre d'inhibition respectif sur lysats cellulaires. Pour ce faire nous nous sommes servis du même kit de dosage «CaspACE Assay System, Fluorometric», en l'adaptant à notre recherche. Ainsi nous avons employé les mêmes substrats déjà utilisés précédemment :

- Ac-DEVD-AMC, pour la caspase-3,
- Ac-IETD-AMC, pour la caspase-8,
- Ac-LEHD-AMC, pour la caspase-9.

Les inhibiteurs réversibles de type Ac-XXXD-CHO sont remplacés par les inhibiteurs irréversibles de type z-XXXD-FMK parmi lesquels le z-VAD-FMK, un motif peptidique nouvellement testé. C'est le groupement -FMK qui est responsable de la liaison irréversible de ces inhibiteurs au site catalytique des caspases.

Dans les lysats de cellules non-infectées (T), quel que soit l'inhibiteur ou le substrat considéré nous décelons une intensité résiduelle de fluorescence (Figures 28.1, 28.2 et 28.3).

Dans le cas de cellules infectées, en présence des substrats spécifiques, à nouveau nous montrons que les trois activités caspases (-3, -8 et -9) sont significatives (Figures 28.1, 28.2 et 28.3). Ces activités sont détectées dès 54 h post-infection, (310,5 URF pour la caspase-3 ; 201 URF pour la caspase-8 ; 215 URF pour la caspase-9), augmentent jusqu'à un maximum à 68 h (1018,5 URF pour la caspase-3 ; 232,5 URF pour la caspase-8 ; 236 URF pour la caspase-9), puis diminuent après 74 h (479,5 URF pour la caspase-3 ; 195 URF pour la caspase-8 ; 202 URF pour la caspase-9).

En présence de l'inhibiteur **z-DEVD-FMK**, l'activité caspase-3 est efficacement inhibée (Figure 28.1) ; mais nous constatons que les activités caspase-8 et -9 le sont également, avec des intensités de fluorescence similaires et inférieures à 200 URF.

En présence de l'inhibiteur à large spectre **z-VAD-FMK**, les trois activités caspases (-3, -8 et -9) sont efficacement inhibées (Figure 28.2), avec des intensités de fluorescence similaires et inférieures à 200 URF.

En présence de l'inhibiteur **z-YVAD-FMK**, aucune des trois activités caspases (-3, -8 et -9) n'est réprimée (Figure 28.3), les intensités de fluorescences sont similaires quelle que soit la condition «substrat» ou «inhibiteur + substrat».

Nous sommes donc en présence de deux types distincts d'inhibiteurs : le premier, tels que le z-DEVD-FMK et le z-VAD-FMK bloquent les trois caspases apoptotiques testées ; et le second, z-YVAD-FMK, n'a aucun effet sur ces trois caspases.

VIII.2. Le z-DEVD-FMK et le z-VAD-FMK retardent l'ECP induit par le virus Visna sur les cellules de PC infectées

Ici, nous voulons déterminer si l'activation des caspases joue un rôle dans l'ECP Visna-induit. Pour cela nous avons traité des cultures de cellules infectées avec les inhibiteurs irréversibles, et suivi l'évolution de la libération de la LDH, témoin de la lyse cellulaire.

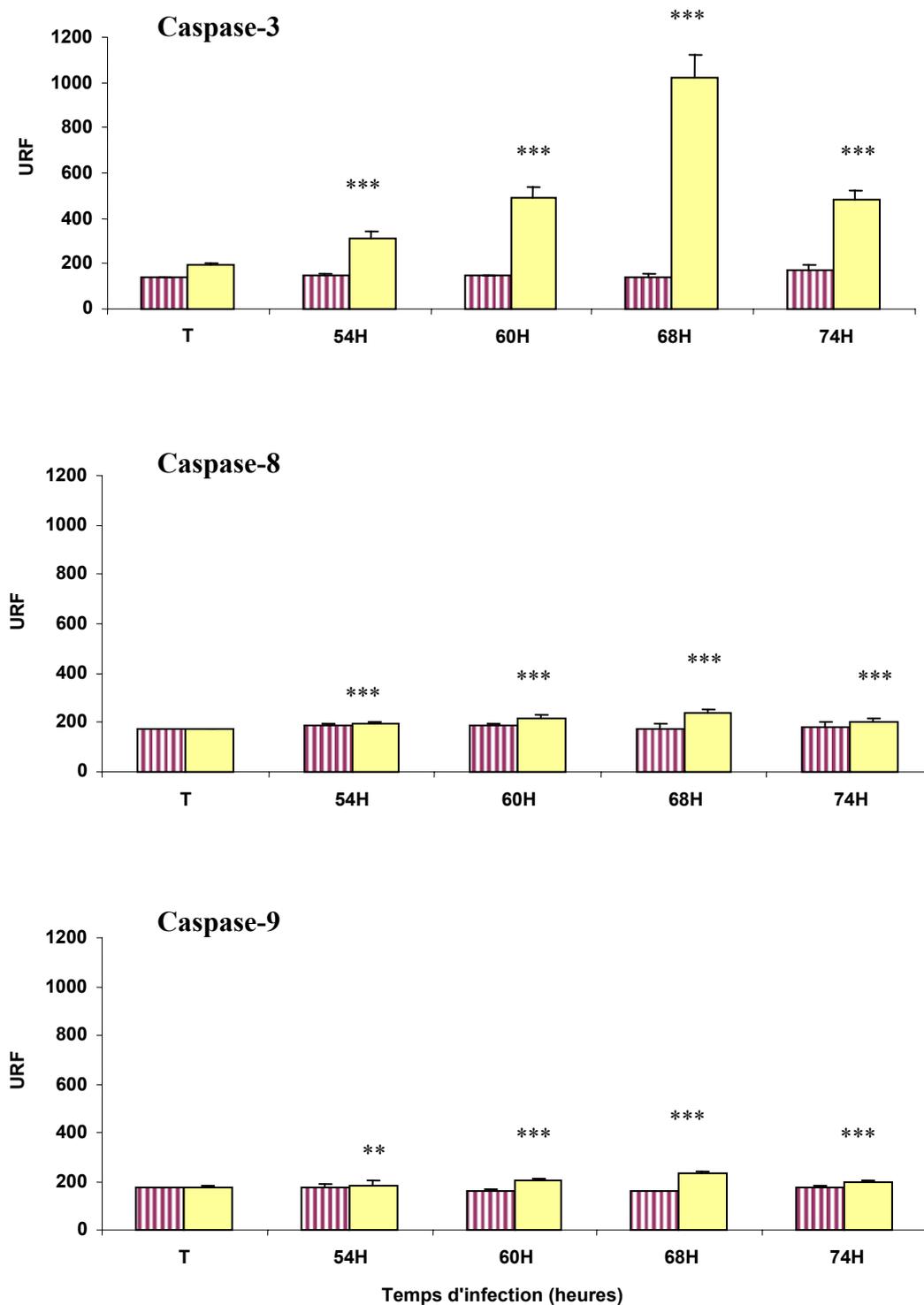


Figure 28.1 : Spectre d'inhibition du z-DEVD-FMK.

 **Inhibiteur + Substrat**
 **Substrat**

(**) : $P < 0,01$; (***) : $P < 0,001$.

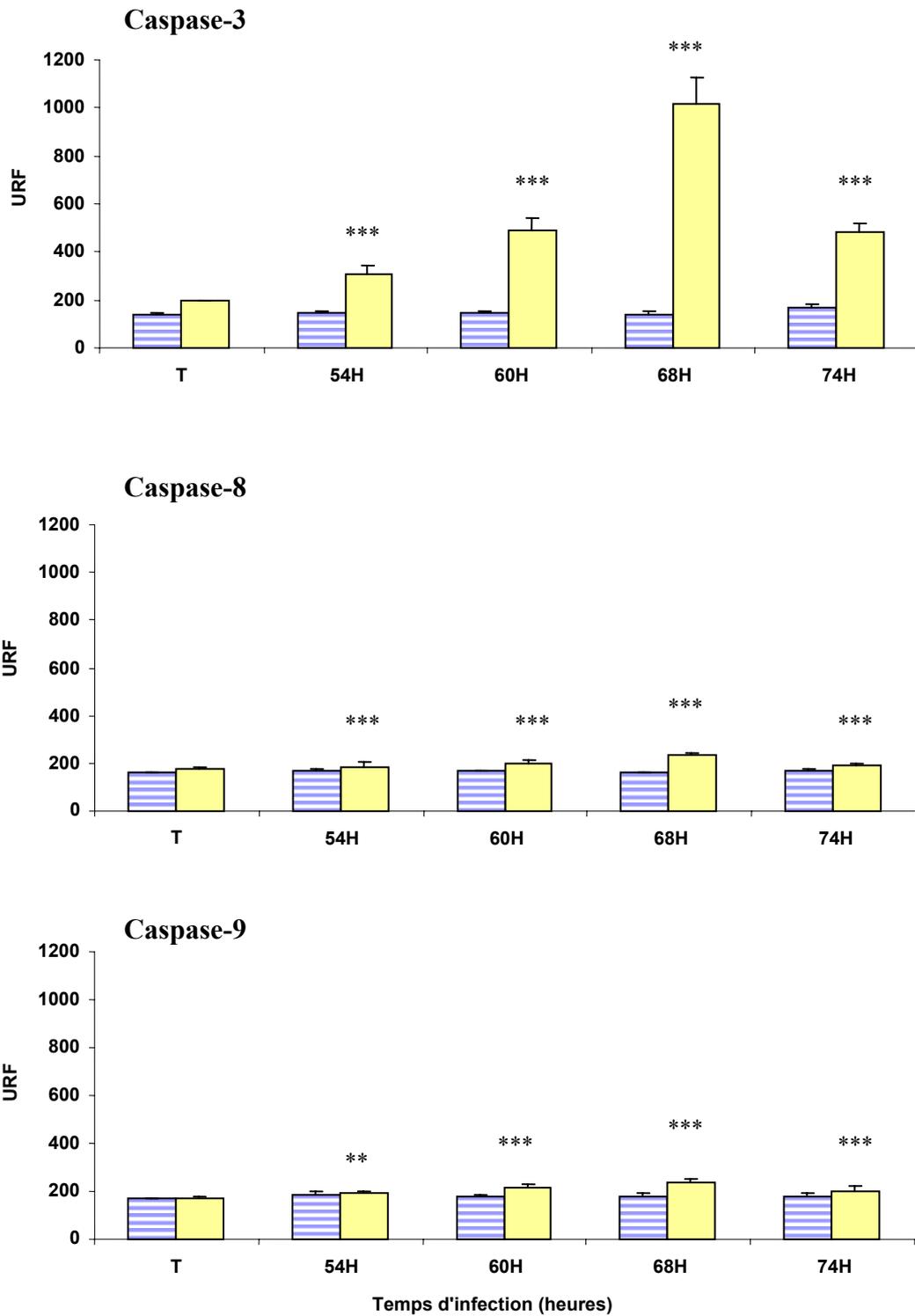


Figure 28.2 : Spectre d'inhibition du z-VAD-FMK.



Inhibiteur + Substrat



Substrat

(**) : $P < 0,01$; (***) : $P < 0,001$.

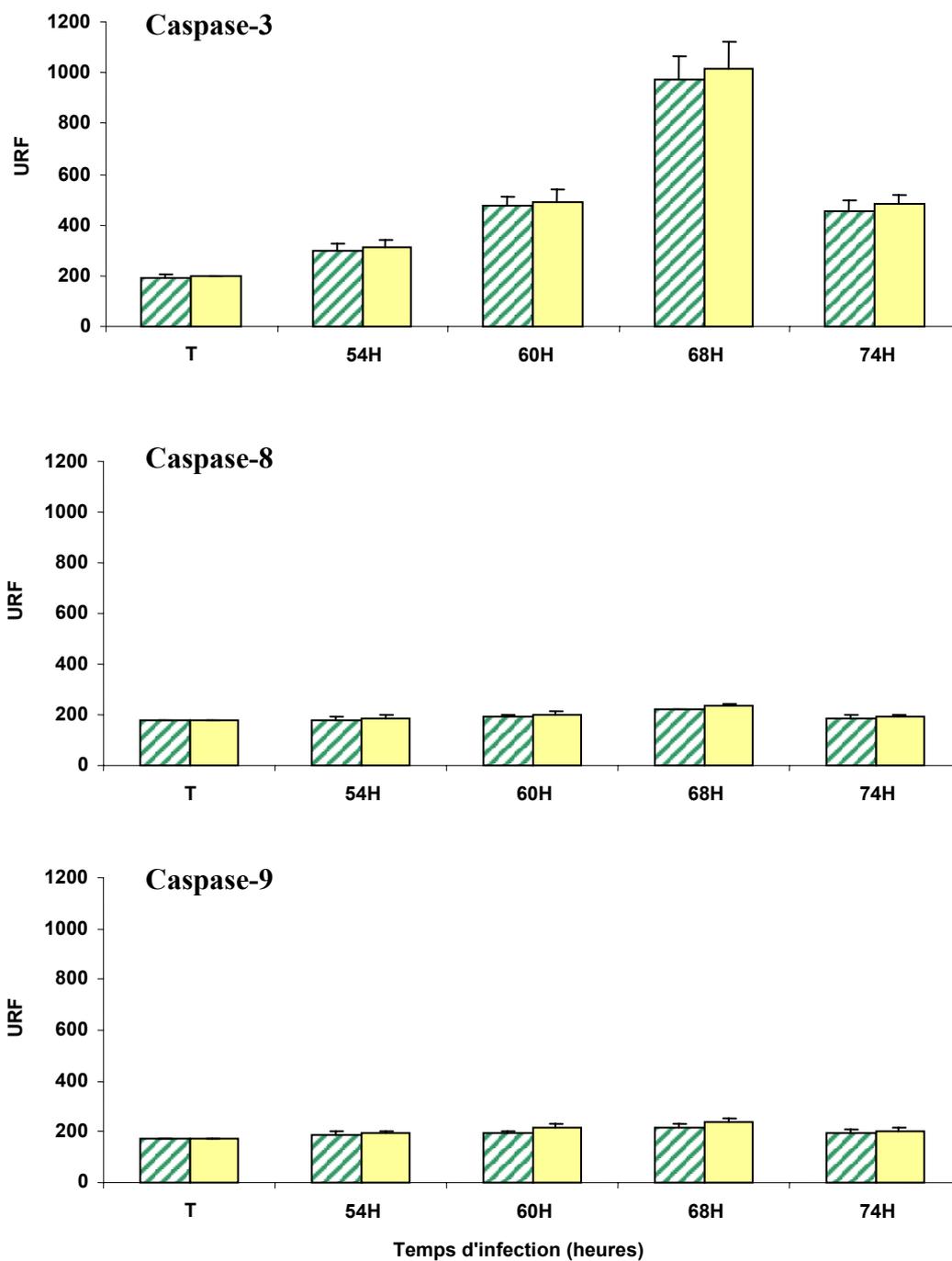


Figure 28.3 : Spectre d'inhibition du z-YVAD-FMK.



Inhibiteur + Substrat



Substrat

Les cellules sont infectées ou non, et traitées dans le même temps avec le z-DEVD-FMK, le z-VAD-FMK ou le z-YVAD-FMK. Considérons tout d'abord les résultats obtenus à la concentration en inhibiteur retenue dès le départ, à savoir $5.10^{-5}M$. La cinétique de libération de la LDH est mesurée dans les différents surnageants de culture (Figures 29.1, 29.2 et 29.3) et nous permet de calculer les valeurs de cytotoxicité correspondantes (Tableau 12).

Premièrement, aucune libération spontanée significative de LDH n'apparaît dans les surnageants de cellules non infectées (λ) tout au long de l'expérience (Figures 29.1, 29.2 et 29.3) : les taux de cytotoxicité n'excèdent jamais 5,5% (Tableau 12).

Deuxièmement, quel que soit l'inhibiteur considéré, z-DEVD-FMK, le z-VAD-FMK ou le z-YVAD-FMK, il n'y a pas de différence entre les taux de LDH détectés dans les surnageants de cellules non infectées (λ), et ceux de cellules non-infectées et traitées avec les inhibiteurs (σ) (Figures 29.1, 29.2 et 29.3). Quel que soit l'inhibiteur considéré, les allures des courbes (λ) et (σ) sont superposables, montrant que les inhibiteurs n'induisent pas de libération de LDH.

Troisièmement, la libération de LDH dans les surnageants de cellules infectées et non traitées (υ), atteint un maximum à 120 h (Figures 29.1 et 29.2) ou 144 h post-infection (Figure 29.3).

Quatrièmement, dans le cas de cellules infectées et traitées par le z-DEVD-FMK ou le z-VAD-FMK (ν), la libération de LDH atteint un maximum entre 144 et 168 h post-infection, avec une cytotoxicité maximale de 89,4% pour les cellules traitées avec le z-DEVD-FMK (Figure 29.1, Tableau 13) et 71,5% pour les cellules traitées avec le z-VAD-FMK (Figure 29.2, Tableau 12).

Cinquièmement, dans le cas des cellules infectées et traitées avec un inhibiteur, [z-DEVD-FMK ou z-VAD-FMK (ν)], la libération maximale de LDH est retardée dans les deux cas, comparativement aux profils obtenus avec les cellules infectées non traitées (υ) (Figures 29.1 et 29.2). Ce décalage dans le temps se traduit par une diminution de la cytotoxicité à 120 h, (i) de 98,1 % à 64,7% (Tableau 12) dans le cas du traitement avec le z-DEVD-FMK (Figure 29.1), (ii) de 76,3% à 47 % (Tableau 12) dans le cas du traitement avec le z-VAD-FMK (Figure 29.2).

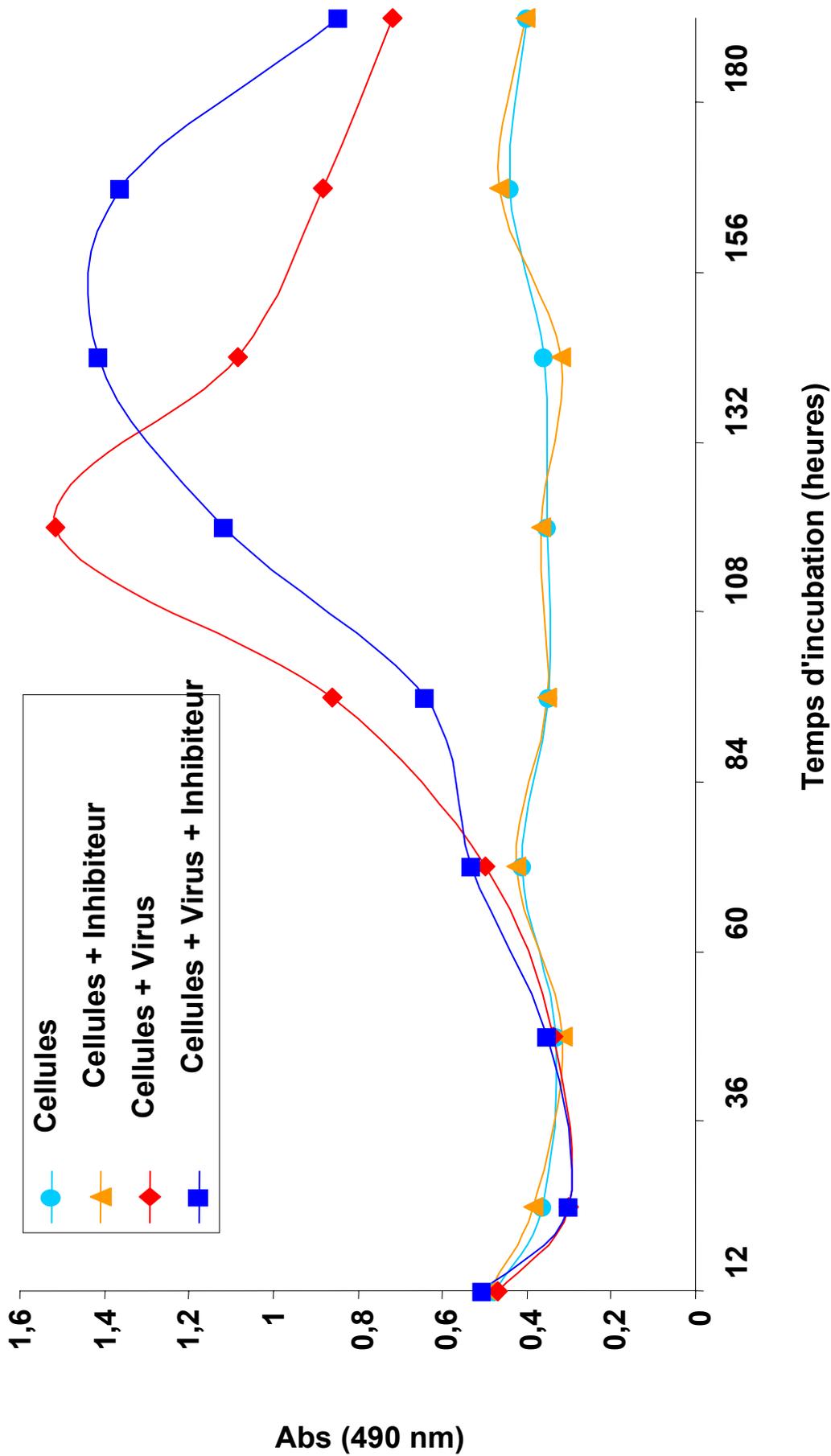


Figure 29.1 : Effet du z-DEVD-FMK (5x10⁻⁵M) sur la cinétique de libération de la LDH.

A différents temps la LDH est mesurée dans les surnageants de culture.

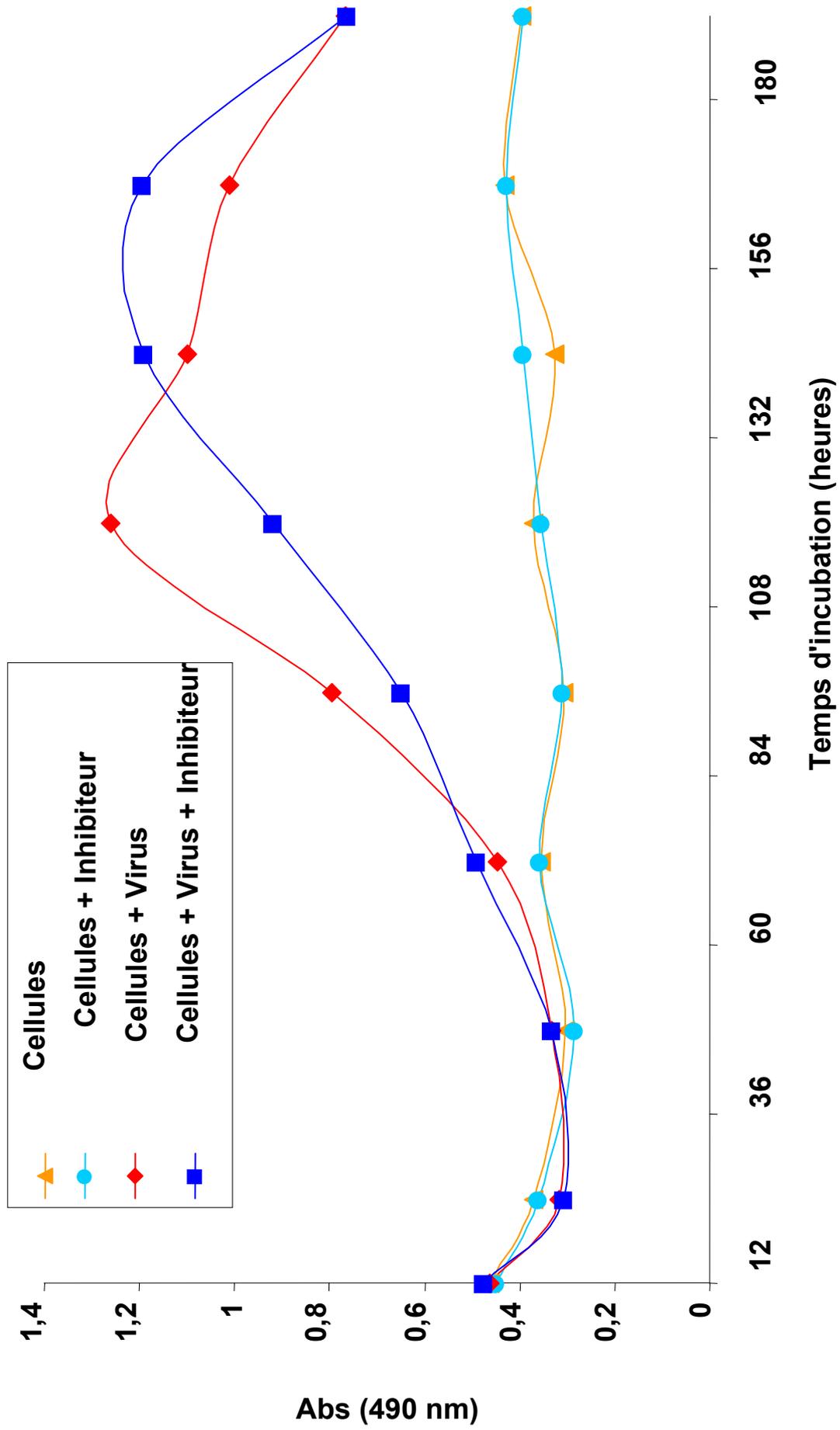


Figure 29.2 : Effet du z-VAD-FMK ($5 \times 10^{-5} \text{M}$) sur la cinétique de libération de la LDH.

A différents temps la LDH est mesurée dans les surnageants de culture.

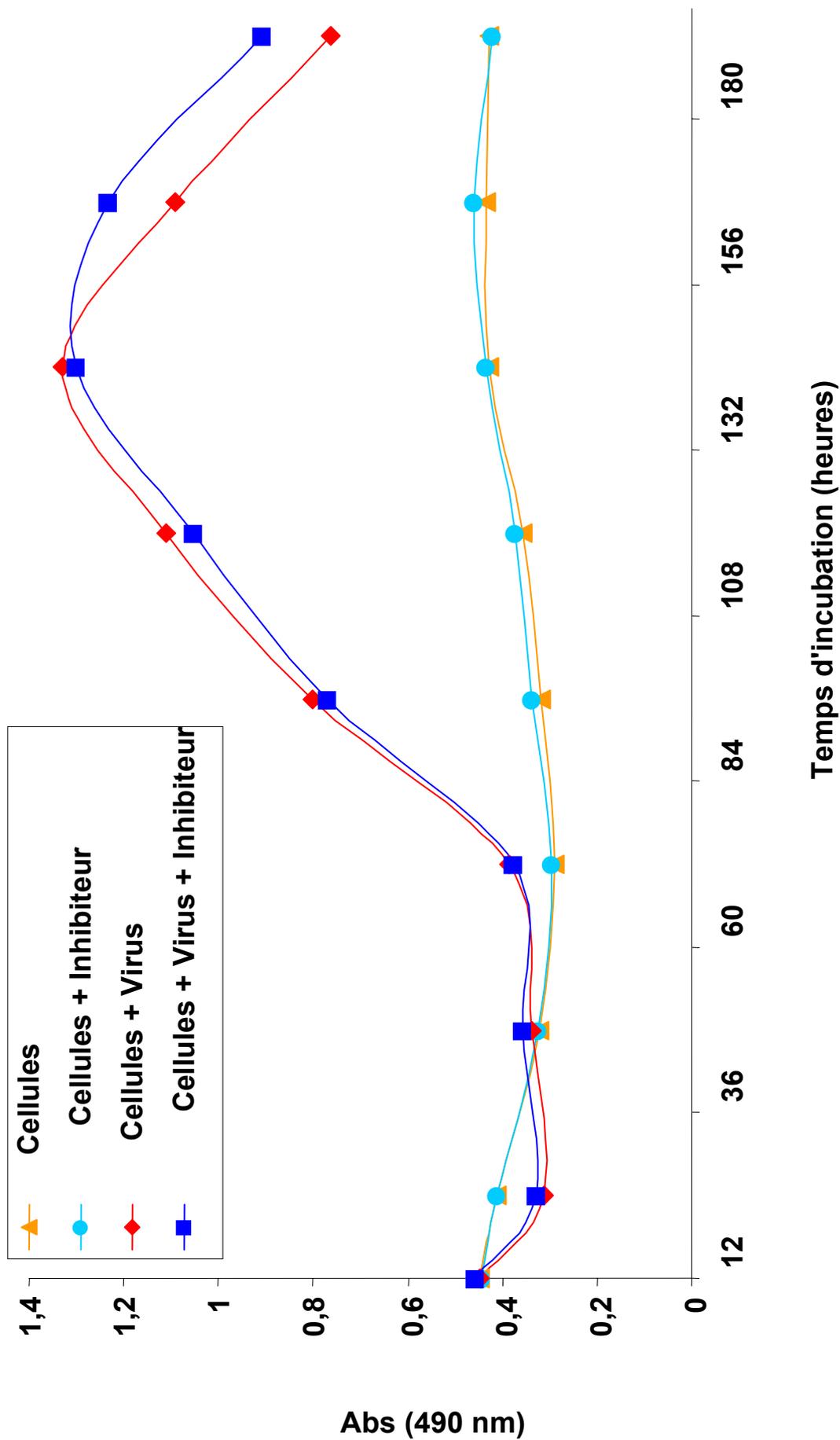


Figure 29.3 : Effet du z-YVAD-FMK ($5 \times 10^{-5} M$) sur la cinétique de libération de la LDH.

A différents temps la LDH est mesurée dans les surnageants de culture.

		Pourcentages de cytotoxicité										
	[Inhibiteur]	12 H	24 H	48 H	72 H	96 H	120 H	144 H	168 H	192 H		
	C/C+V	-0,7	-5,1	0,6	7,7	43,2	98,1	61,7	40,3	27,9		
	C/C+I	79,8										
Z-DEVD-FMK	(10 ⁻⁴ M)	1,4	2,1	-1,2	1,4	0,3	1,5	-3,3	2,3	0,1		
	(5.10 ⁻⁵ M)	-0,3	-0,3	-1,9	-1,9	-0,8	-0,4	-1,1	7,5	0,4		
	(2,5.10 ⁻⁵ M)											
	C+V/C+V+I	94,0										
	C+V/C+V+I	3,3	0,0	1,9	10,6	24,4	64,7	89,4	83,9	39,1		
	C+V/C+V+I	1,4	-0,3	1,9	5,1	27,0	51,6	72,7	77,8	47,6		
	C/C+V	0,0	-4,6	2,2	7,9	39,5	76,3	63,7	52,4	32,5		
	C/C+I	16,1	9,9	1,8	-2,7	3,2	1,5	3,4	7,3	9,5		
Z-VAD-FMK	(10 ⁻⁴ M)	-1,2	-0,9	-1,5	0,3	0,1	-1,6	5,5	0,0	-0,2		
	(5.10 ⁻⁵ M)	-1,2	-1,1	0,0	-6,6	0,2	-2,4	0,1	0,0	1,4		
	(2,5.10 ⁻⁵ M)											
	C+V/C+V+I	23,2	11,2	10,6	8,7	18,6	50,0	94,7	88,1	38,7		
	C+V/C+V+I	1,1	-0,8	2,3	11,5	27,8	47,0	71,5	69,0	32,2		
	C+V/C+V+I	0,7	-0,3	2,3	5,6	35,2	46,1	61,1	64,9	37,2		
	C/C+V	-0,1	-8,7	1,3	7,9	39,5	63,8	79,5	59,4	30,1		
	C/C+I	9,3	4,9	5,7	1,7	3,5	9,0	6,4	7,3	2,4		
Z-YVAD-FMK	(10 ⁻⁴ M)	-0,1	0,2	0,1	0,5	1,4	1,3	0,7	2,3	-0,5		
	(5.10 ⁻⁵ M)	-1,3	-1,0	1,1	-1,3	-0,2	0,5	3,7	7,9	3,1		
	(2,5.10 ⁻⁵ M)											
	C+V/C+V+I	12,1	7,2	8,0	6,6	37,9	55,5	83,0	68,6	59,1		
	C+V/C+V+I	0,9	1,3	2,8	7,0	36,9	58,8	76,5	72,3	43,3		
	C+V/C+V+I	0,3	-0,2	1,3	9,3	35,8	57,6	81,4	66,2	49,9		

Tableau 12 : Evolution de la cytotoxicité.

Les valeurs de cytotoxicité sont exprimées en pourcentage selon la formule développée dans Matériels et Méthodes

C : cellules ; V : virus ; I : inhibiteur.

Sixièmement, dans le cas de cellules infectées et traitées avec le z-YVAD-FMK (v), la libération de LDH n'est pas retardée (Figure 29.3). Il n'y a pas de décalage dans le temps : les profils des deux courbes : (v) et (v), sont similaires (Figure 29.3). Le z-YVAD-FMK n'a aucun effet sur la cinétique de libération de la LDH, ni sur les valeurs de cytotoxicité (Tableau 12).

Par conséquent, seuls les inhibiteurs de caspases apoptotiques : le z-DEVD-FMK et le z-VAD-FMK, retardent le pic de libération de la LDH.

Nous avons comparé l'influence de la **concentration en inhibiteur** sur la cytotoxicité dans toutes les conditions expérimentales (Tableau 12).

Tout d'abord, quelle que soit la concentration en z-YVAD-FMK testée (10^{-4} M à $2,5 \times 10^{-5}$ M), il n'y a pas de variation notable de la cytotoxicité, quel que soit le temps de traitement testé.

A 1×10^{-4} M, le z-DEVD-FMK entraîne une libération très rapide de la LDH, avec une augmentation de la cytotoxicité à 79,8% dès 12 h de traitement, ce qui ne nous a pas permis de poursuivre la cinétique, le tapis cellulaire étant lysé. A 1×10^{-4} M, le z-VAD-FMK entraîne une légère cytotoxicité égale 16,1% dès 12 h de traitement.

Pour les inhibiteurs z-DEVD-FMK et z-VAD-FMK, il n'y a pas de réelles différences de valeurs de cytotoxicité entre les deux concentrations $2,5 \times 10^{-5}$ M et 5×10^{-5} M.

Aux vues de ces résultats, nous avons conservé les deux inhibiteurs actifs z-DEVD-FMK et z-VAD-FMK, à la concentration de 5×10^{-5} M.

VIII.3. Le z-DEVD-FMK et le z-VAD-FMK diminuent le nombre de particules virales libérées au cours de l'infection par le Visna

Nous avons alors voulu déterminer si l'inhibition des caspases par le z-DEVD-FMK ou le z-VAD-FMK, a un effet sur la libération des particules virales. Pour cela, à partir des mêmes surnageants ayant servi au dosage de la libération de la LDH, nous avons titré le virus au cours de la cinétique.

Nous observons sur la figure 30A, un pic de libération de particules virales à 120 h (v). Le traitement par le z-DEVD-FMK (v) abaisse la $DICC_{50}$ de $6,4 \cdot 10^7$ à $2,2 \cdot 10^7$, correspondant à une diminution de 65,6% du titre infectieux.

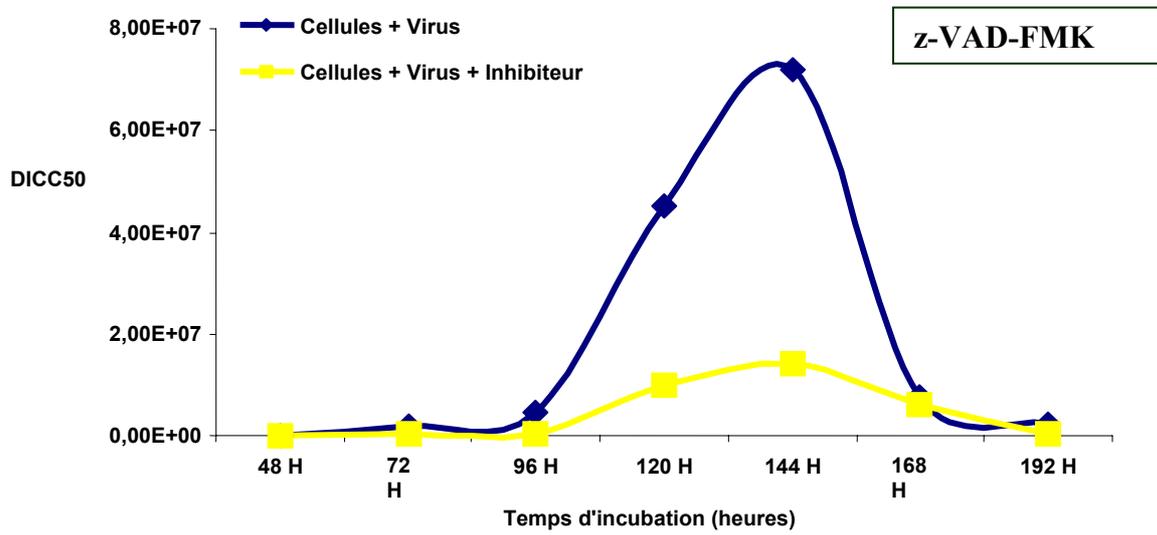
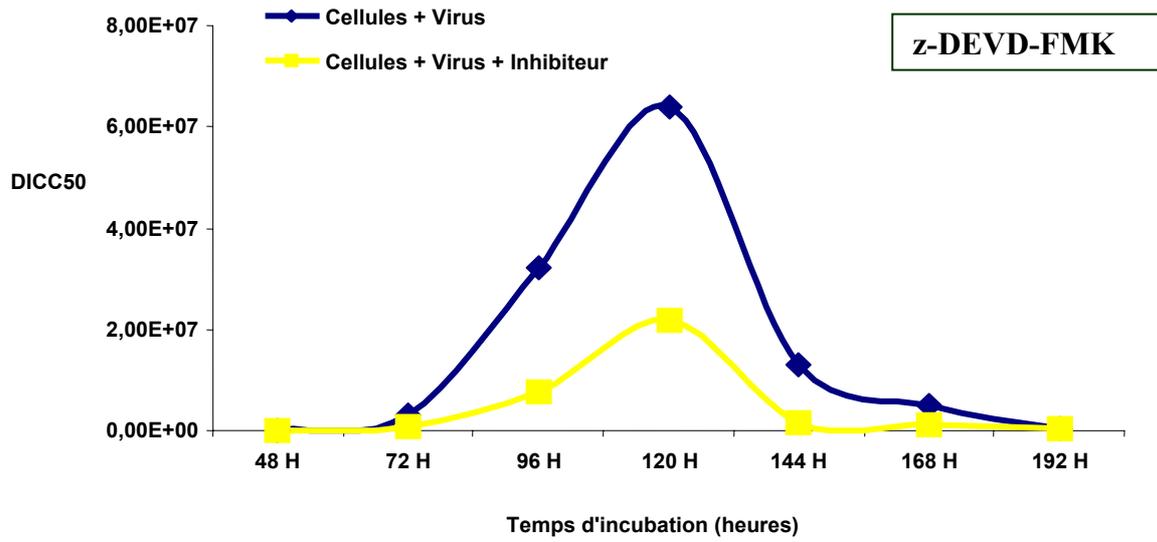


Figure 30 : Effet des inhibiteurs de caspases sur le titre viral (DICC₅₀).

Sur la figure 30B, le pic de libération des particules virales (v) se situe à 144 h post-infection. Le traitement par le z-VAD-FMK (v) abaisse la DIC50 de $7,2 \cdot 10^7$ à $1,4 \cdot 10^7$, correspondant à une diminution de 80,5% du titre infectieux.

Ces résultats suggèrent que les deux inhibiteurs irréversibles utilisés diminuent la libération de particules virales.

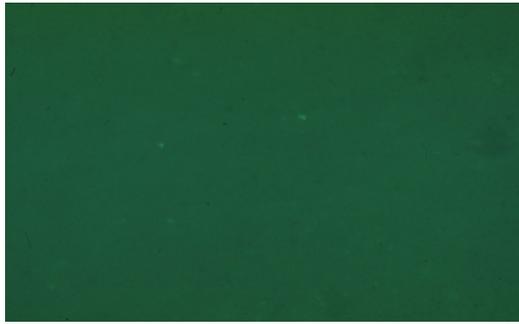
VIII.4. Marquage *in situ* des activités caspases

Ici nous avons utilisé un inhibiteur ayant le même motif peptidique que l'inhibiteur à large spectre z-VAD-FMK, mais qui est couplé à un fluorochrome (FITC), permettant un marquage *in situ* des cellules qui possèdent des caspases actives, en se complexant à leur site catalytique.

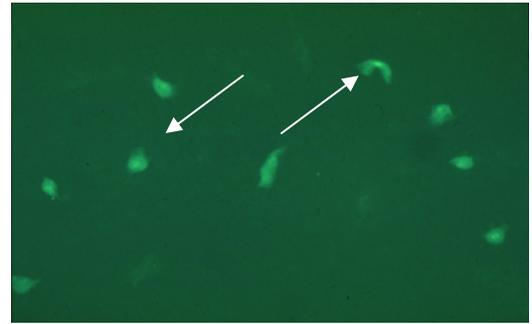
Les cellules non infectées ne présentent pas de fluorescence verte, preuve qu'elles n'ont pas de caspases actives (Figure 31A).

Dès 60 h post-infection, nous décelons des cellules fluorescentes, marquées au FITC. A 64 h post-infection, de nombreuses cellules développent cette fluorescence (Figure 31B). A 68 h, un plus grand nombre de cellules sont marquées, et la fluorescence verte devient plus intense au niveau des noyaux des cellules apoptotiques (Figure 31C).

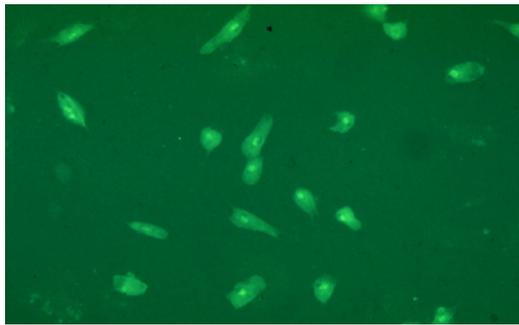
Par la mise au point d'un double marquage, FITC-VAD-FMK et DAPI, nous montrons qu'il y a corrélation entre les cellules à fluorescence verte, et les noyaux avec une fluorescence bleue intense (Figures 31B et 31D, flèches). Ainsi, les cellules qui sont marquées par le FITC-VAD-FMK, qui possèdent donc une/des activité(s) caspase(s), exhibent aussi une « morphologie DAPI » caractéristique (modification de la morphologie des noyaux associée à une fluorescence accrue). Cependant, les cellules avec une faible fluorescence bleue résiduelle ne sont pas marquées au FITC : elles ne sont pas en apoptose.



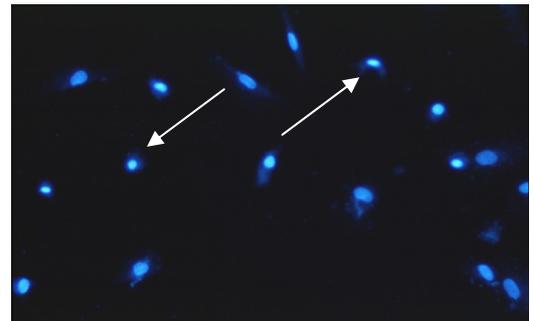
A



B



C



D

Figure 31 : Marquage *in situ* des activités caspases.

(A) Les cellules non infectées ne sont pas marquées par le FITC-VAD-FMK.

(B) A 64 h post-infection, des cellules sont marquées.

(C) A 68 h, toutes les cellules sont marquées, avec une fluorescence accrue au niveau des noyaux.

(B) et (D) montrent le même champ optique. Les cellules avec un noyau apoptotique (coloration au DAPI, D) possèdent des caspases actives (marquage FITC, B) (flèches).

Grossissement x 200.

DISCUSSION

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée, naturel, génétiquement contrôlé, qui est vital pour le développement et la survie des organismes pluricellulaires. L'apoptose peut être induite en réponse à un très grand nombre de stimuli tels que les radiations (U.V., irradiation gamma), des agents endommageant l'ADN, des antibiotiques (staurosporine, génistéine...) (Kroemer et al., 1997), des bactéries ou des virus (ADN ou ARN) (O'Brien, 1998).

Dans le cas de cellules infectées par des virus, l'induction d'une mort cellulaire précoce limiterait fortement la production de particules virales et réduirait ou empêcherait la dissémination des virus à l'intérieur de l'hôte. La plupart des virus ont donc développé des stratégies afin d'échapper ou de retarder cette apoptose précoce pour permettre la production de taux élevés de virus. Mais suivant le virus considéré, les mécanismes d'interaction avec le processus apoptotique sont différents et les cibles cellulaires potentielles sont nombreuses : action au niveau des récepteurs, des caspases, de la mitochondrie... (Everett & McFadden, 1999 ; Roulston et al., 1999). Certains virus tels que les *Adenoviridae*, les *Baculoviridae*... inhibent l'apoptose, d'autres tels que les *Retroviridae*, les *Reoviridae* induisent l'apoptose. Pour les *Adenoviridae*, l'infection se déroule en deux étapes : premièrement l'apoptose est inhibée par des protéines virales telles que E1B. Cette inhibition permet la production de niveaux élevés de virus. Deuxièmement, la levée de l'inhibition par des protéines virales telles que E1A, facilite l'apoptose et accentue la dissémination des particules virales nouvellement synthétisées (O'Brien, 1998). Dans ce cas, le processus apoptotique représente une étape importante dans la dissémination du virus aux cellules voisines, échappant ainsi aux réponses immunitaires de l'hôte.

L'exemple d'apoptose viro-induite le plus étudié est celui impliquant le VIH. Plusieurs protéines du VIH sont impliquées dans l'induction du processus apoptotique : gp 160, gp 120, gp 41, Tat, Nef et plus récemment Vpr (Roulston et al., 1999). Plusieurs voies de mort cellulaires induites par le VIH ont été explorées. En fonction des procédures expérimentales, certains auteurs ont montré que le VIH induit l'apoptose (Finkel et al., 1995 ; Banki et al., 1998), d'autres suggèrent que le VIH initie un processus de mort cellulaire différent de l'apoptose ou un mécanisme indépendant de la voie Fas (Kolesnitchenko et al., 1997 ; Gandhi et al., 1998), enfin d'autres affirment que les processus nécrotique et apoptotique sont tous deux impliqués au cours de l'infection par le VIH (Plymale et al., 1999). La nature divergente des résultats obtenus lors des études effectuées sur le processus de mort cellulaire induit par le VIH, nous permet de réaliser la complexité d'un tel système. Ces divergences se retrouvent aussi au niveau des protéines du VIH. La protéine Tat est décrite à la fois comme un

inhibiteur et un inducteur d'apoptose (Westendorp et al., 1995 ; Kruman et al., 1998). Il en est de même pour la protéine Vpr (Ayyavoo et al., 1997 ; Stewart et al., 1999 ; Jacotot et al., 2000), la protéine Nef (Selliah & Finkel, 2001)...

	Induction de l'apoptose	Inhibition de l'apoptose
Tat	Augmente l'expression de CD95 et CD95L. Diminue l'activité de Bcl2. Active la caspase-8.	Augmente l'expression de Bcl2. Diminue l'expression de p53.
VpR	Arrêt du cycle cellulaire en G2. Chute du potentiel mitochondrial membranaire.	Augmente l'expression de Bcl2. Diminue l'expression de Bax. Diminue l'activité NF-κB.
Nef	Augmente l'expression de CD95 et CD95L.	Diminue l'exposition de CD4. Inhibe l'activation de Lck. Se lie à p53 et inhibe l'apoptose p53 dépendante.

Ces divergences sont probablement la conséquence des différents protocoles développés, ainsi que du très grand nombre de types cellulaires utilisés pour comprendre l'infection par le VIH, mais aussi et surtout du stade de réplication du virus.

Le virus **Visna**, comme le VIH, est un *Lentivirus*. Cependant, le virus Visna diffère du VIH de part la nature de son hôte : le virus Visna a pour hôte principal les ovins et les caprins, et il n'infecte pas l'Homme. De plus le virus Visna n'a pas les mêmes cibles cellulaires ni les mêmes mécanismes physiopathologiques que le VIH. Compte tenu des similitudes, mais aussi des différences qui existent entre ces deux virus, nous avons voulu déterminer quels étaient les mécanismes associés à l'ECP induit par le virus Visna et si ces mécanismes étaient comparables ou non à ceux du VIH.

Nous avons utilisé comme seul et unique **support cellulaire**, des cellules primaires fibroblastiques obtenues à partir de plexus choroïde (PC). Notre modèle cellulaire *in vitro* est issu des membranes de plexus choroïde cibles du virus Visna lors de l'infection naturelle. En effet, le virus Visna a été isolé à partir de plexus choroïde de mouton atteint par la maladie Visna par Sigurdsson et coll. (1960). Les explants que nous utilisons proviennent d'animaux

jeunes, de moins de deux ans, la maladie Visna se manifestant plus tard dans la vie des ovins mais pas chez les agneaux.

L'utilisation de cellules primaires a nécessité d'employer toujours le même lot de cellules initialement congelé et le même lot de virus titré, pour une même expérimentation, afin de travailler dans des conditions stables et reproductibles. Comme nous avons pu le constater la durée d'infection des cellules primaires ne peut excéder 6 jours, car l'ECP aboutit à la lyse totale du tapis cellulaire.

La recherche d'un inducteur chimique de l'apoptose *in vitro* par la technique DAPI a été indispensable pour comparer nos résultats obtenus avec le Visna, avec un témoin positif d'apoptose sur les cellules de PC. De nombreux autres inducteurs d'apoptose sont décrits dans la littérature sur différents types de cellules :

- la privation en sérum de veau fœtal (SVF) est couramment utilisée comme inducteur d'apoptose sur les neurones (Esclaire et al., 1998) et autres cellules du système nerveux central (Rivera et al., 1998), et sur les macrophages (Ozaki et al., 2001) ;
- les radiations gamma sont décrites pour induire l'apoptose sur des cellules épithéliales de mammifères (Petit-Frere et al., 2000), des splénocytes (Hyun et al., 1997), ou des promyélocytes (Ware et al., 1998) ;
- un grand nombre de molécules chimiques induisent l'apoptose sur différents types cellulaires. Les molécules que nous avons utilisées sont listées dans le Tableau 10.

La **staurosporine** est un inhibiteur puissant de la PKC (« phospholipid/calcium dependent protein kinase ») et un inducteur d'apoptose (Bijur et al., 2000). Parmi tous les stress testés *in vitro* (privation en sérum, dexaméthasone, tamoxifen, camptothecin...) seule la staurosporine s'est révélée être un inducteur efficace d'apoptose sur nos cellules de PC.

L'origine ovine de notre modèle cellulaire ne nous a pas permis de déceler la libération du cytochrome c, ni avec la staurosporine ni avec le virus Visna. L'anticorps anti-cytochrome c que nous avons utilisé dans la recherche de la voie apoptotique mitochondriale n'était probablement pas adapté à l'espèce ovine.

Ces cellules adhérentes ont été aussi un obstacle pour déceler un événement plus précoce caractéristique de l'apoptose : la translocation des résidus phosphatidylsérines, exposés à la surface de la membrane cytoplasmique, révélée par le marquage à l'Annexine V.

Dans la bibliographie sur l'apoptose viro-induite, les conditions expérimentales d'infection, *in vitro*, varient d'un système cellulaire à l'autre ; et pour un même système cellulaire les auteurs utilisent plusieurs MOI, cet inoculum étant ou non retiré après un certain temps d'incubation.

Après plusieurs essais faisant varier ces deux paramètres, nous avons remarqué qu'une augmentation d'une forte MOI du Visna modifiait la cinétique d'apparition du processus apoptotique visualisé au DAPI et la lyse cellulaire. C'est pourquoi, on a appliqué toujours le même protocole d'infection, à savoir une MOI de 0.1, l'inoculum n'est pas éliminé.

Le premier critère d'apoptose que nous avons recherché attrait aux **modifications morphologiques** caractéristiques qui se produisent au cours d'un processus de mort cellulaire programmée.

Le **DAPI** est un fluorochrome qui permet de visualiser l'état de condensation de la chromatine en microscopie à fluorescence. Cette technique est couramment utilisée lors d'études sur l'apoptose viro-induite (Ubol et al., 1998 ; Prikhod'ko et al., 1999 ; Kang et al., 1999). Après un marquage avec le DAPI, nous avons observé que tous les noyaux des cellules fluorescent, avec une intensité plus ou moins forte. En effet, les noyaux des cellules non apoptotiques, à chromatine non condensée, présentent une faible fluorescence bleue résiduelle, tandis que les noyaux apoptotiques avec une **chromatine condensée**, présentent une fluorescence bleue intense qui traduit le rapprochement des fluorochromes. Lors d'une infection par le virus Visna les cellules apoptotiques détectées sont soit des cellules individuelles soit des syncytia. Les syncytia caractéristiques de l'ECP sont donc apoptotiques. Nos résultats sont en accord avec obtenues précédemment avec d'autres lentivirus tels que la CAEV (Gendelman et al., 1997). Néanmoins, ces auteurs ont obtenu un taux d'apoptose maximal de 24% à 6 jours post-infection, tandis que nos résultats montrent un taux maximum d'apoptose de 60% à 90 heures post-infection.

Il est couramment admis que la **fragmentation de l'ADN** est un des critères caractéristiques de la mort cellulaire par apoptose. Pour rechercher la fragmentation de l'ADN cellulaire, nous avons utilisé deux techniques différentes : (i) un essai **TUNEL** qui marque spécifiquement les extrémités 3-OH' générées lors de la fragmentation de l'ADN et (ii) une **électrophorèse sur gel d'agarose** à la recherche d'une «échelle» d'ADN, caractéristique d'une fragmentation oligonucléosomale donnant des fragments de 180 à 200 pb et multiples. Nos résultats obtenus avec la technique TUNEL sont en accord avec ceux obtenus par Gendelman sur des fibroblastes de membrane synoviale de chèvre infectés par le CAEV. Là encore, les cellules individuelles et les syncytia sont marqués, preuve d'une fragmentation chromatinienne. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence «d'échelle d'apoptose». Il semble que ce critère longtemps considéré comme marqueur un irréfutable de processus de mort cellulaire par apoptose, ne fait plus l'unanimité de tous (Hengartner, 2000). En effet, certains auteurs

ont démontré que, suivant les conditions expérimentales, notamment le type cellulaire et la nature du stimulus apoptotique, l'ADN des cellules apoptotiques n'est pas nécessairement oligo-fragmenté et par conséquent ne présente pas un profil de migration en échelle, normalement décrit comme caractéristique de fragmentation de l'ADN (Rasola et al., 1999 ; Sakahira et al., 1999 ; Ferri et al., 2000). D'autres auteurs ont même démontré que dans les cellules apoptotiques ne présentant pas de motif d'ADN en échelle, il y avait quand même une fragmentation de l'ADN, mais tous les 50 Kpb. Cette fragmentation dite «fragmentation de haut poids moléculaire de l'ADN» a été mise en évidence lors d'une électrophorèse à champ pulsé (Zamzami & Kroemer, 1999 ; Daugas et al., 2000).

Grâce à la mise au point du double marquage DAPI-TUNEL sur les mêmes cellules infectées, nous constatons qu'il y a corrélation entre les cellules contenant une chromatine condensée avec une fluorescence bleue intense et les cellules avec une chromatine fragmentée révélée par le FITC. En appliquant simultanément deux techniques différentes : insertion d'un fluorochrome et marquage grâce à une activité enzymatique (TdT), nous mettons en évidence différents processus biochimiques indépendants qui convergent vers une mort cellulaire apoptotique : condensation chromatinienne et fragmentation chromatinienne. Ceci conforte qu'au cours de l'infection *in vitro* par le virus Visna le processus apoptotique est induit.

Il nous est apparu important de rechercher si le virus Visna n'induisait pas de **nécrose** dans notre système cellulaire. De nombreuses techniques permettent de différencier ces deux types de mort cellulaire, en particulier celle basée sur l'étude de la réponse inflammatoire (Green, 1998 ; King et Cidlowski, 1998). L'apoptose aussi appelée mort cellulaire «silencieuse» n'induit pas de réaction inflammatoire, tandis que la nécrose provoque une forte réaction inflammatoire. Cette différence vient du fait essentiel que les membranes cellulaires restent intègres tout au long du processus apoptotique. Ce maintien de l'intégrité membranaire empêche ainsi toute fuite de composés potentiellement cytotoxiques tels que les ROS («Reactive Oxygen Species») ou les leukotriènes qui sont libérés au cours de la nécrose (Chatenoud & Bach, 1990). Si l'intégrité membranaire est maintenue au cours de l'apoptose, il n'est alors pas possible de détecter dans le milieu extracellulaire l'activité **LDH** (lactate dehydrogenase), enzyme qui est présente au niveau du cytoplasme d'un grand nombre de cellules. Au niveau de surnageants de culture de cellules infectées nous n'avons aucune libération de LDH. La fuite de LDH ne devient significative qu'à partir de 100 h post-infection. Cette augmentation correspondrait à une **nécrose secondaire** qui la conséquence d'une absence de phagocytose, dans le système *in vitro*, des cellules apoptotiques. Ce

phénomène de nécrose secondaire est observable au cours d'études *in vitro* (Kroemer et al., 1998). La modification du taux en enzyme LDH, ainsi que 5 autres activités enzymatiques, est un événement souvent mis en évidence au niveau des sérums de patients infectés par le VIH et développant un SIDA (Huang et al., 1988).

La **caspase-1** est décrite comme une caspase induite au cours de la **réponse inflammatoire** (Talanian et al., 1997 ; Earnshaw et al., 1999). Quelles que soient les conditions expérimentales, incubation avec la staurosporine ou infection par le virus Visna, nous n'avons détecté aucune activité caspase-1. Le couple substrat/inhibiteur que nous avons utilisé, étant spécifique de la caspase-1, l'absence d'activité significative montre que l'infection par le virus Visna *in vitro* n'induit à aucun moment une réponse inflammatoire. Ces résultats sont en accord avec ceux de la LDH. Nous pouvons alors considérer que dans notre modèle d'étude, le virus Visna est un inducteur strict d'apoptose, comme l'est la staurosporine. Nous n'avons pas, par exemple, un système complexe apoptose/nécrose, comme cela a été décrit dans le cas du VIH (Plymale et al., 1999). Cependant, il faut rappeler que notre système repose sur un modèle d'infection *in vitro*. Donc, il peut exister des différences entre des situations infectieuses produites *in vitro* et *in vivo*. En effet, dans la littérature il a été de nombreuses fois rapporté que *in vivo*, le virus Visna comme le CAEV, induisait une réponse inflammatoire (Zinck et Johnson, 1994).

Le processus de mort cellulaire induit au cours de l'infection *in vitro* par le virus Visna n'étant pas connu, nous avons recherché la principale voie apoptotique décrite, celle de la **cascade des caspases**. L'importance de l'activation des caspases au cours de l'apoptose a été largement démontrée (Hengartner, 2000). Les caspases jouent un rôle clé dans la phase d'exécution de la mort cellulaire d'origine apoptotique. De plus, l'apoptose a été décrite dans de nombreux systèmes virus-cellules (Nava et al., 1998 ; Ubol et al., 1998 ; Bitzer et al., 1999 ; Galvan et al., 2000). Les caspases sont synthétisées sous la forme de zymogènes inactifs (procaspases) qui sont activés et convertis en protéases matures suite à un clivage (Zhivotovsky et al., 1999). L'activation des caspases se fait soit par un clivage auto catalytique (auto-activation) comme dans le cas de la caspase-8, soit par le clivage d'une caspase «aval» par une caspase «amont» aboutissant à une activation en cascade. L'exemple type est celui de l'activation de la caspase-3 par les caspases-8 ou -9 (Roy & Nicholson, 2000). Cette cascade de protéolyse conduit à l'activation d'un très grand nombre de caspases exécutrices qui agissent de façon simultanée pour favoriser le développement du processus de mort cellulaire. Ces enzymes sont divisées en deux groupes : (i) les caspases initiatrices telles

que la caspase-8 et la caspase-9 dont la fonction principale est d'activer les caspases « aval », (ii) les caspases effectrices, appelées aussi exécutrices, telles que les caspases-3, -6 et -7 qui sont responsables du démantèlement des protéines cellulaires (Mehmet, 2000). Ce démantèlement des protéines cellulaires représente les différentes étapes qui vont préparer la cellule à mourir par apoptose. En quelques années, plus d'une centaine de substrats naturels des caspases ont été identifiés. Le clivage de ces substrats représente une étape importante dans l'apparition des modifications morphologiques et biochimiques qui caractérisent l'apoptose (Earnshaw et al., 1999). Ces substrats des caspases sont de nature très diverses (Earnshaw et al., 1999). Leur clivage par les caspases entraîne soit leur activation, par exemple celui du **DFF** («DNA Fragmentation Factor» ; Liu et al., 1997), soit leur inhibition, par exemple ceux de la **PARP** (« Poly ADP Ribose Polymerase »), des **lamines**, de la **fodrine**... (Earnshaw et al., 1999 ; Hengartner, 2000).

Dans le cas de l'apoptose induite par le virus Visna, nous nous sommes intéressés à la **PARP**, un substrat de la caspase-3, impliquée dans les mécanismes de réparation transitoire de l'ADN (Le Rhun et al., 1998). La PARP a pour fonction de combler les trous au niveau de la double hélice d'ADN, en introduisant des longs polymères d'ADP-ribose qui proviennent des cofacteurs NAD⁺, processus qui consomme beaucoup d'énergie. La PARP a été un des tous premiers substrats de caspase identifiés. Le clivage de la PARP bloque sa fonction réparatrice (Lazebnik et al., 1994 ; Le Rhun et al., 1998). La PARP clivée ne peut plus s'opposer au bon déroulement du processus apoptotique et notamment au processus de fragmentation de la chromatine nucléaire. Pour rechercher le clivage PARP nous avons utilisé un anticorps qui reconnaît spécifiquement le fragment de 85 kDa. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de clivage de la PARP au niveau de cellules infectées par le Visna, tandis que la PARP est efficacement clivée lorsque les PC sont traitées par la staurosporine. Plusieurs études, dans différents autres systèmes d'induction de l'apoptose, dont le VIH, n'ont également pas mis en évidence ce clivage (Kolesnitchenko et al., 1997 ; Le Rhun et al., 1998 ; Taddeo et al., 2000). Il a été montré que la PARP est vitale au maintien de la stabilité du génome, mais elle n'intervient pas sur le déroulement du processus apoptotique (Wang et al., 1997). Gäken et coll. (1996) ont montré qu'une PARP, intègre et fonctionnelle, est nécessaire pour la production de particules rétrovirales, notamment lors de la formation du provirus. On peut donc penser que le clivage de la PARP n'est pas nécessaire au cours du processus d'apoptose induit par le virus Visna.

L'activité **caspase-3**, «caspase exécutrice», est directement responsable du clivage de la PARP (Tewari et al., 1995). C'est pourquoi en utilisant le substrat Ac-DEVD-AMC et son

inhibiteur correspondant (-CHO), nous avons montré qu'il y avait une activité caspase-3 significative dans les PC infectés. Ceci laisse supposer que la caspase-3 bien qu'active ne clive pas la PARP dans l'apoptose Visna-induite. D'autres auteurs ont décrit ce même phénomène, notamment avec le VIH-1 (Taddeo et al., 2000). Avec la staurosporine, l'activité caspase-3 est beaucoup plus forte. L'intensité de fluorescence étant proportionnelle aux nombres d'enzymes, la quantité de caspase-3 activée par la staurosporine est plus importante que dans le cas du virus Visna.

Afin de définir les étapes de la **transduction du signal** apoptotique déclenchée par le virus Visna, nous avons recherché l'existence des différentes voies apoptotiques décrites. Des nouveaux membres de la famille des caspases, appelés **caspase-8** et **caspase-9** ont été identifiés et décrits comme responsables de l'initiation de l'activation protéolytique de la caspase-3. En fait, l'activation de la caspase-8 représente le tout premier événement dans la cascade apoptotique induite via le CD95 (voie extrinsèque), alors que l'activation de la caspase-9 est associée à la cascade apoptotique induite par la mitochondrie (voie intrinsèque) (Roy & Nicholson, 2000). Ces auteurs différencient clairement la voie externe de transduction du signal médiée par la caspase-8 et la voie interne de transduction du signal médiée par la caspase-9. En plus de ces deux voies d'apoptose, une autre voie : la **voie de l'AIF**, a été mise en évidence et son déroulement est indépendant de l'activation des caspases exécutrices. Pour étudier l'implication de ces différentes voies de signalisation au cours de l'infection par le virus Visna, nous avons recherché plusieurs marqueurs de ces voies en utilisant :

- des couples substrat/inhibiteur pour mettre en évidence l'activation de ces enzymes (caspases-8, -9...),
- des anticorps dirigés contre des protéines ayant un rôle majeur dans l'apoptose comme le cytochrome c et l'AIF,
- des inhibiteurs irréversibles de caspases qui pénètrent aisément les membranes cellulaires. Ces inhibiteurs ont été employés, (i) soit sur des cellules en culture, pour rechercher l'importance de ces voies et les effets potentiels des caspases sur des étapes critiques (lyse cellulaire, libération de particules virales) du cycle infectieux du virus Visna ; (ii) soit pour des marquages *in situ* pour visualiser l'évolution de l'activation des caspases sur des PC infectés.

Le cytochrome c est une protéine mitochondriale qui intervient dans le transport des électrons le long de la chaîne respiratoire. Suite à une stimulation de la mitochondrie, le cytochrome c est libéré dans le cytosol où il va former avec d'autres protéines un gros complexe protéique :

l'apoptosome. Une fois fonctionnel, l'apoptosome représente l'élément déclencheur de la voie d'exécution du processus apoptotique en clivant et par conséquent en activant la caspase-3. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de libération du cytochrome c dans le cas de cellules infectées par le virus Visna, ni dans le cas de cellules traitées à la staurosporine. Pourtant, la staurosporine est un agent chimique décrit comme un activateur de la voie mitochondriale (Sun et al., 1999). L'anticorps que nous avons utilisé pour révéler la libération du cytochrome c, a efficacement et effectivement révélé la libération du cytochrome c dans d'autres modèles d'étude de l'apoptose. Nous pouvons donc supposer que cet anticorps est inapproprié à notre système ovin.

La caspase-9 est une autre protéine impliquée dans la formation de l'apoptosome. Pour mesurer l'activité caspase-9 nous avons utilisé le couple Ac-LEHD-AMC/Ac-LEHD-CHO. Ce couple a été déterminé et décrit comme spécifique de l'activité caspase-9 (Thornberry et al., 2000). En utilisant ce couple, nous mesurons une activité caspase-9 significative dans les cultures de cellules infectées par le virus Visna, et dans le cas des cellules traitées avec la staurosporine. Ainsi, nous démontrons que :

- l'infection par le virus Visna provoque une **stimulation de la mitochondrie**, puisque nous mesurons une activité caspase-9 significative,
- la staurosporine a un effet pro-apoptotique sur la mitochondrie, en accord avec les données bibliographiques (Sun et al., 1999).

Nous avons ensuite exploré la voie des récepteurs par le biais de la caspase-8. Nous avons alors recherché l'activité caspase-8 en utilisant le Ac-IETD-AMC/Ac-IETD-CHO). Comme pour la caspase-9, ce couple a été déterminé et décrit comme spécifique de l'activité caspase-9 (Thornberry et al., 2000). En utilisant ce couple, nous avons mesuré une activité caspase-8 significative dans les cultures de cellules infectées par le virus Visna ou traitées avec la staurosporine. Ainsi nous démontrons que :

- l'infection par le virus Visna provoque la **stimulation de la voie des récepteurs**, puisque l'activité caspase-8 est significative,
- la staurosporine induit aussi une activation de la voie des récepteurs.

Ainsi, au cours de l'infection *in vitro* de cellules PC par le virus Visna, les activités caspase-8 et caspase-9 sont induites, comme cela a été démontré dans le cas du VIH (Selliah & Finkel, 2001). Par homologie avec le VIH, nous pouvons donc envisager deux mécanismes d'activation des caspases-8 et -9 : (i) soit elles sont activées indépendamment l'une de l'autre, par exemple, la caspase-8 peut être activée suite à la liaison de gp120 et la caspase-9 par la protéine Vpr, (ii) soit l'activation de la caspase-9 est liée à celle de la caspase-8, par exemple

le clivage de la protéine Bid par la caspase-8 pourrait induire l'activation de la caspase-9 (Hengartner, 2000 ; Roy & Nicholson, 2000).

Si nous comparons les valeurs d'URF des trois activités caspases, -3, -9 et -8 (Figures 23, 25 et 26), on se rend compte que l'intensité de l'activité caspase-3 est beaucoup plus importante que celles des caspases -8 et -9. Dans les cellules de mammifères, (Earnshaw et al., 1999) la procaspase-3 est exprimée en plus grande quantité que les précurseurs des autres caspases. En accord avec les données bibliographiques, nous constatons un taux d'activation plus élevé de l'enzyme caspase-3.

La **voie pro-apoptotique dépendante de l'AIF** (« Apoptosis Inducing Factor »), est déclenchée par sa libération dans le cytosol. L'AIF est une protéine normalement séquestrée au niveau de la matrice mitochondriale. Nous avons montré que l'AIF est effectivement libéré aussi bien par les cellules individuelles que les syncytia, au cours de l'infection par le virus Visna. En montrant la libération de l'AIF par les mitochondries, nous mettons en évidence la stimulation de la voie intrinsèque de l'apoptose (ou voie mitochondriale) avec induction de la voie dépendante des caspases (activation de la caspase-9) et de la voie indépendante des caspases (libération de l'AIF).

Ainsi, il apparaît que le virus Visna induit plusieurs voies de transduction du signal pro-apoptotique, comme cela a été aussi démontré dans le cas du VIH (Ferri et al., 1999)

Comme plusieurs caspases sont activées, la caspase-3, la caspase-8 et la caspase-9, nous avons voulu savoir si ces caspases contribuent au **processus de mort cellulaire** qui aboutit *in vitro* à l'effet cytopathologique du virus Visna.

Il a été montré que l'étape finale de l'apoptose (l'activation des caspases) peut être inhibée en utilisant des pseudo-substrats de ces protéases. C'est le cas du peptide synthétique z-VAD-FMK qui inhibe efficacement et spécifiquement l'apoptose, et notamment l'apoptose induite par plusieurs virus tels que le virus Sindbis (Nava et al., 1998; Zhivotovsky et al., 1995), le virus de la rougeole (Pugachev & Krey, 1998), le virus Sendaï (Bitzer et al., 1999), et le virus poliovirus (Agol et al., 1998)...

Nous avons utilisé trois inhibiteurs différents :

- le **z-DEVD-FMK**,
- le **z-VAD-FMK**,
- et le **z-YVAD-FMK**.

Le z-DEVD-FMK est décrit comme un inhibiteur irréversible de la caspase-3, le z-VAD-FMK, comme un inhibiteur à large spectre des caspases qui prévient l'apoptose induite par un

grand nombre de stimuli, et le z-YVAD-FMK qui inhibe les activités caspases de type inflammatoire « caspase-1 like » (Nicholson et al., 1995 ; Cain et al., 1996; Slee et al., 1996). Depuis un grand nombre d'autres inhibiteurs ont été décrits, avec des spécificités limitées à une ou plusieurs caspases.

Alors que les inhibiteurs de type Ac-XXXD-CHO ne peuvent être utilisés que sur des lysats cellulaires, nous avons testé l'efficacité d'inhibiteurs de type -FMK à la fois sur des lysats cellulaires et directement sur les cellules en culture. En effet, ces derniers ont la propriété de pénétrer **directement dans les cellules** grâce aux groupements « méthyls » greffés sur les séquences peptidiques (-XXXD-), sans qu'il soit nécessaire d'effectuer un traitement préalable de perméabilisation des membranes. Leur autre particularité est qu'ils sont doués d'une **inhibition irréversible**, grâce au groupement -FMK.

Nous avons voulu, tout d'abord, vérifier la spécificité du spectre d'inhibition de chacun des trois inhibiteurs. Le z-VAD-FMK et le z-DEVD-FMK sont des inhibiteurs puissants des trois activités caspases -3, -8 et -9 dans notre modèle cellule/virus (Figures 28.1 et 28.2). En ce qui concerne le z-VAD-FMK nos résultats sont en accord avec les données bibliographiques qui le décrivent comme un inhibiteur à large spectre, alors que le z-DEVD-FMK, initialement décrit dans la littérature comme un inhibiteur spécifique de la caspase-3, se révèle plutôt être un inhibiteur des activités «caspase-3 like», avec un spectre élargi à d'autres activités caspases.

Le z-YVAD-FMK n'inhibe aucune des trois activités caspases (Figure 28.3). Le z-YVAD-FMK étant décrit comme un inhibiteur de la caspase-1, nous sommes en accord avec la littérature (Stennicke & Salvesen, 2000). Et on confirme l'absence de détection de réponse inflammatoire déjà mise en évidence avec le couple Ac-YVAD-AMC / Ac-YVAD-CHO.

Sur des cellules en culture stimulées par un signal pro-apoptotique, le **FITC-VAD-FMK** va spécifiquement marquer les cellules qui contiennent des caspases actives. Grâce à ce marqueur nous confirmons qu'au cours de l'infection par le virus Visna il y a des cellules marquées donc des cellules avec des caspases actives. Plus le temps d'infection est long, plus il y a de cellules marquées. Ceci se traduit particulièrement avec une augmentation de l'intensité de fluorescence au niveau des noyaux pour les temps les plus longs, qui correspondrait à la translocation des caspases exécutrices actives du cytoplasme vers le noyau (Chandler et al., 1998). Ainsi on peut supposer que l'augmentation des activités caspases décelée lors des études sur les lysats cellulaires, est due à un plus grand nombre de cellules entrant en apoptose, au fur et à mesure que l'infection se développe, plutôt qu'une augmentation des activités caspases au sein d'une même cellule.

Pour évaluer la contribution des caspases dans l'ECP Visna-induit, nous avons réalisé plusieurs cinétiques d'infection en incorporant respectivement chacun des trois inhibiteurs irréversibles en même temps que l'inoculation par le virus. Pour cela nous avons préalablement vérifié que la concentration 5.10^{-5} M de chaque inhibiteur n'était pas cytotoxique vis à vis des cellules de PC. En effet deux inhibiteurs, le z-DEVD-FMK et le z-VAD-FMK sont cytotoxiques à 10^{-4} M (Tableau 13).

Le **z-VAD-FMK** et le **z-DEVD-FMK** modifient tous les deux la cinétique de **libération de la LDH** dans le surnageant de culture puisque le maximum de libération est décalé dans le temps : on passe de 120 heures sur la courbe « cellules infectées », à approximativement 160 heures sur la courbe « cellules infectées traitées » (Figures 29.1 et 29.2). L'action de ces deux inhibiteurs est efficace et durable jusqu'à 6 jours d'incubation, puisque nous n'avons à aucun moment de la cinétique rajouté d'inhibiteur. Les deux profils de courbes (cellules infectées et cellules infectées traitées) sont comparables (Figures 29.1 et 29.2). Si on se réfère aux spectres d'inhibition du z-VAD-FMK et du z-DEVD-FMK (Figures 28.1 et 28.2) qui bloquent les trois activités caspases, -3, -8 et -9, nous pouvons supposer que ces trois activités caspases, non seulement jouent un rôle dans l'apoptose Visna-induite, mais interviennent également dans l'expression de l'ECP Visna-induit, caractérisée *in vitro* par une lyse cellulaire massive. En effet, on a montré qu'après incubation des cellules infectées avec **le z-VAD-FMK ou le z-DEVD-FMK**, la **libération de la LDH, témoin de la lyse cellulaire, est retardée**, l'ECP est décalé dans le temps.

En revanche, le **z-YVAD-FMK** n'ayant aucune action inhibitrice sur les caspases apoptotiques (Figure 28.3), il n'y a **pas modification de la cinétique de libération de la LDH** (Figure 29.3), les deux courbes sont superposées.

Donc, en bloquant la voie des récepteurs (e. g., la caspase-8), la voie de la mitochondrie (e. g., la caspase-9) et/ou la caspase exécutive prépondérante (e. g., la caspase-3), on retarde l'apparition de la lyse cellulaire donc de l'ECP. Nous pouvons supposer que l'activation des caspases-3, -8 et/ou -9 au cours de l'apoptose ou d'autres événements en dépendant, conduit à l'ECP induit par le virus Visna, **l'inhibition de ces caspases retardant l'apparition de l'ECP**.

Quelle est alors, l'influence de l'apoptose, *via* l'activation des caspases, sur la libération des particules virales ? A différents temps d'infection, nous avons comparé les titres de virus lorsque les cellules sont soumises ou non au traitement par les deux inhibiteurs de caspases

apoptotiques (z-VAD-FMK ou z-DEVD-FMK). Dans notre modèle virus/cellules, on montre que le traitement par ces deux inhibiteurs irréversibles entraîne une diminution du titre viral. Pourtant il a été montré avec le VIH que l'inhibition de l'apoptose pouvait induire une forte augmentation de la réplication virale (Antoni et al., 1995 ; Chinnayan et al., 1997 ; Sandstrom et al., 1996). Néanmoins Taddeo et coll. (2000) ont montré que l'incubation avec le z-VAD-FMK de cellules T infectées par le VIH, ne modifiait pas le titre viral. Nous avons, là encore, un exemple de résultats contradictoires concernant l'infection *in vitro* par le VIH. Il apparaît très clairement que ces divergences sont la conséquence de **protocoles expérimentaux différents**. Puisque la libération de particules Visna, est réduite de 80,5% (cas du z-VAD-FMK) et de 65,6% (cas du z-DEVD-FMK) (Figure 30), nous pouvons supposer que **l'activation des caspases** au cours de l'apoptose ou d'autres événements caspase-dépendant, contribue à la multiplication ou la **libération des particules virales** dans notre modèle virus/cellules.

Nous avons démontré pour la première fois que l'apoptose est en partie responsable de la mort cellulaire se produisant *in vitro*, suite à une infection avec le virus Visna. L'expression de l'**apoptose** se produisent aussi bien au niveau des **cellules «individuelles»** que des **syncytia** ; ces deux morphologies cellulaires présentent une condensation cytoplasmique, une condensation et une fragmentation chromatinienne et une libération de l'AIF. Nous n'avons pas pu observer de syncytia apoptotique marqués au FITC-VAD-FMK.

A toutes les étapes de caractérisation du processus apoptotique nous avons validé nos résultats en utilisant comme référence un stimulus chimique : la **staurosporine**. De façon intéressante il apparaît que ces **deux stimuli** aboutissent *in fine* à l'activation de la caspase exécutrice majoritaire : la caspase-3, et à l'apparition des modifications morphologiques caractéristiques de l'apoptose. Mais le virus Visna et la staurosporine **n'induisent pas exactement les mêmes voies de transduction du signal**. Une des différences mise en évidence est **l'absence de clivage de la PARP** dans le cas de cellules infectées (Figure 19), alors qu'elle est efficacement clivée dans le cas de la staurosporine. Ceci laisse supposer que la PARP doit rester intègre et fonctionnelle dans l'infection par le virus Visna. Gäken et coll. (1996) ont montré dans le cas de vecteurs rétroviraux MPSV (« Myeloproliferative Sarcoma Virus ») que la PARP intervient dans la formation du provirus. Une autre différence déjà mentionnée plus haut, est **l'absence de fragmentation oligonucléosomale de l'ADN** dans le cas de cellules infectées (Figure 15).

Enfin, les cinétiques d'action de ces deux stimuli sont très différentes : la staurosporine induit une activation d'emblée élevée de la caspase-3, avec un maximum à 18 heures de traitement (Figure 23) ; alors que dans le cas du Visna cette activation est progressive avec un maximum à 68 heures post-infection. Il est intéressant de noter que l'intensité d'activation de la caspase-3 est beaucoup plus **faible dans le cas des cellules infectées** (environ 4 fois plus faible) que dans le cas d'un stimulus chimique. Compte tenu de l'implication de la caspase-3 dans le clivage de la PARP et dans la fragmentation de l'ADN, nous pouvons supposer que, dans le cas de l'infection *in vitro* par le Visna où une plus faible « quantité » de caspase-3 est activée, soit la PARP n'est effectivement pas clivée et l'ADN non fragmenté, soit les techniques que nous avons utilisées ne permettent pas de mettre en évidence ces marqueurs.

CONCLUSION

L'apoptose induite par des virus est depuis quelques années un des centres d'intérêt les plus importants de la recherche fondamentale et appliquée en Biologie. Depuis la découverte du rôle prépondérant de la dérégulation de l'apoptose dans l'infection à VIH, les connaissances sur les mécanismes impliqués dans les physiopathologies à infections virales se sont considérablement élargies. Les développements récents dans la compréhension de ces mécanismes ont permis d'ouvrir de nouvelles voies possibles dans le traitement de certaines infections virales et notamment dans le **SIDA**, où le manque d'une solution efficace pour éradiquer le virus se fait cruellement sentir, les tri-thérapies montrant leur limite. Le travail effectué au cours de cette thèse s'inscrit dans ce contexte.

Ce travail représente à notre connaissance le premier rapport sur l'identification et la caractérisation du processus de mort cellulaire induit *in vitro* par le rétrovirus Visna-Maedi sur des cellules primaires de type fibroblastiques, issues de plexus choroïde ovins. Notre travail s'inscrit dans une situation *in vitro*. En utilisant un système de culture *in vitro* de cellules primaires d'origine ovine, nous soulevons le problème de l'absence d'interférence des systèmes immunitaires et inflammatoires qui coexistent dans l'infection Visna *in vivo*. Néanmoins, nous avons mis en évidence que l'infection des cellules par le virus Visna induit les **modifications morphologiques et biochimiques** caractéristiques de l'apoptose. Nous avons montré que l'induction de l'apoptose par ce virus emprunte les deux principales voies apoptotiques dépendantes des caspases, couramment décrites dans la littérature, avec l'activation de la voie **extrinsèque** ou voie des récepteurs et l'activation de la voie **intrinsèque** ou voie mitochondriale. De façon intéressante il semble que dans notre système il existe une autre voie d'apoptose, indépendante des caspases exécutrices, dont le siège est la mitochondrie. Nous avons ainsi montré que la protéine **AIF** est libérée. En utilisant des inhibiteurs des caspases, il est apparu qu'ils étaient plus ou moins spécifiques d'une ou de plusieurs caspases. Ces inhibiteurs nous ont permis de démontrer que **l'activation des caspases** ou des événements en dépendant, étaient associés aux **effets cytopathologiques** (ECP) induits par le virus Visna. En effet, le traitement simultané des cellules infectées, par certains inhibiteurs de caspases, retarde l'apparition du phénomène de lyse cellulaire, en prolongeant l'intégrité membranaire, et réduit la production de particules virales. Par conséquent, l'effet cytopathologique observé, avec la formation de syncytia et la lyse cellulaire, est en relation directe avec l'induction d'un programme de mort cellulaire programmée.

Ainsi, notre modèle cellulaire ovin semble présenter la même organisation et les mêmes médiateurs apoptotiques que n'importe quel autre type cellulaire. Notre système cellulaire

peut tout à fait être utilisé comme **modèle** d'étude pour comprendre le développement d'autres infections rétrovirales animales (CAEV...).

Notre travail a permis d'obtenir certaines réponses quant aux mécanismes impliqués dans l'apoptose induite par le rétrovirus Visna-Maedi, et nous ouvre de nombreuses perspectives :

- il serait intéressant de faire la discrimination entre l'état apoptotique dans les **cellules infectées** et celui des **cellules non infectées**. En effet, il apparaît de plus en plus certain que l'apoptose induite par les rétrovirus, se produit avant tout dans les cellules non infectées, non productives de particules virales. Nous avons montré que les cellules isolées et les syncytia entrent en apoptose. Dans le cas d'une infection par le VIH de nombreuses protéines virales (Tat, gp120...) sont directement impliquées dans l'induction du processus apoptotique. En caractérisant la ou les protéines virales du Visna, il serait peut être alors possible de limiter l'apoptose qui en résulte. Le rôle des syncytia reste aussi à explorer, ils sont caractéristiques de l'expression *in vitro* de l'ECP, mais quel est leur rôle dans le cycle infectieux ? Sont-ils infectés ou non ? ...
- la **mitochondrie** semble jouer un rôle complexe dans la régulation et l'induction de la phase effectrice de l'apoptose. En effet nous avons montré qu'à son niveau deux processus apoptotiques indépendants sont induits : activation de la voie intrinsèque et libération de l'AIF. La caractérisation de l'enchaînement des événements et les différentes protéines qui régulent son intervention : membres pro- et anti-apoptotiques de la **famille Bcl-2** (Bax, Bcl-2...), la protéine suppresseur de tumeur **p53**, la protéine virale **Tat** ..., pourrait apporter une nouvelle compréhension.
- existe-t-il d'autres voies d'apoptose ? Il apparaît que l'induction « interne » de l'apoptose ne se limite pas uniquement à la mitochondrie ; d'autres organites intracellulaires semblent impliqués, et parmi eux le **réticulum endoplasmique** (RE). Son rôle semble lié au contrôle des **flux calciques** intracellulaires mais aussi à l'activation d'une nouvelle caspase transductrice : la **caspase-12**. Suite à la stimulation du RE on peut supposer qu'il existe, comme dans le cas de la caspase-8, une action directe, la caspase-12 pouvant cliver la caspase-3, ou une action indirecte, la libération de calcium par le RE pouvant à son tour stimuler la mitochondrie et induire la formation de l'apoptosome. L'exemple du RE n'est unique. L'appareil de Golgi, les lysosomes... semblent réagir à des stimuli de natures diverses et induire une réponse de type apoptotique. Il est donc possible que

pour un stimulus donné il y ait induction de plusieurs voies apoptotiques, autres que la voie des récepteurs, la voie de la mitochondrie et la voie de l'AIF.

- quel est l'intérêt, la fonction des autres caspases ? A ce jour plus d'une quinzaine de caspases différentes ont été décrites, dont 14 chez les mammifères. Les caspases -1, -4 et -5 sont impliquées dans l'inflammation, les caspases -3, -8 et -9 sont les caspases apoptotiques les plus connues, mais il reste toutes les autres caspases dont la fonction n'est pas forcément élucidée. Par exemple, les données sur l'activation de la caspase-12, et son rôle au niveau du RE, sont très récentes, on peut donc supposer que chaque caspase ait une action bien définie, à une étape précise du processus apoptotique.

Le processus apoptotique induit par le virus Visna étant caractérisé dans ses grandes lignes, il serait intéressant de tester l'action de drogues couramment utilisées en thérapie antirétrovirale, inhibiteur de reverse transcriptase (AZT), inhibiteur de protéase... En effet, en cas d'une épidémie accrue dans le cheptel ovin, nous serions dans une impasse compte tenu du fait qu'il n'existe toujours pas de vaccin et que l'AFSSA semble vouloir appliquer en toutes circonstances le « principe de précaution ». L'utilisation des drogues antirétrovirales a montré ses effets en médecine humaine avec les inhibiteurs de la reverse transcriptase et de la protéase. En médecine vétérinaire pour des raisons de coût, les traitements antirétroviraux ne sont pas envisageables. En absence de vaccin, notre modèle rétroviral est intéressant pour tester le rôle des antirétroviraux sur l'inhibition de l'apoptose.

BIBLIOGRAPHIE

A

Adams, J.M. & Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281 :1322-1326.

Afford, S. & Randhawa, S. (2000). Apoptosis. *Mol. Pathol.* 53 :55-63.

Agarwal, M.L., Taylor, W.R., Chernov, M.V., Chernova, O.B. & Stark G.R. (1998). The p53 network. *J. Biol. Chem.* 273 :1-4.

Agnantis, N.J., & Goussia, A.C. (1999). Apoptose et cancer. *Bull. Acad. Natle Méd.* 183 :277-287.

Akao, Y., Otsuki, Y., Kataoka, S., Ito, Y. & Tsujimoto, Y. (1994). Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 54 : 2468-2471.

Alcami, A., Khanna, A., Paul, N.L. & Smith, G.L. (1999). Vaccinia virus strains Lister, USSR and Evans express soluble and cell surface tumour necrosis factor receptors. *J. Gen. Virol.* 80 :949-959.

Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W. & Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87 :171.

Ameisen, J.C. (1994). Programmed cell death (apoptosis) and cell survival regulation : relevance to AIDS and cancer. *AIDS* 8 :1197-1213.

Angermüller, S., Künstle, G. & Tiegs, G. (1998). Pre-apoptotic alterations in hepatocytes of TNF α -treated galactosamine-sensitized mice. *J. Histochem. Cytochem.* 46 :1175-1183.

Antonsson, B. & Martinou, J.C. (2000). The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res.* 256 :50-57.

Ashkenazi, A. & Dixit, V.M. (1998). Death receptors : signaling and modulation. *Science* 281 :1305-1308.

Ashkenazi, A., Pai, R.C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D.A., Marsters, S.A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A.E., Hebert, A., DeForge, L., Koumenis, I.L., Lewis, D.,

Harris, L., Bussiere, J., Koeppen, H., Shahrokh, Z. & Schwall, R.H. (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J. Clin. Invest.* 104 :155-162.

Ayyavoo, V., Mahboubi, A., Mahalingam, S., Ramalingam, R., Kudchodkar, S., Williams, W.V., Green, D.R. & Weiner., D.B. (1997). HIV-1 Vpr suppresses immune activation and apoptosis through regulation of nuclear factor kB. *Nat. Med.* 3:1117-1123.

B

Balachandran, S., Kim, C.N., Yeh, W.C., Mak, T.W., Bhalla, K. & Barber, G.N. (1998). Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling. *EMBO J.* 17 :6888-6902.

Banki, K., E. Hutter, N.J. Gonchoroff, & A. Perl. (1998). Molecular ordering in HIV-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273:11944-11953.

Barber, S.A., Bruett, L. & Clements, J.E. (2000). Involvement of a membrane-associated serine/threonine kinase complex in cellular binding of visna virus. *Virology* 274 :321-330.

Barinaga, M. (1998). Is apoptosis key in Alzheimer's disease ? *Science* 281 :1303-1304.

Barnabas, S., Hai, T. & Andrisani, O.M. (1997). The hepatitis B virus X protein enhances the DNA binding potential and transcription efficacy of bZip transcription factors. *J. Biol. Chem.* 272 :20684-20690.

Barré-Sinoussi, F. (1997). Les VIH, rappel virologique. *Impact Médecin – Guide Santé* : 11-20.

Barry, M. & McFadden, G. (1998). Apoptosis regulators from DNA viruses. *Curr. Opin. Immunol.* 10 :422-430.

Barry, M., Hnatiuk, S., Mossman, K., Lee, S.F., Boshkov, L. & McFadden, G. (1997). The myxoma virus M-T4 gene encodes a novel RDEL-containing protein that is retained within the endoplasmic reticulum and is important for the productive infection of lymphocytes. *Virology.* 239 :360-377.

- Bartz, S.R. & Emerman, M.** (1999). Human immunodeficiency virus type 1 induces apoptosis and increases sensitivity to apoptotic signals by up-regulating FLICE/caspase-8. *J. Virol.* 73 :1956-1963.
- Bergqvist, A., Soderbarg, K. & Magnusson, G.** (1997). Altered susceptibility to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis of mouse cells expressing polyomavirus middle and small T antigens. *J. Virol.* 71 : 276-283.
- Bertin, J., Armstrong, R.C., Otilie, S., Martin, D.A., Wang, Y., Banks, S., Wang, G.H., Senkevich, T.G., Alnemri, E.S., Moss, B., Lenardo, M.J., Tomaselli, K.J. & Cohen, J.I.** (1997). Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94 :1172-1176.
- Bhat, S., Otsuka, T. & Srinivasan, A.** (1992). Inhibition of gp120 binding to galactosyl ceramide and sulfatide by potential anti-HIV compounds. *AIDS.* 6 :1213-1227.
- Bijur, G.N., P. de Sarno, & R.S. Jope.** (2000). Glycogen synthase kinase-3b facilitates staurosporine- and heat shock-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275:7583-7590.
- Bishop, S.A., Gruffydd-Jones, T.J., Harbour, D.A. & Stokes, C.R.** (1993). Programmed cell death (apoptosis) as a mechanism of cell death in peripheral blood mononuclear cells from cats infected with feline immunodeficiency virus (FIV). *Clin. Exp. Immunol.* 93:65-71.
- Bitzer, M., F. Prinz, M. Bauer, M. Spiegel, W.J. Neubert, M. Gregor, K. Schulze-Osthoff, & U. Lauer.** (1999). Sendai virus infection induces apoptosis through activation of caspase-8 (FLICE) and caspase-3 (CPP32). *J. Virol.* 73:702-708.
- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V. & Wallach, D.** (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85 :803-15.
- Boldin, M.P., Varfolomeev, E.E., Pancer, Z., Mett, I.L., Camonis, J.H. & Wallach, D.** (1995). A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol. Chem.* 270 :7795-7798.
- Bossy-Wetzel, E., Newmeyer, D.D. & Green, D.R.** (1998). Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J.* 17 :37-49.

Bouchard, N., Larenaudie, B. & Remond, M. (1980). Le Visna du mouton. Bull. Soc. Vet. Prat. De France. 64 :755-772.

Bracci, L., Lozzi, L., Rustici, M. & Neri, P. (1992). Binding of HIV-1 gp120 to the nicotinic receptor. FEBS. 311 :115-118.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Chem. 72 :248-254.

Bratton, S.B. & Cohen, G.M. (2001). Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego? Trends Pharmacol. Sci. 22 :306-315.

Bruett, L., Barber, S.A. & Clements, J.E. (2000). Characterisation of a membrane-associated protein implicated in visna virus binding and infection. Virology 271 :132-141.

Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. & Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 15 :269-290.

Buendia, B., Santa-Maria, A. & Courvalin, J.C. (1999). Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. J. Cell. Sci. 112 :1743-1753.

C

Cagnoli, C.M., Kharlamov, E., Atabay, C., Uz, T. & Manev, H. (1996). Apoptosis induced in neuronal cultures by either the phosphatase inhibitor okadaic acid or the kinase inhibitor staurosporine is attenuated by isoquinolinesulfonamides H-7, H-8, and H-9. J Mol Neurosci. 7 :65-76.

Camaur, D. & Trono, D. (1996). Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation. J. Virol. 70 :6106-6111.

Camerini, D., Walz, G., Loenen, W.A., Borst, J. & Seed, B. (1991). The T cell activation antigen CD27 is a member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor gene family. J. Immunol. 147 :3165-3169.

Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S. & Reed, J.C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282 :1318-1321.

Casella, C.R., Rapaport, E.L. & Finkel, T.H. (1999). Vpu increases susceptibility of human immunodeficiency virus type 1-infected cells to Fas killing. *J. Virol.* 73 :92-100.

Chandler, J.M., Cohen, G.M. & MacFarlane, M. (1998). Different subcellular distribution of caspase-3 and caspase-7 following Fas-induced apoptosis in mouse liver. *J. Biol. Chem.* 273 :10815-10818.

Chang, B.S., Minn, A.J., Muchmore, S.W., Fesik, S.W. & Thompson, C.B. (1997). Identification of a novel regulatory domain in Bcl-X(L) and Bcl-2. *EMBO J.* 16 :968-977.

Chang, H.W., Watson, J.C. & Jacobs, B.L. (1992). The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double stranded RNA-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 :4825-4829.

Chatenoud L., & Bach, J.F. (1990). Inflammation and rejection. *Nephrologie* 11 :189-193.

Chebloune Y., Sheffer D., Karr B.M., Stephens E. & Narayan O. (1996). Restrictive type of replication of ovine/caprine Lentiviruses in ovine fibroblast cell cultures. *Virology* 222 :21-30

Chirillo, P., Pagano, S., Natoli, G., Puri, P.L., Burgio, V.L., Balsano, C. & Levrero, M. (1997). The hepatitis B virus X gene induces p53-mediated programmed cell death. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* 94 :8162-8167.

Chou, J. & Roizman, B. (1992). The γ 134,5 gene of herpes simplex virus 1 precludes neuroblastoma cells from triggering total shutoff of protein synthesis characteristic of programmed cell death of neuronal cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89 :3266-3270.

Chu, Z.L., McKinsey, T.A., Liu, L., Gentry, J.J., Malim, M.H. & Ballard, D.W. (1997). Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94 :10057-10062.

Clem, R.J., Fechheimer, M. & Miller, L.K. (1991). Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science.* 254 :1388-1390.

Clements, J.E., Zinck, M.C., Narayan, O. & Gabuzda, D.H. (1994). Lentivirus infection of macrophages. *Immunol. Ser.* 60 :589-600.

Constantinou, A.I., Kamath, N. & Murley, J.S. (1998). Genistein inactivates bcl-2, delays the G2/M phase of the cell cycle, and induces apoptosis of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. *Eur J Cancer.* 34 :1927-1934.

Cunnion, K.M. (1999). Tumor necrosis factor receptors encoded by poxviruses. *Mol. Gen. Met.* 67 :278-282.

D

Daugas, E., Susin, S.A., Zamzami, N., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Larochette, N., Prevost, M.C., Leber, B., Andrews, D., Penninger, J. & Kroemer, G. (2000). Mitochondrion-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J.* 14:729-739.

Davies, M.V., Chang, H.W., Jacobs, B.L. & Kaufman, R.J. (1993). The E3L and K3L vaccinia virus gene products stimulate translation through inhibition of the double-stranded RNA-dependent protein kinase by different mechanisms. *J. Virol.* 67 :1688-1692.

De Boer, G.F. (1978). Zwoegerziekte virus, the causative agent for progressive interstitial pneumonia (Maedi) and meningo-leucoencephalitis (Visna) in sheep. *Res. Veter. Sc.* 18 :15-25.

del Llano, A.M., Amieiro-Puig, J.P., Kraiselburd, E.N., Kessler, M.J., Malaga, C.A. & Lavergne, J.A. (1993). The combined assessment of cellular apoptosis, mitochondrial function and proliferative response to pokeweed mitogen has prognostic value in SIV infection. *J. Med. Primatol.* 22:147-153.

Denzler, K.L. & Jacobs, B.L. (1994). Site-directed mutagenic analysis of reovirus sigma 3 protein binding to dsRNA. *Virology* 204 :190-199.

Desaintes, C., Demeret, C., Goyat, S., Yaniv, M. & Thierry, F. (1997). Expression of the papillomavirus E2 protein HeLa cells leads to apoptosis. *EMBO J.* 16 :504-514.

Desprès, P., Flamand, M., Ceccaldi, P.E. & Deubel, V. (1996). Human isolates of dengue type 1 virus induce apoptosis in mouse neuroblastoma cells. *J. Virol.* 70 :4090-4096.

- Desprès, P., Frenkiel, M.P., M., Ceccaldi, P.E., Duarte Dos Santos, C. & Deubel, V.** (1998). Apoptosis in the mouse central nervous system in response to infection with mouse-neurovirulent dengue viruses. *J. Virol.* 72 :823-829.
- Deveraux, Q.L., Roy, N., Stennicke, H.R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Salvesen, G.S. & Reed, J.C.** (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 17 :2215-2223.
- Djerbi, M., Screpanti, V., Catrina, A.I., Bogen, B., Biberfeld, P. & Grandien, A.** (1999). The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors. *J. Exp. Med.* 190 :1025-1032.
- Dobbelstein, M. & Shenk, T.** (1996). Protection against apoptosis by the vaccinia virus SPI-2 (B13R) gene product. *J. Virol.* 70 :6479-6485.
- Dong, Z., Saikumar, P., Weinberg, J.M. & Venkatachalam, M.A.** (1997). Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am. J. Pathol.* 151 : 1205-1213.
- Dreyfus, D.H., Nagasawa, M., Kelleher, C.A. & Gelfand, E.W.** (2000). Stable expression of Epstein-Barr virus BZLF-1-encoded ZEBRA protein activates p53-dependent transcription in human Jurkat T-lymphoblastoid cells. *Blood.* 96 :625-634.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. & Wang, X.** (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102 :33-42.
- Duarte Nunes dos Santos, C., Frenkiel, M.P., Courageot, M.P., Rocha, C.F.S., Vazeille-Falcoz, M.C., Wien, M.W., Rey, F.A., Deubel, V. & Desprès, P.** (2000). Determinants in the envelope E protein and viral RNA helicase NS3 that influence the induction of apoptosis in response to infection with dengue type 1 virus. *Virology* 274 :292-308.
- Duckett, C.S., Nava, V.E., Gedrich, R.W., Clem, R.J., Van Dongen, J.L., Gilfillan, M.C., Shiels, H., Hardwick, J.M. & Thompson, C.B.** (1996). A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J.* 15 :2685-2694.

Duncan, R., Muller, J., Lee, N., Esmali, A. & Nakhasi, H.L. (1999). Rubella virus-induced apoptosis varies among cell lines and is modulated by Bcl-XL and caspase inhibitors. *Virology* 255 :117-128.

Durkop, H., Latza, U., Hummel, M., Eitelbach, F., Seed, B. & Stein, H. (1992). Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell* 68 :421-427.

E

Earnshaw, W.C. (1995). Nuclear changes in apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7 :337-343.

Earnshaw, W.C., Martins, L.M., & Kaufmann, S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68 : 383-424.

Ekert, P.G. & Vaux, D.L. (1997). Apoptosis and the immune system. *Br. Med. Bull.* 53 :591-603.

El Etreby, M.F., Liang, Y. & Lewis, R.W. (2000). Induction of apoptosis by mifepristone and tamoxifen in human LNCaP prostate cancer cells in culture. *Prostate.* 43 :31-42.

El Etreby, M.F., Liang, Y., Wrenn, R.W. & Schoenlein, P.V. (1998). Additive effect of mifepristone and tamoxifen on apoptotic pathways in MCF-7 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 51 :149-168.

Elmore, L.W., Hancock, A.R., Chang, S.F., Wang, X.W., Chang, S., Callahan, C.P., Geller, D.A., Will, H. & Harris, C.C. (1997). Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* 94 :14707-14712.

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. & Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391 :43-50.

Esclaire, F., Terro, F., Yardin, C. & Hugon, J. (1998). Neuronal apoptosis is associated with a decrease in tau mRNA expression. *Neuroreport.* 9 :1173-1177.

Esiri, M.M., Morris, C.S. & Millard P. (1991). Fate of oligodendrocytes in HIV-infection. *AIDS*. 5 :1081-1088.

Evan, G. & Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science* 281 :1317-1321.

Everett, H. & Mc Fadden, G. (1999). Apoptosis : an innate immune response to virus infection. *Trends Microbiol.* 7 :160-165.

F

Farrow, S.N., White, J.H., Martinou, I., Raven, T., Pun, K.T., Grinham, C.J., Martinou, J.C. & Brown, R. (1995). Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* 374 :731-733.

Feldmann, G. (1999). L'apoptose. *Ann. Pharm. Fr.* 57 :291-308.

Ferrari, D., Stepczynska, A., Los, M., Wesselborg, S. & Schulze-Osthoff, K. (1998). Differential regulation and ATP requirement for caspase-8 and caspase-3 activation during CD95- and anticancer drug-induced apoptosis. *J Exp Med.* 1998 188 :979-984.

Ferri, K.F. & Kroemer, G. (2000). Control of apoptotic DNA degradation. *Nat. Cell Biol.* 2:E63-E64.

Fesus, L., Thomazy, V. & Falus, A. (1987). Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Lett.* 224 :104-108.

Finkel, T.H., Tudor-Williams, G., Banda, N.K., Cotton, M.F., Curiel, T., Monks, C., Baba, T.W., Ruprecht, R.M. & Kupfer, A. (1995). Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nat. Med.* 1:129-134.

Fouchier, R., Simon, J., Jaffe, A. & Malim, M. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 Vif does not influence expression or virion incorporation of gag-, pol-, and env-encoded proteins. *J.Virol.* 70 :8263-8269.

Froelich, C.J., Dixit, V.M. & Yang, X. (1998). Lymphocyte granule-mediated apoptosis: matters of viral mimicry and deadly proteases. *Immunol. Today.* 19 :30-36.

G

Gäken, J.A., Tavassoli, M., Gan, S.U., Vallian, S., Giddings, I., Darling, D.C., Galea-Lauri, J., Thomas, M.G., Abedi, H., Schreiber, V., Ménissier de Murcia, J., Collins, M.K.L., Shall, S. & Farzaneh, F. (1996). Efficient retroviral infection of mammalian cells is blocked by inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase activity. *J. Virol.* 70:3992-4000.

Galvan, V., Brandimarti, R., Munger, J. & Roizman, B. (2000). Bcl-2 blocks a caspase-dependent pathway of apoptosis activated by herpes simplex virus 1 infection in Hep-2 cells. *J. Virol.* 74:1931-1938.

Gandhi, R.T., Chen, B.K., Straus, S.E., Dale, J.K., Leonardo, M.J. & Baltimore, D. (1998). HIV-1 directly kills CD4+ T cells by a Fas-independent mechanism. *J. Exp. Med.* 187:1113-1122.

Gdovin, S.L. & Clements, J.E. (1992). Molecular mechanisms of visna virus Tat : identification of the targets for transcriptional activation and evidence for post-transcriptional effect. *Virology* 188 :438-450.

Gendelman, R., Orzech, Y., Mashiah, P., Birenbaum, M., Gazit, A. & Yaniv, A. (1997). Productive replication of caprine arthritis-encephalitis virus is associated with induction of apoptosis. *J. Gen. Virol.* 78:801-805.

Goldstein, J.C., Waterhouse, N.J., Juin, P., Evan, G.I. & Green, D.R. (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat. Cell Biol.* 2 :156-162.

Golstein, P., Ojcius, D.M. & Young, J.D. (1991). Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol. Rev.* 121 :29-65.

Gonda, M.A. & Oberste, M.S. (1992). AIDS – The human immunodeficiency virus : molecular and structural aspects of its biology. In : *Control of Virus Diseases*. New York : Ed. E. Kurstak, 3-31.

Goswami, J., Sinskey, A.J., Steller, H., Stephanopoulos, G.N. & Wang, D.I. (1999). Apoptosis in batch cultures of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng.* 62 :632-640.

Granville, D.J., Carthy, C.M., Jiang, H., Shore, G.C., McManus, B.M. & Hunt, D.W. (1998). Rapid cytochrome c release, activation of caspases 3, 6, 7 and 8 followed by Bap31 cleavage in HeLa cells treated with photodynamic therapy. *FEBS Lett.* 437 :5-10.

Green, D.R. (1998). Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 94:695-698.

Gross, A., McDonnell, J.M. & Korsmeyer, S.J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13 :1899-1911.

H

Haldar, S., Jena, N. & Croce, C. M. (1995). Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92 :4507-4511.

Harmache, A., Bouyac, M., Audoly, G., Hieblot, C., Peveri, P., Vigne, R. & Suzan, M. (1995). The vif gene is essential for efficient replication of caprine arthritis encephalitis virus in goat synovial membrane cells and affects the late steps of the virus replication cycle. *J. Virol.* 69 :3247-3257.

Harmache, A., Russo, P., Guiguen, F., Vitu, C., Vignoni, M., Bouyac, M, Hébiot, C., Pépin, M., Vigne, R. & Suzan, M. (1996). Requirement of Caprine Arthritis Encephalitis Virus vif gene for in vivo replication. *Virology* 224 :246-255.

Harouse, J.M., Kunsch, C., Hartle, H.T., Laughlin, M.A., Hoxie, J.A., Wigdahl, B. & Gonzalez-Scarano, F. (1989). CD4-independent infection of human neural cells by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 63 :2527-2533.

Harter, D.H., Axel, R., Burny, A., Gulati, S., Schlom, J. & Spiegelman, S. (1973). The relationship of Visna, Maedi and RNA tumor viruses as studies by molecular hybridization. *Virology.* 53 :287-291.

Hayman, M., Arbuthnott, G., Harkiss, G., Brace, H., Filippi, P., Philippon, V., Thomson, D., Vigne, R. & Wright, A. (1993). Neurotoxicity of peptide analogues of the transactivating protein tat from Maedi-visna virus and human immunodeficiency virus. *Neuroscience* 53 :1-6.

He, B., Gross, M. & Roizman, B. (1997). The $\gamma_{134,5}$ protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1 α to dephosphorylate the α subunit of the eukaryotic

translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94 :843-848.

He, J., Choe, S., Walker, R., Di Marzio, P., Morgan, D.O. & Landau, N.R. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J. Virol.* 69 :6705-11.

Hengartner, M.O. & Horvitz, H.R. (1994). Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4 :581-586.

Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407 :770-776.

Hengartner, M.O., Ellis, R.E. & Horvitz, H.R. (1992). *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 356 :494-499.

Hesselgesser, J., Taub, D., Baskar, P., Greenberg, M., Hoxie, J., Kolson, D.L. & Horuk, R. (1998). Neuronal apoptosis induced by HIV-1 gp120 and the chemokine SDF-1 α is mediated by the chemokine receptor CXCR4. *Curr. Biol.* 8 :595-598.

Heusel, J.W., Wesselschmidt, R.L., Shresta, S., Russell, J.H. & Ley, T.J. (1994). Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 76 :977-987.

Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, S.A., Dallaporta, B., Zamzami, N., Marzo, I., Geuskens, M. & Kroemer, G. (1997). The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 15 :1573-1581.

Horvitz, H.R. (1999). Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res.* 59 :1701s-1706s.

Horvitz, H.R., Shaham, S. & Hengartner, M.O. (1994). The genetics of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 59 :377-385.

Hotzel, I. & Cheevers, W.P. (2002). A maedi-visna virus strain K1514 receptor gene is located in sheep chromosome 3p and the syntenic region of human chromosome 2. *J Gen Virol.* 83 :1759-1764.

Hsu, H., Xiong, J. & Goeddel, D.V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81 :495-504.

Huang, C.M., Ruddel, M. & Elin, R.J. (1988). Enzyme abnormalities of patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin. Chem.* 34:2574-2576.

Hyun, S.J., Yoon, M.Y., Kim, T.H. & Kim, J.H. (1997). Enhancement of mitogen-stimulated proliferation of low dose radiation-adapted mouse splenocytes. *Anticancer Res.* 17 :225-229.

I

Iacampo, S. & Cochrane, A. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 Rev function requires continued synthesis of its target mRNA. *J. Virol.* 69 :7909-7916.

Inoue, Y., Yasukawa, M. & Fujita, S. (1997). Induction of T-cell apoptosis by human herpesvirus 6. *J. Virol.* 71 :3751-3759.

Ito, M., Yamamoto, T., Watanabe, M., Ihara, T., Kamiya, H. & Sakurai, M. (1996). Detection of measles virus-induced apoptosis of human monocytic cell line (THP-1) by DNA fragmentation ELISA. *FEMS Imm. Med. Microbiol.* 15 :115-122.

Ivanov, V.N. & Nikolic-Zugic, J. (1998). Biochemical and kinetic characterization of the glucocorticoid-induced apoptosis of immature CD4+CD8+ thymocytes. *Int Immunol.* 10 :1807-1817.

J

Jacotot, E., Ravagnan, L., Loeffler, M., Ferri, K.F., Vieira, H.L., Zamzami, N., Costantini, P., Druillennec, S., Hoebeke, J., Briand, J.P., Irinopoulou, T., Daugas, E., Susin, S.A., Cointe, D., Xie, Z.H., Reed, J.C., Roques, B.P. & Kroemer, G. (2000). The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *J. Exp. Med.* 191 :33-46.

Johnson, D., Lanahan, A., Buck, C.R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E., Bothwell, M. & Chao, M. (1986). Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 47 :545-554.

Jung, Y.K. & Yuan, J. (1997). Suppression of interleukin-1beta converting enzyme (ICE)-induced apoptosis by SV40 large T antigen. *Oncogene*. 14 :1207-1214.

K

Kang, J.-I., Park, S.H., Lee, P.W. & Ahn, B.Y. (1999). Apoptosis is induced by Hantaviruses in cultured cells. *Virology* 264 :99-105.

Katze, M.G. (1995). Regulation of the interferon-induced PKR : can viruses cope ? *Trends Microbiol.* 3 :75-78.

Kaufmann, S.H., Mesner, P.W. Jr., Samejima, K., Tone, S. & Earnshaw, W.C. (2000). Detection of DNA cleavage in apoptotic cells. *Methods Enzymol.* 322 :3-15.

Kawahara, A., Kobayashi, T. & Nagata, S. (1998). Inhibition of Fas-induced apoptosis by Bcl-2. *Oncogene* 17 :2549-2554.

Kawanishi, M. (1997). Epstein-Barr virus BHRF1 protein protects intestine 407 epithelial cells from apoptosis induced by tumor necrosis factor alpha and anti-Fas antibody. *J. Virol.* 71 :3319-3322.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26 :239-257.

King, K.L. & Cidlowski, J.A. (1998). Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60 :601-617.

Knecht, H., Berger, C., Mc Quain, C., Rothenberger, S., Bachmann, E., Martin, J., Esslinger, C., Drexler, H.G., Cai, Y.C., Quesenberry, P.J. & Odermatt, B.F. (1999). Latent membrane protein 1 associated signaling pathways are important in tumor cells of Epstein-Barr virus negative Hodgkin's disease. *Oncogene* 18 :7161-7167.

Kolesnitchenko, V., King, L., Riva, A., Tani, Y., Korsmeyer, S.J. & Cohen, D.I. (1997). A major immunodeficiency virus type 1-initiated killing pathway distinct from apoptosis. *J. Virol.* 71 :9753-9763.

- Kolzau, T., Hansen, R.S., Zahra, D., Reddel, R.R. & Braithwaite, A.W.** (1999). Inhibition of SV40 large T antigen induced apoptosis by small T antigen. *Oncogene*. 18 :5598-5603.
- Korant, B.D., Strack, P., Frey, M.W. & Rizzo, C.J.** (1998). A cellular anti-apoptosis protein is cleaved by the HIV-1 protease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 436 :27-29.
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Koths, K., Kwiatkowski, D.J. & Williams, L.T.** (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278 :294-298.
- Kraft, M.S., Henning, G., Fickenscher, H., Lengenfelder, D., Tschopp, J., Fleckenstein, B. & Meinel, E.** (1998). Herpesvirus saimiri transforms human T-cell clones to stable growth without inducing resistance to apoptosis. *J. Virol.* 72 :3138-3145.
- Krajewska, M., Wang, H.G., Krajewski, S., Zapata, J.M., Shabaik, A., Gascoyne, R. & Reed, J.C.** (1997). Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res.* 57 :1605-1613.
- Krammer, P.H.** (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407 :789-795.
- Kroemer, G. & Reed, J.C.** (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* 6 :513-519.
- Kroemer, G., Dallaporta, B. & Resche-Rigon, M.** (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Ann. Rev. Physiol.* 60 :619-642.
- Kroemer, G., Zamzami, N. & Susin, S.A.** (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today* 18 :44-51
- Kruman, I.I., Nath, A. & Mattson, M.P.** (1998). HIV-1 protein Tat induces apoptosis of hippocampal neurons by a mechanism involving caspase activation, calcium overload, and oxidative stress. *Exp. Neurol.* 154 :276-288.
- Kumi-Diaka, J., Rodriguez, R. & Goudaze, G.** (1998). Influence of genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone) on the growth and proliferation of testicular cell lines. *Biol Cell.* 90 :349-354.

L

Larrouturou, S. (1993). *Activité in vitro* de substances antirétrovirales contre le virus Visna-Maedi. Evaluation de plusieurs méthodes. (Thèse Doct. Pharm. Limoges).

Lauthier, F., Taillet, L., Trouillas, P., Delage, C. & Simon, A. (2000). Ursolic acid triggers calcium-dependent apoptosis in human Daudi cells. *Anticancer Drugs*. 11 :737-745.

Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G. & Earnshaw, W.C. (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371:346-347.

Le Rhun, Y., Kirkland, J.B. & Shah, G.M. (1998). Cellular response to DNA damage in the absence of Poly(ADP-Ribose)Polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 245 :1-10.

Leist, M., Single, B., Castoldi, A., Kühnle, S. & Nicotera, P. (1997). Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration : a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.* 185 :1481-1486.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91 :479-489.

Lin Y., Nomura, T., Cheong, J., Dorjsuren, D., Iida, K. & Murakami, S. (1997). Hepatitis B virus X protein is a transcriptional modulator that communicates with transcription factor IIB and the RNA polymerase II subunit 5. *J. Biol. Chem.* 272 :7132-7139.

Liston, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, S., Cherton-Horvat, G., Farahani, R., McLean, M., Ikeda, J.E., MacKenzie, A. & Korneluk, R.G. (1996). Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 379 :349-353.

Liu, Q.A. & Hengartner, M.O. (1998). Candidate adaptor protein CED-6 promotes the engulfment of apoptotic cells in *C. elegans*. *Cell* 93 :961-972.

Liu, W. & Zhang, R. (1998). Upregulation of p21WAF1/CIP1 in human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-468 undergoing apoptosis induced by natural product anticancer drugs 10-hydroxycamptothecin and camptothecin through p53-dependent and independent pathways. *Int J Oncol.* 12 :793-804.

Liu, X., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W.T. & Wang, X. (1998). The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95 : 8461-8466.

Liu, X., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89 :175-184.

Longthorne, V.L., & Williams, G.T. (1997). Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis. *EMBO J.* 16 :3805-3812.

Lowe, S.W. & Ruley, H.E. (1993). Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes Dev.* 7 :535-545.

Lu, Y., Wambach, M., Katze, M.G. & Krug, R.M. (1995). Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation. *Virology* 214 :222-228.

M

Macho, A., Castedo, M., Marchetti, P., Aguilar, J.J., Decaudin, D., Zamzami, N., Girard, P.M., Uriel, J. & Kroemer, G. (1995). Mitochondrial dysfunctions in circulating T lymphocytes from human immunodeficiency virus-1 carriers. *Blood* 86 :2481-2487.

Manna, S.K. & Aggarwal, B.B. (2000). Differential requirement for p56lck in HIV-tat versus TNF-induced cellular responses: effects on NF-kappa B, activator protein-1, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. *J. Immunol.* 164 :5156-5166.

Margolin, N., Raybuck, S.A., Wilson, K.P., Chen, W., Fox, T., Gu, Y. & Livingston, D.J. (1997). Substrate and inhibitor specificity of interleukin-1 beta-converting enzyme and related caspases. *J. Biol. Chem.* 272 :7223-7228.

Marianneau, P., Cardona, A., Edelman, L., Deubel, V. & Desprès, P. (1997). Dengue virus replication in human hepatoma cells activates NF-kappa B which in turn induces apoptotic cell death. *J. Virol.* 71 :3244-3249.

Marianneau, P., Flamand, M., Courageot, M.P., Deubel, V. & Desprès, P. (1998a). La mort cellulaire par apoptose en réponse à l'infection par le virus de la dengue : quelles conséquences dans la pathologie virale ? *Ann. Biol. Clin.* 56 :395-405.

Marianneau, P., Flamand, M., Deubel, V. & Desprès, P. (1998b). Apoptotic cell death in response to dengue virus infection : the pathogenesis of dengue haemorrhagic fever revisited. *Clin. Diagn. Virol.* 10 :113-119.

Marianneau, P., Steffan, A.M., Royer, C., Drouet, M.T., Jaeck, D., Kirn, A. & Deubel, V. (1999). Infection of primary cultures of human Kupffer cells by dengue virus : no viral progeny synthesis, but cytokine production is evident. *J. Virol.* 73 :5181-5185.

Marsh, H. (1923). Progressive pneumonia in sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 62 :458-473.

Marshall, W.L., Yim, C., Gustafson, E., Graf, T., Sage, D.R., Hanify, K., Williams, L., Fingerroth, J. & Finberg, R.W. (1999). Epstein-Barr virus encodes a novel homolog of the bcl-2 oncogene that inhibits apoptosis and associated with Bax and Bak. *J. Virol.* 73 :5181-5185.

Marsters, S.A., Sheridan, J.P., Donahue, C.J., Pitti, R.M., Gray, C.L., Goddard, A.D., Bauer, K.D. & Ashkenazi, A. (1996). Apo-3, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF-kappa B. *Curr. Biol.* 6 :1669-1676.

Martins, L.M., Kottke, T.J., Kaufmann, S.H. & Earnshaw, W.C. (1998). Phosphorylated forms of activated caspases are present in cytosol from HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis. *Blood* 92 :3042-3049.

Marusawa, H., Hijikata, M., Chiba, T. & Shimotohno, K. (1999). Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF- κ B activation. *J. Virol.* 73 :4713-4720.

- Mazarin, V., Gourdou, I., Quérat, G., Sauze, N., Audoly, G., Vitu, C., Russo, P., Rousselot, C., Filippi, P. & Vigne, R.** (1990). Subcellular localization of rev-gene product in visna virus-infected cells. *Virology* 178 :305-310.
- Medema, J.P., Toes, R.E., Scaffidi, C., Zheng, T.S., Flavell, R.A., Melief, C.J., Peter, M.E., Offringa, R. & Krammer, P.H.** (1997). Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 27 :3492-3498.
- Megyeri, K., Berensci, K., Halazonetis, T.D., Prendergast, G.C., Gri, G., Plotskin, S.A., Rovera, G. & Gönczöl, E.** (1999). Involvement of a p53-dependent pathway in rubella virus-induced apoptosis. *Virology* 259 :74-84.
- Mehmet, H.** (2000). Caspases find a new place to hide. *Nature* 403 :29-30.
- Meier, P., Finch, A. & Evan, G.** (2000a). Apoptosis in development. *Nature* 407 :796-800.
- Meier, P., Silke, J., Leever, S.J. & Evan, G.** (2000b). The Drosophila caspase DRONC is regulated by DIAP1. *EMBO J.* 19 :598-611.
- Meredith, J.E. & Schwartz, M.A.** (1997). Integrins, adhesion and apoptosis. *Trends Cell. Biol.* 7 :146-150.
- Micoli, K.J., Pan, G., Wu, Y., Williams, J.P. & Cook, J.M.M.J.** (2000). Requirement of calmodulin binding by HIV-1 gp160 for enhanced Fas-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275 :1233-1240.
- Miller, L.K.** (1997). Baculovirus interaction with host apoptotic pathways. *J. Cell. Physiol.* 173 :178-182.
- Miller, W.E., Cheshire, J.L., Baldwin, Jr. A.S. & Raab-Traub, N.** (1998). The NPC derived C15 LMP1 protein confers enhanced activation of NF- κ B and induction of the EGFR in epithelial cells. *Oncogene* 16 :1869-1877.
- Morimoto, K., Hooper, D.C., Spitsin, S., Koprowski, H. & Dietzschold, B.** (1999). Pathogenicity of different rabies virus variants inversely correlates with apoptosis and rabies virus glycoprotein expression in infected primary neurons cultures. *J. Virol.* 73 :510-518.
- Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettesheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.L., Ng, S.L. & Fesik, S.W.**

(1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381 :335-341.

Münger, K., Werness, B.A., Dyson, N., Phelps, W.C., Harlow, E. & Howley, P.W. (1989). Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* 8 :4099-4105.

Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S. & Dixit, V.M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.* 273 :2926-2930.

N

Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* 88 :355-365.

Nagata, S. (1999). Fas ligand-induced apoptosis. *Annu. Rev. Genet.* 33 :29-55.

Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.* 256 :12-18.

Narayan, O & Clements, J.E. (1989). Biology and pathogenesis of lentivirus. *J. Gen. Virol.* 70 :1617-1639.

Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R.J., Matsuda, H. & Tsujimoto, Y. (1998). Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95 :14681-14686.

Nava, V.E., Cheng, E.H., Veluona, M., Zou, S., Clem, R.J., Mayer, M.L. & Hardwick, J.M. (1997). Herpesvirus saimiri encodes a functional homolog of the human bcl-2 oncogene. *J. Virol.* 71 :4118-4122.

Nava, V.E., Rosen, A., Veluona, M.A., Clem, R.J., Levine, B. & Hardwick, J.M. (1998). Sindbis virus induces apoptosis through a caspase-dependent, CrmA-sensitive pathway. *J. Virol.* 72 :452-459.

Neurath, M.F., Finotto, S., Fuss, I., Boirivant, M., Galle, P.R., & Strober, W. (2001). Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease : to die or not to die, that is the mucosal question. *Trends Immunol.* 22 :21-26.

Neuveut, C., Vigne, R., Clements, J.E. & Sire, J. (1993). The visna transcriptional activator TAT : effects on the viral LTR and on cellular genes. *Virology* 197 :236-244.

Ng, F.W. & Shore, G.C. (1998). Bcl-XL cooperatively associates with the Bap31 complex in the endoplasmic reticulum, dependent on procaspase-8 and Ced-4 adaptor. *J. Biol. Chem.* 273 :3140-3143.

Nicholson, D.W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 6 :1028-1042.

Nishizawa, M., Kamata, M., Katsumata, R. & Aida, Y. (2000). A carboxy-terminally truncated form of the human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein induces apoptosis via G(1) cell cycle arrest. *J. Virol.* 74 :6058-6067.

O

Oberhammer, F., Wilson, J.W., Dive, C., Morris, I.D., Hickman, J.A., Wakeling, A.E., Walker, P.R. & Sikorska, M. (1993). Apoptotic death in epithelial cells : cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J.* 12 :3679-3684.

O'Brien V. (1998). Viruses and apoptosis. *J. Gen. Virol.* 79 :1833-1845.

Onozawa, M., Fukuda, K., Ohtani, M., Akaza, H., Sugimura, T. & Wakabayashi, K. (1998). Effects of soybean isoflavones on cell growth and apoptosis of the human prostatic cancer cell line LNCaP. *Jpn J Clin Oncol.* 28 :360-363.

Ozaki, K. & Hanazawa, S. (2001). *Porphyromonas gingivalis* fimbriae inhibit caspase-3-mediated apoptosis of monocytic THP-1 cells under growth factor deprivation via extracellular signal-regulated kinase-dependent expression of p21 Cip/WAF1. *Infect Immun.* 69 :4944-4950.

P

Pahl, H.L. & Baeurle, P.A. (1997). The ER-overload response : activation of NF- κ B. Trends Biochem. Sci. 22 :63-67.

Palsson P.A. : Maedi/Visna, a slow virus disease. 8^{ème} Conférence de la commission régionale de l'O.I.E. pour l'Europe. Hambourg 1978. Rapport n°203 bis.

Palsson, P.A. Maedi-visna in sheep, in : Kimberlin R.H. (Ed.), Slow Virus Diseases of Animal and Man, Amsterdam , 1976, pp. 17-43.

Pan, G., Bauer, J.H., Haridas, V., Wang, S., Liu, D., Yu, G., Vincenz, C., Aggarwal, B. B., Ni, J. & Dixit, V.M. (1998). Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. FEBS Lett. 431 :351-356.

Pekelder, J.J., Veenink, G.J., Akkermans, J.P., Van Eldik, P., Elving, L. & Houwers, D.J. (1994). Ovine lentivirus induced indurative lymphocytic mastitis and its effects on the growth of lambs. Vet. Res. 134 :348-350.

Pépin, M., Vitu, C., Russo, P., Mornex, J.-F. & Peterhans, E. (1998). Maedi-Visna virus infection in sheep : a review. Vet. Res. 29 :341-367.

Perez, D. & White, E. (2000). TNF-signals apoptosis through a bid-dependent conformational change in Bax that is inhibited by E1B19K. Mol. Cell 6 :53-63.

Pestka, S., Langer, J.A., Zoon, K.C. & Samuel, C.E. (1987). Interferons and their actions. Annu. Rev. Biochem. 56 :727-777.

Petit, P.X., Zamzami, N., Vayssiere, J.L., Mignotte, B., Kroemer, G. & Castedo, M. (1997). Implication of mitochondria in apoptosis. Mol. Cell Biochem. 174 :185-188.

Petit-Frere, C., Capulas, E., Lyon, D.A., Norbury, C.J., Lowe, J.E., Clingen, P.H., Riballo, E., Green, M.H. & Arlett, C.F. (2000). Apoptosis and cytokine release induced by ionizing or ultraviolet B radiation in primary and immortalized human keratinocytes. Carcinogenesis. 21 :1087-1095.

Petursson, G., Turelli, P., Matthiasdottir, S., Georgsson, G., Andresson, O.S., Torsteindottir, S., Vigne, R., Andresdottir, V., Gunnarsson, E., Agnarsdottir, G. &

Quérat, G. (1998). Visna virus dUTPase is dispensable for neuropathogenicity. *J. Virol.* 72 :1657-1661.

Philippon, V., Vellutini, C., Gambarelli, D., Harkiss, G., Arbuthnott, G., Metzger, D., Roubin, R. & Filippi, P. (1994). The basic domain of the lentiviral tat protein is responsible for damages in mouse brain : involvement of cytokines. *Virology* 205 :519-529.

Plymale, D.R., Ng Tang, D.S., Comardelle, A.M., Fermin, C.D., Lewis, D.E. & Garry, R.F. (1999). Both necrosis and apoptosis contribute to HIV-1-induced killing of CD4 cells. *AIDS* 13 :1827-1839.

Poon, B., Grovit-Ferbas, K., Stewart, S.A. & Chen, I.S. (1998). Cell cycle arrest by Vpr in HIV-1 virions and insensitivity to antiretroviral agents. *Science.* 281 :266-269.

Prikhod'ko, G.G., Wang, Y., Freulich, E., Prives, C. & Miller, L.K. (1999). Baculovirus p33 binds p53 and enhances p53-mediated apoptosis. *J. Virol.* 73 :1227-1234.

R

Raff, M.C. (1992). Social controls on cell survival and death : an extreme view. *Nature* 356 :397-400.

Raff, M.C., Barres, B.A., Burne, J.F., Coles, H.S., Ishizaki, Y. & Jacobson, M.D. (1993). Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 262 :695-700.

Ramdas, J. & Harmon, J.M. (1998). Glucocorticoid-induced apoptosis and regulation of NF-kappaB activity in human leukemic T cells. *Endocrinology.* 139 :3813-3821.

Rao, L., Modha, D. & White, E. (1997). The E1B 19K protein associates with lamins in vivo and its proper localization is required for inhibition of apoptosis. *Oncogene* 15 :1587-1597.

Rao, L., Perez, D. & White, E. (1996). Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J. Cell. Biol.* 135 :1441-1455.

- Rasola, A., Far, D.F., Hofman, P. & Rossi, B.** (1999). Lack of internucleosomal DNA fragmentation is related to Cl^- efflux impairment in hematopoietic cell apoptosis. *FASEB J.* 13 :1711-1723.
- Ray, R.B., Meyer, K., Steele, R., Shrivastava, A., Aggarwal, B.B. & Ray, R.** (1998). Inhibition of tumor necrosis factor (TNF- α)-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *J. Biol. Chem.* 273 :2256-2259.
- Re, F., Braaten, D., Franke, E.K. & Luban, J.** (1995). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34cdc2-cyclin B. *J. Virol.* 69 :6859-6864.
- Reed, J.C., Jurgensmeier, J.M. & Matsuyama, S.** (1998). Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1366 :127-137.
- Reed, L.J. & Muench, H.** (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27 :493-497.
- Reicin, A.S., Ohagen, A., Hoglund, S. & Goff, S.P.** (1996). The role of Gag in human immunodeficiency virus type 1 virion morphogenesis and early steps of the viral life cycle. *J. Virol.* 70 :8645-8652.
- Rich, T., Allen, R.L. & Wyllie, A.H.** (2000). Defying death after DNA damage. *Nature* 407 :777-783.
- Rich, T., Stephens, R., & Trowsdale, J.** (1999). MHC linked genes associated with apoptosis/programmed cell death. *Biochem. Soc. Transactions* 27 :781-785.
- Rivera, S., Guillot, S., Agassandian, C., Ben Ari, Y. & Khrestchatisky, M.** (1998). Serum deprivation-induced apoptosis in cultured hippocampi is prevented by kainate. *Neuroreport.* 9 :3949-3953.
- Roulston, A., Marcellus, R.C. & Branton, P.E.** (1999). Viruses and apoptosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 53 :577-628.
- Roy, S. & Nicholson, D.W.** (2000). Cross-talk in cell death signaling. *J. Exp. Med.* 192 :F21-F25.

Roy, S. & Nicholson, D.W. (2000). Programmed cell-death regulation: basic mechanisms and therapeutics opportunities. *Mol. Med Today* 6 :264-266.

Rudel, T. & Bokoch, G.M. (1997). Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 276 :1571-1574.

S

Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J.M., Manjeri, A., & Venkatacham, M.B. (1999). Apoptosis : definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am. J. Med.* 107 :489-506.

Sakahira, H., Enari, M. & Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391 :96-99.

Sakahira, H., Enari, M., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y. & Nagata, S. (1999). Apoptotic nuclear morphological change without DNA fragmentation. *Current Biol.* 9 :543-546.

Saltarelli, M.J., Schoborg, R.V., Gdovin, S.L. & Clements, J.E. (1993). The CAEV tat gene trans-activates the viral LTR and is necessary for efficient viral replication. *Virology* 197 :35-44.

Salvesen, G.S. & Dixit, V.M. (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell.* 91 :443-446.

Samuel, C.E. (1991). Antiviral actions of interferon. Interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities. *Virology.* 183 :1-11.

Samuel, C.E. (1993). The eIF-2 alpha protein kinases, regulators of translation in eukaryotes from yeasts to humans. *J. Biol. Chem.* 268 :7603-7606.

Sandberg, M., Hammerschmidt, W. & Sugden, B. (1997). Characterization of LMP-1's association with TRAF1, TRAF2 and TRAF3. *J. Virol.* 71 :4649-4656.

Sarid, R., Wiezorek, J.S., Moore, P.S. & Chang, Y. (1999). Characterization and cell cycle regulation of the major Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) latent genes and their promoter. *J Virol.* 73 :1438-1446.

- Sasaki, M., Uchiyama, J., Ishikawa, H., Matsushita, S., Kimura, G., Nomoto, K. & Koga, Y.** (1996). Induction of apoptosis by calmodulin-dependent intracellular Ca^{2+} elevation in CD4^+ cells expressing gp160 of HIV. *Virology* 224 :18-24.
- Sattler, M., Liang, H., Nettlesheim, D., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Eberstadt, M., Yoon, H.S., Shuker, S.B., Chang, B.S., Minn, A.J., Thompson, C.B. & Fesik, S.W.** (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 275 :983-986.
- Savey, M., Parodi, A.L., Espinasse, J. & Kiener, T.** (1982). Aspects cliniques et anatomo-pathologiques du Maedi chez les ovins en France. *Le point Vétérinaire*. 14 :47-52.
- Savill, J. & Fadok, V.** (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407 : 784-788.
- Schlesinger, M., Jiang, J.D., Roboz, J.P., Denner, L., Ling, Y.H., Holland, J.F. & Bekesi, J.G.** (2000). 3-m-bromoacetyl amino benzoic acid ethyl ester : a new cancericidal agent that activates the apoptotic pathway through caspase-9. *Biochem. Pharmacol.* 60 :1693-1702.
- Schlesinger, P.H., Gross, A., Yin, X.M., Yamamoto, K., Saito, M., Waksman, G. & Korsmeyer, S.J.** (1997). Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94 :11357-11362.
- Seavey, S.E., Holubar, M., Saucedo, L.J. & Perry, M.E.** (1999). The E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16 stabilizes p53 through a mechanism independent of p19^{ARF}. *J. Virol.* 73 :7590-7598.
- Sedlak, T.W., Oltvai, Z.N., Yang, E., Wang, K., Boise, L.H., Thompson, C.B. & Korsmeyer, S.J.** (1995). Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92 :7834-7838.
- Selliah, N. & Finkel, T.H.** (2001). Biochemical mechanisms of HIV-induced T-cell apoptosis. *Cell Death Differ.* 8 :127-136.
- Shimizu, S., Narita, M., & Tsujimoto, Y.** (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399 :483-487.

- Shisler, J., Duerksen-Hughes, P., Hermiston, T.M., Wold, W.S. & Gooding, L.R.** (1996). Induction of susceptibility to tumor necrosis factor by E1A is dependent on binding to either p300 or p105-Rb and induction of DNA synthesis. *J. Virol.* 70 : 68-77.
- Shisler, J.L. & Moss, B.** (2001). Molluscum contagiosum virus inhibitors of apoptosis : The MC159 v-FLIP protein blocks Fas-induced activation of procaspases and degradation of the related MC160 protein. *Virology* 282 :14-25.
- Shoborg, R.V. & Clements, J.E.** (1994). The Rev protein of Visna virus is localized to the nucleus of infected cells. *Virology* 202 :485-490.
- Sigurdardottir, B & Thormar, H.** (1964). Isolation of viral agent from the lungs of sheep affected with Maedi. *J. Infect. Dis.* 114 :55-60.
- Sigurdsson, B., Grimsson, H. & Palsson, P.A.** (1952). Maedi, a chronic progressive infection of sheep lungs. *J. Infect. Dis.* 90 :233-241.
- Sigurdsson, B., Palsson, P.A. & Grimsson, H.** (1957). Visna, a demyelinating transmissible disease of sheep. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 16 :389-403.
- Sigurdsson, B., Palsson, P.A. & Tryggvadottir, A.** (1953). Transmission experiments with Maedi. *J. Infect. Dis.* 166-175.
- Sigurdsson, B., Thormar, H & Palsson, P.A.** (1960). Cultivation of Visna virus in tissue culture. *Arch. Ges. Virusforsch.* 10 :368.
- Silins, S.L. & Sculley, T.B.** (1995). Burkitt's lymphoma cells are resistant to programmed cells death in the presence of the Epstein-Barr virus latent antigen EBNA-4. *Int. J. Cancer* 60 :65-72.
- Simonen, M., Keller, H. & Heim, J.** (1997). The BH3 domain of Bax is sufficient for interaction of Bax with itself and with other family members and it is required for induction of apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 249 :85-91.
- Sirma, H., Giannini, C., Poussin, K., Paterlini, P., Kremsdorf, D. & Bréchet, C.** (1999). Hepatitis B virus X mutants, present in hepatocellular carcinoma tissue abrogate both the antiproliferative and transactivation effects of HBx. *Oncogene* 18 :4848-4859.

- Smith, C.A., Davis, T., Anderson, D., Solam, L., Beckmann, M.P., Jerzy, R., Dower, S. K., Cosman, D. & Goodwin, R.G.** (1990). A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* 248 :1019-1023.
- Smith, C.A., Farrah, T. & Goodwin, R.G.** (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins : activation, costimulation, and death. *Cell* 76 :959-962.
- Sonigo, P., Alizon, M., Staskus, K., Klatzmann, D., Cole, S., Danos, O., Retzel, E., Tiollais, P., Haase, A. & Wain-Hobson, S.** (1985). Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationship to the AIDS virus. *Cell*. 42 :369-382.
- Sperandio, S., De Belle, I., & Bredessen D.E.** (2000). An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 97 :14376-14381.
- Stamenkovic, I., Clark, E.A. & Seed, B.** (1989). A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *EMBO J*. 8 :1403-1410.
- Stennicke, H.R. & Salvesen, G.S.** (2000). Caspase assays. *Methods Enzymol*. 322 :91-100.
- Stennicke, H.R., Ryan, C.A. & Salvesen, G.S.** (2002). Reprieve from execution: the molecular basis of caspase inhibition. *Trends Biochem. Sci*. 27 :94-101.
- Stewart, S.A., Poon, B., Jowett, J.B.M., Xie, Y. & Chen, I.S.Y.** (1999). Lentiviral delivery of HIV-1 Vpr protein induces apoptosis in transformed cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96 :12039-12043.
- Stewart, S.A., Poon, B., Song, J.Y. & Chen, I.S.** (2000). Human immunodeficiency virus type 1 vpr induces apoptosis through caspase activation. *J Virol*. 74 :3105-3111.
- Strack, P.R., Frey, M.W., Rizzo, C.J., Cordova, B., George, H.J., Meade, R., Ho, S.P., Corman, J., Tritch, R. & Korant, B.D.** (1996). Apoptosis mediated by HIV protease is preceded by cleavage of Bcl-2. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 93 :9571-9576.
- Strange, R., Metcalfe, T., Thackray, L. & Dang, M.** (2001). Apoptosis in normal and neoplastic mammary gland development. *Microsc. Res. Tech*. 52 :171-181.

Stuppia, L., Gobbi, P., Zamai, L., Palka, G., Vitale, M. & Falcieri, E. (1996). Morphometric and functional study of apoptotic cell chromatin. *Cell Death Differ.* 3 :397-405.

Su, F. & Schneider, R.J. (1997). Hepatitis B virus HBx protein sensitizes cells to apoptosis killing by tumor necrosis factor alpha. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94 :8744-8749.

Sun, X.M., MacFarlane, M., Zhuang, J., Wolf, B.B., Green, D.R. & Cohen, G.M. (1999). Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274 :5053-5060.

Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M. & Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397 :441-446.

Susin, S.A., Zamzami, N. & Kroemer, G. (1998). Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim. Biophys. Acta* 1366 :151-165.

Szekely, L., Selivanova, G., Magnusson, K.P., Klein, G. & Wiman, K.G. (1993). EBNA-5, an Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 90 :5455-5459.

T

Taddeo, B., Nickoloff, B.J. & Foreman, K.E. (2000). Caspase inhibitor blocks human immunodeficiency virus 1-induced T-cell death without enhancement of HIV-1 replication and dimethyl sulfoxide increases HIV-1 replication without influencing T-cell survival. *Arch. Pathol.Lab. Med.* 124 :240-245.

Takada, S., Kaneniwa, N., Tsuchida, N. & Koike, K. (1997). Cytoplasmic retention of the p53 tumor suppressor gene product is observed in the hepatitis B virus X gene-transfected cells. *Oncogene.* 15 :1895-1901.

Talanian, R.V., Quinlan, C., Trautz, S., Hackett, M.C., Mankovich, J.A., Banach, D., Ghayur, T., Brady, K.D. & Wong, W.W. (1997). Substrate specificities of caspase family proteases. *J. Biol. Chem.* 272 :9677-9682.

Tang, D., Lahti, J.M., Grenet, J. & Kidd, V.J. (1999). Cycloheximide-induced T-cell death is mediated by a Fas-associated death domain-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 274 :7245-7252.

Teodoro, J.G. & Branton, P.E. (1997). Regulation of p53-dependent apoptosis, transcriptional repression and cell transformation by phosphorylation of the 55-kilodalton E1B protein of human adenovirus type 5. *J. Virol.* 71 :3620-3627.

Tewari, M. & Dixit, V.M. (1995). Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J. Biol. Chem.* 270 :3255-3260.

Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S. & Dixit, V.M. (1995). Yama/ CPP32b, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *Cell* 81 :801-809.

Thatte, U., Bagadey, S. & Dahanukar, S. (2000). Modulation of programmed cell death by medicinal plants. *Cell. Mol. Biol.* 46 :199-214.

Theerasurakarn, S. & Ubol, S. (1998). Apoptosis induction in brain during the fixed strain of rabies virus infection correlates with the onset and severity of illness. *J. Neurovirol.* 4 :407-414.

Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267 :1456-1462.

Thornberry, N.A., Chapman, K.T. & Nicholson, D.W. (2000). Determination of caspase specificities using a peptide combinatorial library. *Methods Enzymol.* 322 :100-110.

Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., Chapman, K.T. & Nicholson, D.W. (1997b). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272 :17907-17911.

Thornberry, N.A., Rosen, A. & Nicholson, D.W. (1997a). Control of apoptosis by proteases. *Adv. Pharmacol.* 41 :155-177.

Thoulouze, M.I., Lafage, M., Montano-Hirose, J.A. & Lafon, M. (1997). Rabies virus infects mouse and human lymphocytes and induces apoptosis. *J. Virol.* 71 :7372-7380.

Tiley, L.S., Brown, P.H., Sy, L., Maizel, J.V., Clements, J.E. & Cullen, B.R. (1990). Visna virus encodes a post transcriptional regulator of viral structural gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87 :7497-7501.

Tollefson, A.E., Hermiston, T.W., Lichtenstein, D.L., Colle, C.F., Tripp, R.A., Dimitrov, T., Toth, K., Welles, C.E., Doherty, P.C. & Wold, W.S. (1998). Forced degradation of Fas inhibits apoptosis in adenovirus-infected cells. *Nature* 392 :726-730.

Tsujimoto, Y. & Croce, C.M. (1986). Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 226 :1097-1099.

U

Ubol, S., Sukwattanapan, C. & Utaisincharoen, P. (1998). Rabies virus replication induces Bax-related, caspase dependent apoptosis in mouse neuroblastoma cells. *Virus Res.* 56 :207-215.

V

Vellutini, C., Philippon, V., Gambarelli, D., Horschowski, N., Armin-Nave, K., Navarro, J.M., Auphan, M., Courcoul, M.A. & Filippi, P. (1994). The maedi-visna virus Tat protein induces multiorgan lymphoid hyperplasia in transgenic mice. *J. Virol.* 68 :4955-4962.

Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J. & Vaux, D.L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102 :43-53.

Vinatier, D., Orazi, G., Cosson M. & Dufour, P. (2001). Theories of endometriosis. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 96 :21-34.

W

Wang, C.Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V. & Baldwin, A.S.Jr. (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281 :1680-1683.

Wang, S.H., Koenig, R.J., Giordano, T.J., Myc, A., Thompson, N.W. & Baker, J.R. Jr. (1999). 1Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 up-regulates Bcl-2 expression and protects normal human thyrocytes from programmed cell death. *Endocrinology*. 140 :1649-1656.

Wang, Z.-Q., Sting, L., Morrison, C., Jantsch, M., Los, M., Schulze-Osthoff, K. & Wagner, E.F. (1997). PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes Dev.* 11 :2347-2358.

Wang., G.H., Bertin, J., Wang, Y., Martin, D.A., Wang, J., Tomaselli, K.J., Armstrong, R.C. & Cohen, J.I. (1997). Bovine herpes virus 4 BORFE2 protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor receptor 1-induced apoptosis and contains death effector domains shared with other gamma-2 herpesviruses. *J. Virol.* 71 :8928-8932.

Ware, R.E., Nishimura, J., Moody, M.A., Smith, C., Rosse, W.F. & Howard, T.A. (1998). The PIG-A mutation and absence of glycosylphosphatidylinositol-linked proteins do not confer resistance to apoptosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 92 :2541-2550.

Weiland, F. & Bruns, M. (1980). Ultrastructural studies on maedi-visna virus. *Arch. Virol.* 64 :277-285.

Westendorp, M.O., Frank, R., Ochsenbauer, C., Stricker, K., Dein, J., Walczak, H., Debatin, K.M. & Krammer, P.H. (1995). Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* 375 :497-500.

Westendorp, M.O., Shatrov, V.A., Schulze-Osthoff, K.R.F., Kraft, M., Los, M., Krammer, P.H., Dröge, W. & Lehmann, V. (1995). HIV-1 Tat potentiates TNF-induced NF-κB activation and cytotoxicity by altering the cellular redox state. *EMBO J.* 14 :546-554.

Wu, Y.C. & Horvitz, H.R. (1998). The *C. elegans* cell corpse engulfment gene *ced-7* encodes a protein similar to ABC transporters. *Cell* 93 :951-960.

Wyllie, A.H. & Golstein, P. (2001). More than one way to go. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98 :11-13.

Wyllie, A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284 :555-556.

X

Xiang, J., Chao, D.T. & Korsmeyer, S.J. (1996). BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93 :14559-14563.

Xu, X., Nash, P. & McFadden, G. (2000). Myxoma virus expresses a TNF receptor homolog with two distinct functions. *Virus Genes* 21 :97-109.

Y

Yu, S.P., Yeh, C.-H., Sebsi, S.L., Gwag, B.J., Canzoniero, L.M.T., Farhangrazi, Z.S., Ying, H.S., Tian, M., Dugan, L.L. & Choi, D.W. (1997). Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science* 278 :114-117.

Z

Zamzami, N. & Kroemer, G. (1999). Condensed matter in cell death. *Nature* 401 :127-128.

Zauli, G., Gibellini, D., Secchiero, P., Dutartre, H., Olive, D., Capitani, S. & Collette, Y. (1999). Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein sensitizes CD4(+) T lymphoid cells to apoptosis via functional upregulation of the CD95/CD95 ligand pathway. *Blood*. 93 :1000-1010.

Zha, H., Aime-Sempe, C., Sato, T. & Reed, J.C. (1996). Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J. Biol. Chem.* 271 : 7440-7444.

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. & Korsmeyer, S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87 :619-628.

Zhivotovsky, B., Samali, A., Gahm, A. & Orrenius, S. (1999). Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ.* 6 :644-651.

Zhou, Q., Snipas, S., Orth, K., Muzio, M., Dixit, V.M. & Salvesen, G.S. (1997). Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J. Biol. Chem.* 272 :7797-7800.

Zhu, N., Khoshnan, A., Schneider, R., Matsumoto, M., Dennert, G., Ware, C. & Lai, M.M. (1998). Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J. Virol.* 72 :3691-3697.

Zinck, M.C. & Johnson, L.K. (1994). Pathology of lentivirus infections in sheep and goats. *Vir. Res.* 32 :139-154.

Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R.T., Remotti, H., Stevens, J.L. & Ron, D. (1998). CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 12 :982-995.

Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. & Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90 :405-413.

Zou, H., Li, Y., Liu, X. & Wang, X. (1999). An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 274 :11549-11556.

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE	1
ABREVIATIONS	5
INTRODUCTION.....	15
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	19
CHAPITRE I : L' APOPTOSE	20
I. Les différents types de mort cellulaire	20
II. Importance du processus apoptotique	21
III. Les modifications cellulaires caractéristiques induites par l'apoptose.....	25
III.1. Les modifications du cytoplasme	25
III.2. Les modifications au niveau des organites intracellulaires	25
III.3. Les modifications nucléaires	26
III.4. Les modifications de la membrane plasmique	27
IV. Mécanismes de l'apoptose.....	29
IV.1. La phase d'initiation.....	30
IV.1.1. Les récepteurs de mort cellulaire	30
IV.1.2. Les ligands des récepteurs de mort	33
IV.1.3. Induction de l'apoptose par les récepteurs de mort ou voie extrinsèque	33
IV.1.4. Induction de l'apoptose par la mitochondrie ou voie intrinsèque.....	37
IV.2. Phase de régulation	40
IV.2.1. L'apoptose : un processus génétiquement contrôlé	40
IV.2.2. Les membres de la famille Bcl-2	42
IV.2.3. Régulation de la mitochondrie	45
IV.3. Phase d'exécution	47
IV.3.1. Nomenclature et structure	47
IV.3.2. Activation et régulation	49
IV.3.3. Substrats des caspases.....	51
IV.3.4. Inhibiteurs des caspases	52
IV.4. Apoptose caspase indépendante.....	55

CHAPITRE II : VIRUS ET APOPTOSE.....	56
I. Stratégies virales de régulation de la voie des récepteurs de mort.....	58
I.1. Inhibition de la voie des récepteurs de mort.....	58
I.2. Induction de la voie des récepteurs de mort.....	60
II. Les molécules virales homologues de la protéine anti-apoptotique Bcl-2	62
III. Les inhibiteurs viraux des caspases	64
IV. Stratégies virales de régulation du cycle cellulaire	66
IV.1. Inhibition de l'apoptose dépendante du cycle cellulaire.....	66
IV.2. Induction de l'apoptose dépendante du cycle cellulaire	68
V. Stratégies virales de modulation du « système IFN ».....	69
VI. Stratégies virales sur le contrôle du réticulum endoplasmique	70
VII. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).....	72
VII.1. Les protéines du VIH autres que gp120 qui ont des effets pro-apoptotiques.....	73
 CHAPITRE III : LE VIRUS VISNA-MAEDI.....	 76
I. Historique.....	76
II. Structure et génome du Visna-Maedi	78
II.1. Le génome	80
II.2. Protéines et enzymes virales.....	82
II.2.1. Protéines virales	82
II.2.2. Enzymes virales.....	84
III. Tropisme cellulaire et cycle de réplication.....	86
IV. La maladie	87
 PARTIE EXPERIMENTALE.....	 90
 MATERIELS ET METHODES	 91
I. Culture cellulaire	92
II. Le virus Visna et son titrage	93
III. Induction de l'apoptose sur les cellules de PC.....	96
III.1. Réactifs :	96

III.2. Nature des différents stress :	96
III.3. Mode opératoire :	96
IV. Analyse des modifications nucléaires apoptotiques	97
IV.1. Marquage nucléaire par le DAPI :	97
IV.1.1. Réactifs :	97
IV.1.2 Mode opératoire :	97
IV.2. Technique TUNEL	97
IV.2.1 Réactifs :	97
IV.2.2 Mode opératoire :	98
IV.3. Technique de double marquage DAPI/TUNEL	99
IV.3.1. Réactifs :	99
IV.3.2 Mode opératoire :	99
IV.4. Migration électrophorétique sur gel d'agarose	100
IV.4.1. Réactifs :	100
IV.4.2. Mode opératoire :	101
V. Dosage de l'activité Lactate Déshydrogénase (LDH)	102
V.1. Réactifs :	102
V.2. Mode opératoire :	102
VI. Etude du clivage de la PARP	104
VI.1 Réactifs :	104
VI.2 Mode opératoire :	104
VII. Etude de la libération du cytochrome c	105
VII.1. Réactifs :	105
VII.2. Mode opératoire :	106
VIII. Marquage du relargage de l'AIF	106
VIII.1. Réactifs :	106
VIII.2. Mode opératoire :	106
IX. Etude de la translocation de la phosphatidylsérine	107
IX.1. Réactifs :	107
IX.2. Mode opératoire :	107
X. Dosage des activités caspases	108
X.1. Réactifs :	108
X.2. Mode opératoire :	109
X.2.1. Calibrage du spectrophotomètre	109

X.2.2. Dosage des protéines selon la méthode de Bradford	109
X.2.3. Etalonnage du spectrofluorimètre.....	110
X.2.4. Préparation des échantillons pour le dosage des activités enzymatiques ...	111
XI. Effets des inhibiteurs synthétiques de caspases sur l'activation des caspases au cours de l'apoptose Visna induite	113
XI.1. Réactifs :	113
XI.2. Mode opératoire :	113
XII. Effets des inhibiteurs irréversibles de caspases sur l'ECP Visna induit.....	114
XII.1. Réactifs :	114
XI.2. Mode opératoire :	114
XIII. Marquage in situ avec le FITC-VAD-FMK	115
XIII.1. Réactifs :	115
XIII.2. Mode opératoire :	115
XIV. Technique de double marquage DAPI/ FITC-VAD-FMK.....	115
XIV.1. Réactifs :	115
XIV.2. Mode opératoire :	116
XV. Tests statistiques	116
 RESULTATS	 117
 I. Recherche d'un témoin positif d'apoptose.....	 118
II. Modifications morphologiques observées au cours de l'infection par le virus Visna	121
II.1. Condensation et fragmentation cytoplasmique.....	121
II.2. Fragmentation chromatinienne	124
II.3. Technique de double marquage DAPI/TUNEL	126
II.4. Electrophorèse d'ADN	126
III. Etude de l'intégrité membranaire des cellules PC infectées.....	129
IV. Recherche de la translocation de la phosphatidylsérine.....	129
V. Clivage de la PARP	131
VI. Mise en évidence de l'activation des caspases apoptotiques	131
VI.1. Calibrage du spectrophotomètre : obtention de la droite étalon pour le dosage de Bradford	131
VI.2. Etalonnage du spectrofluorimètre	133
VI.3. Dosage des activités caspase-3 et caspase-1	136

VII. Mise en évidence des différentes voies de transduction du signal induites	139
VII.1. Voies dépendantes des caspases : la voie de la mitochondrie	139
VII.1.1. Etude de la libération du cytochrome c :	139
VII.1.2. Dosage de l'activité caspase-9 :	141
VII.2. Voies dépendantes des caspases : la voie des récepteurs	141
VII.2.1. Dosage de l'activité caspase-8	141
VII.3. Voie indépendante des caspases : la voie de l'AIF	144
VIII. Implication des caspases au cours de l'infection par le virus Visna.....	146
VIII.1. Le z-DEVD-FMK et le z-VAD-FMK inhibent les activités caspases	146
VIII.2. Le z-DEVD-FMK et le z-VAD-FMK retardent l'ECP induit par le virus Visna sur les cellules de PC infectées	147
VIII.3. Le z-DEVD-FMK et le z-VAD-FMK diminuent le nombre de particules virales libérées au cours de l'infection par le Visna	156
VIII.4. Marquage in situ des activités caspases	158
 DISCUSSION	 160
 CONCLUSION	 175
 BIBLIOGRAPHIE	 179
 TABLE DES MATIERES	 214
 TABLE DES FIGURES	 220
 ANNEXES	 223
Annexe 1	224
Annexe 2	225

TABLE DES FIGURES

Tableau 1 : Exemples de situations pathologiques où l'apoptose est impliquée.	22
Tableau 2 : Comparaison Apoptose / Nécrose.	24
Figure 1 : L'apoptose un processus en trois phases.	28
Figure 2 : Les voies extrinsèque et intrinsèque.	32
Figure 3 : Activation des Récepteurs TNF-R et Fas.	34
Figure 4 : Comparaison entre les systèmes CD95/CD95L (Fas/FasL) et GranzymeB/Perforine.	36
Figure 5 : Formation de l'apoptosome.	38
Figure 6 : Les membres de la famille Bcl-2.	41
Tableau 3 : Famille des Caspases.	44
Figure 7 : Structure et activation des caspases.	46
Figure 8 : Les différents mécanismes d'activation des caspases	48
Figure 9 : Les différents types de clivage par les caspases effectrices sur les substrats.	50
Tableau 4.1 : Virus ADN inhibant l'apoptose.	57
Tableau 4.2 : Virus ADN inhibant l'apoptose (suite et fin).	59
Tableau 4.3 : Virus ARN inhibant l'apoptose.	61
Tableau 5.1 : Virus ADN activant l'apoptose.	63
Tableau 5.2 : Virus ARN activant l'apoptose.	65
Tableau 5.3 : Virus ARN activant l'apoptose (suite et fin).	67
Tableau 6 : Le genre Lentivirus.	77
Figure 10 : Organisation génomique de quelques Lentivirus	79
Tableau 7 : Produits des gènes du Visna-Maedi.	81
Figure 11 : Cycle de réplication des Lentivirus.	85
Figure 12 : Spectres d'Absorbance et d'Emission de la 7-amino-4-methylcoumarine.	110
Tableau 8 : Obtention des standards d'AMC.	111
Tableau 9 : Distribution des réactifs pour le dosage des activités caspases.	112
Tableau 10 : Molécules apoptogènes testées sur les cellules PC.	119
Figure 13 : Marquage nucléaire par le DAPI.	120
Tableau 11 : Evolution de l'apoptose et du titre viral au cours de l'infection.	122
Figure 14 : Marquage nucléaire par le DAPI.	123
Figure 15 : Fragmentation chromatinienne, Technique TUNEL.	125
Figure 16 : Double marquage DAPI-TUNEL.	127
Figure 17 : Fragmentation chromatinienne, migration électrophorétique sur gel d'agarose.	128

Figure 18 : Cinétique de libération de la LDH.....	130
Figure 19 : Etude du clivage de la PARP.....	132
Figure 20 : Calibrage du Spectrophotomètre	134
Figure 21 : Spectre d'absorption de l'AMC en solution dans du DMSO.....	135
Figure 22 : Calibrage du Spectrofluorimètre.....	137
Figure 23 : Dosage de l'activité Caspase-3.....	138
Figure 24 : Dosage de l'activité Caspase-1.....	140
Figure 25 : Dosage de l'activité Caspase-9.....	142
Figure 26 : Dosage de l'activité Caspase-8.....	143
Figure 27 : Etude de la libération de l'AIF.....	145
Figure 28.1 : Spectre d'inhibition du z-DEVD-FMK.....	148
Figure 28.2 : Spectre d'inhibition du z-VAD-FMK.....	149
Figure 28.3 : Spectre d'inhibition du z-YVAD-FMK.....	150
Figure 29.1 : Effet du z-DEVD-FMK ($5 \times 10^{-5} M$) sur la cinétique de libération de la LDH...152	
Figure 29.2 : Effet du z-VAD-FMK ($5 \times 10^{-5} M$) sur la cinétique de libération de la LDH....153	
Figure 29.3 : Effet du z-YVAD-FMK ($5 \times 10^{-5} M$) sur la cinétique de libération de la LDH...154	
Tableau 12 : Evolution de la cytotoxicité.....	155
Figure 30 : Effet des inhibiteurs de caspases sur le titre viral (DICC ₅₀).....	157
Figure 31 : Marquage <i>in situ</i> des activités caspases.....	159

ANNEXES

Article 1

Visna virus-induced cytopathic effect in vitro is caused by apoptosis.

R. Duval¹, S. Delebassée¹, P. J. P. Cardot² and C. Bosgiraud¹

(1) Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Pharmacie, Limoges, France, FR

(2) Laboratoire de Chimie Analytique et Bromatologie, Faculté de Pharmacie, Limoges, France, FR

Arch Virol. 2002 May;147(5):943-59

Summary : Visna-Maedi virus (VMV), an ungulate lentivirus, causes a natural infection in sheep. In vitro, VMV infection and replication lead to strong cytopathic effects with subsequent death of host cells. We investigated, in vitro, the relative contribution of apoptosis or programmed cell death (PCD) to cell killing during acute infection with VMV, by employing diverse strategies to detect its common end-stage alterations. We demonstrated that VMV-infection in sheep choroid plexus cells (SCPC), is associated with apoptosis, characterized by morphological changes such as condensation of chromatin and the appearance of apoptotic bodies. DNA fragmentation was documented by TUNEL assay. Although the mechanism by which VMV activates this cell suicide program is not known, we examined the activation of caspases, the family of death-inducing proteases that resulted in cleavage of several cellular substrates. To study the role of caspases in VMV-induced apoptosis, we focused on several protease targets: procaspase-3 and procaspase-1. During VMV-infection, SCPC display active caspase-3 and no caspase-1 activity. In conclusion, our results suggest that VMV infection, in vitro, induces cell death of SCPC by a mechanism that can be characterized by many of the properties most closely associated with apoptotic cell death.

Texte intégral : <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-001-0791-1>

Article 2

Implication of caspases during maedi-visna virus-induced apoptosis.

Duval R, Bellet V, Delebassée S, Bosgiraud C.

Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Pharmacie, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges Cedex, France.

Journal of General Virology (2002), 83, 3153–3161. Printed in Great Britain

Summary : Maedi-visna virus (MVV) causes encephalitis, pneumonia and arthritis in sheep. In vitro, MVV infection and replication lead to strong cytopathic effects characterized by syncytia formation and subsequent cellular lysis. It was demonstrated previously that MVV infection in vitro induces cell death of sheep choroid plexus cells (SCPC) by a mechanism that can be associated with apoptotic cell death. Here, the relative implication of several caspases during acute infection with MVV is investigated by employing diverse in vitro and in situ strategies. It was demonstrated using specific pairs of caspase substrates and inhibitors that, during in vitro infection of SCPC by MVV, the two major pathways of caspase activation (i.e. intrinsic and extrinsic pathways) were stimulated: significant caspase-9 and -8 activities, as well as caspase-3 activity, were detected. To study the role of caspases during MVV infection in vitro, specific, cell-permeable, caspase inhibitors were used. First, these results showed that both z-DEVD-FMK (a potent inhibitor of caspase-3-like activities) and z-VAD-FMK (a broad spectrum caspase inhibitor) inhibit caspase-9, -8 and -3 activities. Second, both irreversible caspase inhibitors, z-DEVD-FMK and z-VAD-FMK, delayed MVV-induced cellular lysis as well as virus growth. Third, during SCPC in vitro infection by MVV, cells were positively stained with FITC-VAD-FMK, a probe that specifically stains cells containing active caspases. In conclusion, these data suggest that MVV infection in vitro induces SCPC cell death by a mechanism that is strongly dependent on active caspases.

ABSTRACT: Apoptosis is a genetically controlled program of cell death. PCD can be induced by a wide variety of stimuli, among them pathogens, such as virus and bacteria, or chemical compounds, including staurosporine, used as positive control in our cellular system: primary sheep choroid plexus cells. Visna virus belongs to the Lentivirus genus of Retroviridae family and causes organ specific disease in the central nervous system, lung, joints and mammary glands. Visna virus replicates predominantly in macrophages and does not infect lymphocytes.

We have first characterised in vitro, (i) apoptotic morphological features including cell shrinkage, chromatin condensation and apoptotic body formation with DAPI, TUNEL and double staining experiments, (ii) several biochemical processes: maintenance of plasma membrane integrity, phosphatidylserine translocation, PARP cleavage and caspase activation. Finally, during in vitro infection, Visna virus triggers apoptosis in infected cells without a necrotic response: no caspase-1 activation and late LDH leakage.

Second, we identified several Visna-virus induced apoptotic pathways: caspases-dependent (extrinsic and intrinsic pathways) and caspase-independent (AIF pathway). In addition, we demonstrated that Visna-induced CPE (cellular lysis, syncytia formation and virion production) was closely related to the activation of caspases -3, -8 and -9.

This study represents the first proof of Visna virus induced apoptosis in vitro. Better knowledge of Visna induced cytopathic effects have permitted a better understanding of physiological mechanisms occurring during disease.

In conclusion, it appeared that the Visna-induced apoptotic model is quite comparable with HIV apoptotic models described.

DUVAL Raphaël. Expression des différentes voies apoptotiques induites par le rétrovirus Visna. 260 p.

RESUME : L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée, génétiquement contrôlé. Parmi les stimuli inducteurs d'apoptose, figurent certains agents pathogènes (virus, bactéries) et certains antibiotiques comme la staurosporine, sélectionnée comme témoin positif sur notre système cellulaire : les cellules primaires de plexus choroïde ovines.

Le rétrovirus **Visna** est un *Lentivirus*, responsable d'encéphalopathie démyélinisante et de pneumopathie progressive chez les ovins et les caprins. Les cibles cellulaires du Visna sont essentiellement les monocytes/macrophages.

Dans une première étape, nous avons mis en évidence *in vitro*, (i) les **modifications morphologiques** associées à l'apoptose par les techniques DAPI, TUNEL et par double marquage : condensation du cytoplasme, condensation chromatinienne, formation des corps apoptotique, (ii) les différents **marqueurs biochimiques** associés : maintien de l'intégrité membranaire, translocation des résidus phosphatidylsérines, clivage de la PARP et activation des caspases. *In vitro*, le virus Visna entraîne précocement l'entrée en apoptose des cellules infectées sans induire de phénomène nécrotique : absence d'activation de la caspase-1 et libération tardive de la LDH.

Dans une deuxième étape, nous avons identifié différentes voies de transduction du signal pro-apoptotique induites par ce virus : les voies dépendantes des caspases (voies extrinsèque et intrinsèque), ou une voie indépendante : la voie de l'AIF. L'expression de **l'effet cytopathologique** Visna-induit (lyse cellulaire, syncytia et production de particules virales) est étroitement liée à l'activation des caspases -3, -8 et -9.

Ce travail représente le premier rapport sur la caractérisation du processus de mort cellulaire induit *in vitro* par le rétrovirus Visna. Une meilleure connaissance des phénomènes cytopathologiques Visna-induits nous ont permis de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques développés dans la maladie.

En conclusion, il apparaît que le modèle d'apoptose Visna-induit est peu comparable aux modèles d'apoptose décrits avec le VIH.

MOTS – CLES : Virus Visna-Maedi, Rétrovirus, Cellules de Plexus Choroïde, Apoptose, Activation des Caspases, Transduction du signal, Inhibiteurs des Caspases.

JURY :

M. le Professeur Jean-Louis BENEYTOU (Université de Limoges)	Président
Mme le Professeur Sylviane BILLAUDEL (Université de Nantes)	Rapporteur
M. Le Professeur Ernst PETERHANS (Université de Berne)	Rapporteur
Mme le Professeur Claudine BOSGIRAUD (Université de Limoges)	Directeur
Mme Sylvie DELEBASSEE (Université de Limoges)	Codirecteur