

UNIVERSITE DE LIMOGES
ECOLE DOCTORALE Science – Technologie – Santé
FACULTE de PHARMACIE

Année : 2003

Thèse N°

Thèse
pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline / Spécialité :
Virologie, Biologie cellulaire et moléculaire, Biochimie

présentée et soutenue par

Virginie BELLET

le 27 Novembre 2003

**LES DIFFERENTES VOIES APOPTOTIQUES
INDUITES PAR LE LENTIVIRUS VISNA.
INHIBITION PAR L'AZT ET
CORRELATION AVEC L'APOPTOSE, *IN VITRO***

Thèse dirigée par Mme le Pr. C. BOSGIRAUD et S. DELEBASSEE

JURY :

Mme le Pr. Michèle SIMEON DE BUOCHBERG (Université de Montpellier)	Président
Mr le Pr. Emmanuel DROUET (Université de Grenoble)	Rapporteur
Mr le Pr. Jacques HUGON (Université de Poitiers)	Rapporteur
Mme Sylvie ROGEZ (PH CHRU Limoges)	Examineur
Mme le Pr. Claudine BOSGIRAUD (Université de Limoges)	Directeur
Mme Sylvie DELEBASSEE (Université de Limoges)	Co-directeur

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTÉ DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE :	Monsieur le Professeur HABRIOUX Gérard
	Madame le Professeur CHULIA Dominique
ASSESSEURS :	Monsieur COMBY Francis, Maître de Conférences
PROFESSEURS :	
BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
BOSGIRAUD Claudine	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE-PARASITOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
	CHIMIE ORGANIQUE
BUXERAUD Jacques	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
SECRETARE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS	
Madame ROCHE Doriane	

A mes parents,

Papi et mamie

Et surtout à Pierre,

Remerciements

A Madame le professeur BOSGIRAUD

Professeur des Universités de Bactériologie-Virologie

Faculté de Pharmacie, Université de Limoges

Directeur de Thèse

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire. Vous êtes à l'origine de ces travaux que vous avez dirigés avec une grande rigueur scientifique. Je vous remercie pour vos conseils et votre soutien. Soyez assurée de toute mon estime et de mon profond respect.

A Madame Sylvie DELEBASSEE

Maître de Conférences des Universités de Bactériologie-Virologie

Faculté de Pharmacie, Université de Limoges

Co-directeur de Thèse

Vous avez suivi ce travail pas à pas. Vous m'avez toujours soutenu et bien conseillé lors des moments de doutes mais aussi quelquefois freiné quand je souhaitais aller un peu trop vite. Soyez assuré de ma gratitude et de mon amitié.

A Monsieur le professeur HUGON

Professeur des Universités de Biologie cellulaire

Faculté de Médecine, Université de Poitiers

Je suis particulièrement touchée de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail et d'en être le rapporteur. 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 Monsieur le professeur DROUET

Professeur des Universités de Bactériologie-Virologie

Faculté de Pharmacie, Université Joseph Fourier- Grenoble I

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

A Madame le professeur Siméon de Buochberg

Professeur des Universités de Bactériologie-Virologie

Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier

Je suis particulièrement honorée de votre présence dans ce jury et je vous en remercie.

A Madame le professeur Sylvie Rogez

Praticien Hospitalier, CHRU Limoges

Je suis très touchée de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail. Je vous remercie pour vos conseils et vos suggestions qui ont permis l'amélioration de ce manuscrit.

Je tiens à remercier l'AFSSA de Niort et plus particulièrement le **Dr. Stephen Valas** pour nous avoir permis de travailler sur un nouveau modèle cellulaire (les cellules de GSMt-*lac*), mais aussi pour sa disponibilité et ses précieux conseils.

Je tiens à remercier tous les membres de l'Institut de Pathologie Comparée et Expérimentale (IPCE) pour leur aide financière.

A tous les membres du laboratoire de Microbiologie-Parasitologie,

Roselyne (merci pour votre écoute, votre bonne humeur, vous êtes le rayon de soleil de ce laboratoire), Jeanne (merci pour votre disponibilité, votre dévouement et votre gentillesse), Monsieur le professeur Dreyfuss (je vous remercie de m'avoir donné ma chance en tant qu'ATER, merci de votre confiance), Mouna, Philippe et Bienvenue (pour leur soutien et conseils).

A ma famille,

A mes parents,

Que dire.... Je vous remercie pour votre aide, votre soutien, vos conseils toujours avisés, votre reconnaissance et surtout votre amour. Je ne vous serai jamais assez reconnaissante de tous les sacrifices que vous avez du faire.

A papi et mamie,

Je n'aurai jamais souhaité meilleurs grands-parents que vous. Vous êtes curieux, ouverts et absolument formidables, vous m'avez toujours soutenu et encouragé. Aujourd'hui, c'est moi qui vous le dis : je suis très fière de vous. Un clin d'oeil particulier à mon rastaquouère, avec tout mon amour. Ton sale caractère nous manque déjà beaucoup.

A Pierre,

Merci pour ta patience, tes encouragements, tes conseils (personnels comme professionnels). Toujours présent dans les moments les plus difficiles, j'espère que je saurai en faire autant dans peu de temps. Trouve ici la preuve de tout mon amour.

A Monique, Jean-pierre, Jérôme et Sylvie,

Merci pour votre soutien sans faille et vos encouragements. Je vous adore...

A tous mes amis,

Nathalie, Stéphanie, Jean-Michel et Sébastien,

Fabrice, Laure et Laurence,

Aux petits bouts de choux Juliette, Camille et à celui ou celle qui va arriver bientôt....

Vous n'avez pas toujours bien compris mon manque de disponibilité et je vous en excuse. Sachez que je vais faire des efforts, c'est promis. On fête cette année nos dix ans, un peu plus pour certains...Sachez que je vous adore et que je vais sûrement vous garder.

A mon « chauffeur » et ami Titi. Heureusement que tu étais là... Merci pour ta patience face au caractère des Bellet.

Isa (on ne s'oubliera pas comme ça), Cécile (une formidable partenaire de travail mais aussi une amie), Raph (mon mari de labo, merci pour ton soutien et tes conseils), Yves (surtout, reste comme tu es), David (la nouvelle recrue, bonne chance), Bertrand (merci pour ta disponibilité et tes nombreux conseils) et stef (j'apprécie toujours de t'avoir à ma table).

En témoignage de toute mon affection.

A tous ceux que j'oublie sûrement.

SOMMAIRE

Remerciements	4
ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION	18
<i>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</i>	21
1. UN MODELE DE LENTIVIRUS : LE VIRUS MAEDI-VISNA (VMV)	22
1.1. Les lentivirus dans la taxonomie des <i>Retroviridae</i>	22
1.2. Structure des particules lentivirales	23
1.3. Organisation génomique du virus Maedi-Visna (Pépin <i>et al.</i> , 1998)	23
1.4. Les protéines virales du VMV et leur rôle	25
1.5. Les récepteurs et cibles cellulaires du VMV	30
1.6. Le cycle lentiviral (figure 3).....	32
1.7. Les pathologies associées au VMV et aux lentivirus (tableau 1)	34
2. L'APOPTOSE	38
2.1. Rôle physiologique	39
2.2. Apoptose et pathologies	40
2.3. Les mécanismes généraux de l'apoptose	41
2.4. La protéine suppresseur de tumeur p53 et l'apoptose	65
2.5. Implication du réticulum endoplasmique dans l'apoptose	72
2.6. Lentivirus et apoptose	73
3. LES INHIBITEURS POTENTIELS DE L'APOPTOSE VIRO-INDUITE	84
3.1. Les antirétroviraux	84
3.2. Les protéines virales inhibitrices de l'apoptose (figure 24)	94
3.3. Les cytokines et l'apoptose (David & Théze, 2000)	99
3.4. Les inhibiteurs de synthèse des caspases	100
<i>OBJECTIFS</i>	101
<i>MATERIEL ET METHODES</i>	103
1. SOUCHE VIRALE VISNA K1514	104
1.1. Obtention d'un pool viral	104
1.2. Titrage du pool viral.....	104
2. CULTURES CELLULAIRES	106
2.1. Les cellules primaires ovines de Plexus choroïde (PC)	106
2.2. Les cellules caprines de GSMt- <i>lac</i>	107
2.3. Témoin positif d'apoptose : traitement des cellules par la staurosporine	109
3. ACTION D'ANTIRÉTROVIRAUX SUR LE VIRUS VISNA	110
3.1. Les différents antiviraux testés.....	110
3.2. Recherche de la cytotoxicité des antirétroviraux	111
4. ANALYSE DES MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES NUCLEAIRES CARACTÉRISTIQUES DE L'APOPTOSE	113
4.1. Marquage par le DAPI	113
4.2. Analyse de la fragmentation de l'ADN génomique	113
4.3. Mise en évidence de la présence d'une population sub-G1 par cytométrie de flux	114
5. ETUDE DU POTENTIEL TRANSMEMBRANAIRE MITOCHONDRIAL ($\Delta\Psi$M)	115
5.1. Analyse du potentiel transmembranaire mitochondrial par double marquage	115

5.2. Mode opératoire	115
6. ETUDE DE L'EXPRESSION DES ARNm PAR RÉVERSE TRANSCRIPTION SUIVIE D'UNE RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (RT-PCR)	117
6.1. Extraction des ARN totaux	117
6.2. RT-PCR	118
7. ANALYSE DES PROTÉINES CELLULAIRES PAR WESTERN-BLOT	120
7.1. Extraction des protéines	120
7.2. Western-blot	121
8. EXPRESSION DES PROTÉINES CELLULAIRES PAR IMMUNOCYTOCHIMIE	126
9. ACTIVITÉS CASPASES	129
9.1. Dosage des activités caspases	129
9.2. Marquage <i>in situ</i> par le FITC-VAD-FMK	131
10. DOSAGE DE L'ACTIVITÉ LDH (LACTATE DÉSHYDROGÉNASE)	132
10.1. Principe	132
10.2. Mode opératoire	132
10.3. Calcul du pourcentage de cytotoxicité	133
RESULTATS	134
1. MISE EN ÉVIDENCE DE L'ECP INDUIT PAR LE VIRUS VISNA, <i>IN VITRO</i>	135
2. LES VOIES IMPLIQUÉES DANS L'APOPTOSE VISNA-INDUITE	136
2.1. Mise en évidence de l'expression de l'ARNm de gènes pro- ou anti-apoptotiques	136
2.2. La voie intrinsèque mitochondriale est activée au cours de l'apoptose Visna-induite	139
2.3. Implication des caspases dans l'apoptose Visna-induite	159
2.4. Etude de la fragmentation de la chromatine	161
3. EFFET D'ANTIRÉTROVIRAUX SUR L'APOPTOSE VISNA-INDUITE	164
3.1. Effet d'un INTI : l'AZT	164
3.2. Effet des autres antirétroviraux	181
4. UTILISATION D'UN NOUVEAU MODÈLE CELLULAIRE : LES CELLULES DE GSMt-lac	183
4.1. Infection des cellules de GSMt-lac par le virus Visna	183
4.2. Mise en évidence des principales caractéristiques apoptotiques	185
4.3. Relation entre apoptose et infection	192
DISCUSSION	198
CONCLUSION	216
BIBLIOGRAPHIE	219
TABLE DES MATIÈRES	244
LISTE DES FIGURES	248
LISTE DES TABLEAUX	251

ABREVIATIONS

A

A-1 : ou Bcl 2a1

ACAD : Activated T-cell Autonomous Death

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFC : 7-amino-4-trifluoromethylcoumarin

AICD : Activation-Induced Cell death

AIF : Apoptosis Inducing Factor

ALV : Avian leukosis virus

AMC : 7-amino-4-méthyl coumarine

ANT : Adenine Nucleotide Translocator

AP-1 : Activator Protein-1

AP-4 : Activator Protein-4

APAF-1 : Apoptosis Protein Associated Factor

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ASK : Apoptosis Signal-regulating Kinase

ATP : Adénosine triphosphate

ATPase : ATP synthase

ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation

AZT : 3' azido-2',3'-deoxythymidine

AZT-DP : AZT diphosphate

AZT-MP : AZT monophosphate

AZT-TP : AZT triphosphate

B

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

Bak : Bcl-2 homologous antagonist/killer

BALF-1 : a second Bcl-2 homologue encoded by EBV

Bax : Bcl-2 associated X protein

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

Bcl-X_L : longer alternatively splice form of Bcl-2 homolog X protein from avian lymphocyte development

BH : Bcl-homology

BHRF-1 : BamH1 fragment H rightward Reading Frame 1

BHV4 : Bovine herpes Virus 4

Bid : BH3 interacting death domain agonist

Bik : Bcl-2 Interacting Killer

Bim : Bcl-2 interacting mediator of cell death

BIR : Baculovirus IAP Repeat

BIV : Bovine Immunodeficiency Virus

BL : Lymphome de Burkitt

BLV : Bovine leukaemia virus

Bmf : a BH3 only protein

C

CA : protéine de la capsid

CAD : Caspase Activated Dnase (ou DFF40)

CARD : Caspase Recruitment Domain

CAEV : caprine Arthritis Encephalitis Virus

Calpain : Cytosolic Calcium-activated neutral cysteine endopeptidase

Caspase : cystéine aspartate protéase ou cysteinyl aspartate-specific proteinase

CCR-5 : CC-Chemokine Receptor 5

CD4 : « Cluster of Differentiation-4 »

CDK : Cyclin Dependent Kinase

CED : *Caenorhabditis elegans* death genes

CFV : Chimpanzee foamy virus

-CHO : groupement aldéhyde

CHOP : C/EBP homologous protein

CKI : Cyclin Kinase Inhibitor

CMF : cytométrie en flux

CMV : human cytomegalovirus

cPLA2 : phospholipase A2

Crma : Cytokine Response Modifier A
CXCR-4 : CXC-Chemokine Receptor 4
Cyp D : Cyclophiline D
Cyt-c : Cytochrome c

D

DAPI : 4'-6 diamidino-2-phénylindole
 $\Delta\Psi$: gradient électrochimique
 $\Delta\Psi_m$: potentiel mitochondrial transmembranaire
DCI : Dénomination commune internationale
DED : Death Effector Domain
DFF 40 : DNA Fragmentation Factor 40 (ou CAD)
DFF 45 : DNA Fragmentation Factor 45 (ou iCAD)
DIABLO : Direct Binding Protein with Low pI
DISC : Death-Inducing Signalling Complex
DOCs : Downstream of CHOP
DR : Death Receptor
DR3 L : Death Receptor 3 Ligand
DTT : Dithiothreitol
dTTP : thymidine triphosphate

E

E2F : Facteur de transcription de la protéine RB
EBNA : Epstein Barr virus-encoded Nuclear Antigen
EBV : Epstein Barr Virus
ECP : effet cytopathologique
EHV2 : Equine Herpès Virus 2
EIAV : Equine Infectious Anemia Virus
Endo G : Endonucléase G
Env : "enveloppe", enveloppe virale

F

FADD : Fas Associated Death Domain protein
Fas : Fibroblast associated (récepteur)
Fas L: Fas Ligand (ou CD95L)
FIV : Feline Immunodeficiency Virus
FLICE : FADD-like-IL-1 β -converting enzyme
FLIPs : FLICE-inhibitory proteins
-FMK : Groupement « FluoroMethylKetone »

G

GADD 45 : Growth arrest and DNA damage-inducible genes
GADD153 : Growth arrest and DNA damage-inducible genes ou CHOP
Gag : "group-specific antigen"
GAG : chondroïtin sulfate glycosaminoglycan
GSM : Goat synovial membrane
gp : glycoprotéine

H

HHV-8 : Human Herpès Virus Type 8
HIV : Human Immunodeficiency Virus
HIV-1 : HIV type 1
HIV-2 : HIV type 2
HK : Hexokinase
HPV : Human papillomavirus
Hsp 70 : Heat Shock Protein
HTLV : Human T-lymphotropic virus
HtrA2 : High temperature requirement protein A2

I

IAP : inhibitor of apoptosis
iCAD : Inhibitor of CAD (ou DFF45)

ICE : interleukin-1 β converting enzyme

IRE1 : type I transmembrane endonuclease localized in the RE

IFN α : interféron alpha

INNTI : inhibiteurs non nucleosidiques de la transcriptase inverse

INTI : inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse

IL : Interleukine

IP : inhibiteur de protéase

IP : Iodure de Propidium

J

JUNK : Jun Kinase

K

Kb : Kilo base

Kda : Kilo dalton

Kpb : Kilo paire de base

KSHV : Kaposi Sarcome Herpès Virus

L

LANA : Latency-Associated Nuclear Antigen

LDH : Lactate Déshydrogénase

LMP-1 : Latent Membrane Protein-1

LTR : Long Terminal Repeat

M

MA : protéine de la matrice

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

MCV : *molluscum contagiosum* virus

MDM2 : Murine Double Minute 2 protein

MGG : May-Grünwald-Giemsa

HC : Major Histocompatibility Complex

ME : Membrane Externe mitochondriale
MI : Membrane Interne mitochondriale
MLV : Murine leukemia virus
MMTV : Mouse mammary tumor virus
MOI : multiplicity of infection (ou multiplicité d'infection)
MTOR : Mammalian Target of Rapamycin
MTT : 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide

N

NAD : Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADH : nicotinamide-adenine dinucleotide (réduit)
Nef : negative regulatory factor
NES : Nuclear Export Signal
NF- κ B : nuclear factor B
NK : Natural Killer
NLS : Nuclear Localization Signal
Noxa : a BH3-only member of the Bcl-2 family
NP : Nucléoprotéine

O

Omi : ou HtrA2
ORF : « Open Reading Frame »

P

PAF : paraformaldéhyde
PAR-4 : prostate-apoptosis-response-gene 4
PARP : poly(ADP-ribose) polymerase
PBLs : peripheral blood lymphoma
PBMC : peripheral blood mononuclear cell
PBS : Phosphate buffer saline
PC : plexus choroïde

PCR : "polymerase chain reaction" ou réaction de polymérisation en chaîne

PEL : primary effusion lymphoma

PMNL : polymorphonuclear leukocytes

Pol : polymerase

Pr^{gag-pol} : Précurseur gag-pol

Pr55^{gag} : Précurseur 55 gag

Pr160^{env} : Précurseur env

PTPC : Pore Transition Permeability Complex

PUMA : p53 upregulated modulator of apoptosis

R

Rb : rétinoblastome

RE : Réticulum Endoplasmique

Rev : regulation of expression of viral proteins

RID : receptor internalization degradation

RNase : Ribonucléase H

ROS : Reactive Oxygen Species

Rpm : rotation par minute

RRE : Rev-responsive element

RT-PCR : reverse transcription suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne

S

Serpins : Serine Protease Inhibitors

SIDA : syndrome de l'immunodéficience acquise

sIMPs : Soluble Intermembrane protéines

SIV : Simian Immunodeficiency Virus

Smac : Second Mitochondrial Activator of Caspases

SOD-2 : Superoxide Dismutase

SEBP : Sterol Element Binding Protein

SU : glycoprotéines virales de surface

SV40 : Simian virus 40

T

TAF : TBP associated factor

TAR : Trans-Activation Response element

Tat : Transactivator of transcription

tBid : Bid tronqué

TBP : TATA Binding Protein

TCR : T cell receptor

TF II : a multiprotein complex composed of TBP and TAFs

TGF : Transcription Growth Factor

TM : glycoprotéines virales transmembranaires

TNF : Tumor Necrosis Factor

TNF-R1 : Tumor Necrosis Factor Receptor 1

TNF-R2 : Tumor Necrosis Factor Receptor 2

TRADD : TNFR-Associated Death Domain

TRAF : TNF-Receptor-Associated Factor

TRAIL : TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand

TRAIL-R1 : TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor 1

TRAMP : ou DR3

TUNEL : Terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling

TWEAK : Weak homologue of TNF

U

UV : Ultra-Violet

V

VDAC : Voltage-dependent Anion Channel ou porine

vFLIPs : FLIPs viraux

VHB : Virus de l'hépatite B

VHC : Virus de l'hépatite C

Vif : virion infectivity factor

vMIA : viral mitochondrial inhibitor associated

VMV : virus Maedi-Visna

Vpr : viral protein r

Vpu : viral protein u

Vpx : viral protein x

W

WDSV : Walleye dermal sarcoma virus

X

X-gal : 5-Bromo-chloro-3-indolyl-b-D-galactoside

XIAP : X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

INTRODUCTION

Le concept de « maladies virales à évolution lente » est né en pathologie animale de la découverte en 1936 par Cuille & Chelle de l'inoculabilité de la tremblante du mouton, jusqu'alors considérée comme héréditaire. Dix-huit ans plus tard, en 1954, Sigurdsson soulève la notion de virus lents à propos de deux autres processus morbides affectant aussi le mouton : **les maladies Visna et Maedi**. Cette définition aboutira à une première classification des lentivirus et **au concept de "maladies à virus lents"**. Ces maladies se caractérisent **par une longue période d'incubation et par le développement progressif et régulier des signes cliniques évoluant irrémédiablement vers la mort** (Bosgiraud *et al.*, 1985). Ces vingt dernières années, ce concept a été bouleversé non seulement avec la nouvelle classification des rétrovirus, dont le virus du SIDA est le prototype du genre Lentivirus, mais également avec une meilleure connaissance de la pathogénèse des infections virales. Il a été démontré que les mécanismes physiopathologiques des maladies dégénératives, des cancers et des nombreuses infections virales interfèrent directement sur la régulation de l'homéostasie des êtres supérieurs, équilibre exemplaire entre la prolifération cellulaire et la mort cellulaire programmée. L'apoptose joue un rôle déterminant au cours des processus physiologiques tels l'embryogénèse, le développement, le fonctionnement du système immunitaire ou le contrôle des tissus hormono-dépendants.

Il est maintenant établi **que de nombreux virus** tels que le HIV, mais aussi des adénovirus ou des herpès virus comme le virus Epstein-Barr **agissent sur les mécanismes moléculaires impliqués dans les processus apoptotiques**. Bien que partiellement élucidés, **les mécanismes de régulation de l'apoptose par le HIV** sont de mieux en mieux décrits, mais ils **sont extrêmement complexes**. La destruction des lymphocytes T CD4 est **la conséquence de l'infection virale soit directe soit indirecte** puisqu'elle induit aussi la mort des cellules non infectées. Par ailleurs, le HIV a aussi développé des mécanismes de blocage de l'apoptose lui permettant de persister *in vivo*. Ce rétrovirus humain semble contrôler les mécanismes d'apoptose en échappant au système immunitaire soit en le détruisant tout en persistant à l'état latent dans les cellules à durée de vie longue, soit par mutation.

Nous avons récemment montré que le virus Visna du mouton induit un processus de mort cellulaire *in vitro* sur des cellules primaires de type fibroblastique, issues de plexus choroïde ovin (Duval *et al.*, 2002b). Ce système *in vitro*, exclut l'interférence des systèmes immunitaires et inflammatoires qui co-existent dans l'infection naturelle par le virus

Visna. Dans les fibroblastes de plexus choroïde infectés, nous avons mis en évidence les modifications morphologiques caractéristiques de l'apoptose d'une part, condensation du cytoplasme, condensation chromatinienne et formation des corps apoptotiques et d'autre part, l'apparition de différents marqueurs biochimiques associés tels que l'activation des caspases. La mort cellulaire Visna-induite se traduit au niveau moléculaire par une activation en cascade des protéases à cystéine, les caspases-3, -8 et -9, conduisant au clivage de divers substrats protéiques essentiels à la survie de la cellule et permettant ainsi l'amplification d'un signal de mort. Ces premiers travaux ont démontré que l'expression de l'effet cytopathologique Visna-induit et la production de particules virales étaient étroitement liées à l'activation des caspases.

L'instauration des thérapeutiques antirétrovirales a bouleversé favorablement le pronostic et l'évolution du SIDA. **Les associations, comportant par exemple deux analogues nucléosidiques et un inhibiteur de protéase**, ont permis une réduction profonde de la charge virale et une réaugmentation des lymphocytes T CD4, conduisant à une diminution significative de la mortalité et des infections opportunistes. Ces associations inhibent le cycle de réplication du virus au stade précoce, grâce aux inhibiteurs nucléosidiques et non nucléosidiques et au stade tardif avec les inhibiteurs de la protéase virale. Le HIV est capable de contourner les barrières que les scientifiques ont dressés devant lui. Par exemple, des patients, même sous traitement, ont des cellules infectées de façon latente c'est à dire contenant l'ADN proviral inaccessible aux médicaments facilitant une réplication continue du virus, même si elle est faible, et des résistances du virus aux différentes molécules sont aussi développées. Ainsi il serait intéressant de savoir si les antirétroviraux actuels ou à venir agissent directement sur l'apoptose viro-induite dans le but d'améliorer l'évolution de la maladie.

En ce qui concerne les maladies Visna et Maedi, il n'existe pour le moment aucun traitement spécifique de ces deux maladies. Par criblage, un certain nombre de molécules ont présenté une activité antirétrovirale sur le virus Visna (Larroutou, 1993) mais les intérêts économiques sur le traitement des infections à lentivirus animaux ne sont pas prioritaires. **Les tentatives de prophylaxie vaccinale n'ont pas abouti et la seule mesure prophylactique retenue est l'éradication des animaux destinés à l'exportation lorsqu'ils sont séropositifs en immunodiffusion ou ELISA.**

Nous présentons notre travail, tout d'abord, par une mise au point bibliographique sur le genre *Lentivirus*, puis sur les différents mécanismes apoptotiques connus en insistant sur

l'apoptose viro-induite, et enfin sur les inhibiteurs potentiels de l'apoptose et leurs mécanismes.

Dans la partie expérimentale nous décrivons grâce aux techniques de biologie cellulaire et moléculaire que nous avons mises au point les différentes voies apoptotiques Visna-induites à la fois dans les fibroblastes issus de plexus choroïde mais aussi dans des cellules caprines de membrane synoviale transfectées.

Nous avons tenté de répondre à trois questions majeures qui se sont posées lors de précédents travaux réalisés au laboratoire de microbiologie :

- ❖ les signaux apoptotiques convergent vers la mitochondrie plaque tournante du processus de mort cellulaire. La chute du potentiel mitochondrial transmembranaire suivie de la libération par la mitochondrie de facteurs pro-apoptotiques, précipitent la cellule dans la phase ultime de dégradation. **Quel est le rôle de la mitochondrie au cours de l'apoptose Visna-induite?**
- ❖ Nous avons ensuite recherché **l'action de drogues couramment utilisées en thérapie antirétrovirale** : inhibiteur de transcriptase réverse (AZT) et inhibiteur de protéase, sur le processus apoptotique Visna-induit ; le but ultime étant de **connaître les étapes du cycle rétroviral impliquées dans l'induction de l'apoptose**.
- ❖ Et enfin nous avons souhaité faire **la discrimination entre l'état apoptotique des cellules infectées et celui des cellules non infectées**, lors l'infection, *in vitro*, par le virus Visna.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1. UN MODELE DE LENTIVIRUS : LE VIRUS MAEDI-VISNA (VMV)

En 1952, les maladies Maedi et Visna sont apparues en Islande et ont été l'objet d'études épidémiologique, pathologique et virologique intenses. Les premiers travaux de Sigurdsson montrent que ces deux maladies sont dues à deux virus identiques ayant un tropisme différent, l'un pour le système nerveux, l'autre pour le poumon qui entraînent des signes cliniques au bout d'une période d'incubation très longue (Sigurdsson *et al*, 1952, 1957).

Le VMV a été le premier lentivirus identifié dans la famille des *Retroviridae* et il est apparu bien avant les virus humains HIV (Human immunodeficiency virus) et HTLV (Human T-lymphotropic virus). Il a été pendant longtemps le premier modèle d'étude des lentivirus.

1.1. Les lentivirus dans la taxonomie des *Retroviridae*

Dans la famille des *Retroviridae*, on distingue plusieurs genres au sein de deux sous-familles :

- La sous-famille des *Orthoretrovirinae* :

- ❖ Le genre *Alpharetrovirus* dont le prototype est le virus de la leucémie aviaire (ALV : Avian leukosis virus)
- ❖ Le genre *Betaretrovirus* dont le représentant majeur est le virus de la tumeur mammaire de la souris (MMTV : Mouse mammary tumor virus)
- ❖ Le genre *Gammaretrovirus* dont le représentant est le virus de la leucémie murine (MLV : Murine leukaemia virus)
- ❖ Le genre *Deltaretrovirus* représenté par le virus de la leucémie bovine (BLV : Bovine leukaemia virus) et les virus de la leucémie à cellule T humaine 1 et 2 (HTLV : Human T-lymphotropic virus)
- ❖ Le genre *Epsilonretrovirus* représenté par le virus du sarcome dermique du saumon "Walleye" (WDSV : Walleye dermal sarcoma virus)
- ❖ Le genre *Lentivirus* dont le prototype a été à l'origine le virus Maedi-Visna (VMV) du mouton, puis il a été supplanté par les virus de l'immunodéficience humaine (HIV)

- La sous-famille des *Spumaretrovirinae* :

- ❖ Le genre *Spumavirus* dont les prototypes sont le virus spumeux du chimpanzé (CFV : Chimpanzee foamy virus) et le virus spumeux humain (Human spumavirus).

Le genre *Lentivirus*, auxquels appartiennent le VMV (Visna-Maedi Virus), le CAEV (Caprine arthritis encephalitis virus), le BIV (Bovine immunodeficiency virus), Le FIV (Feline immunodeficiency virus), le SIV (Simian immunodeficiency virus), le EIAV (Equine infectious anemia virus) et le HIV (Human immunodeficiency virus), est constitué de plusieurs virus ayant une structure génétique et des mécanismes moléculaires de réplication communs mais des interactions biologiques avec leur hôte qui leurs sont propres (Blacklaws *et al.*, 1995). Les lentivirus causent une infection persistante et progressive, dont le développement est très lent. Ils provoquent des maladies à évolution lente, caractérisées par une longue période de latence aboutissant à la dégénérescence de multiples organes et à la mort (Pépin *et al.*, 1998).

1.2. Structure des particules lentivirales

Comme les rétrovirus, les VMV sont des virus globulaires enveloppés. Ils sont constitués d'un génome viral à ARN associé à une reverse transcriptase (ou transcriptase inverse) et à des nucléoprotéines contenues dans la capsid. Cette nucléocapside est entourée d'une enveloppe virale constituée de phospholipides issus de la membrane plasmique de la cellule infectée et de glycoprotéines virales de surface (SU) et transmembranaire (TM), associées de manière non covalente. Le diamètre des particules lentivirales peut varier de 80 à 140 nm. La figure 1 représente la structure d'une particule virale de VMV.

1.3. Organisation génomique du virus Maedi-Visna (Pépin *et al.*, 1998)

Le génome du virus Maedi-Visna possède l'organisation typique des lentivirus (figure 2). Il est constitué de deux molécules d'ARN simple brin de polarité (+) et comprend trois gènes de structure codant pour l'enveloppe virale (*env*, "enveloppe"), la capsid (*gag*, "group-specific antigen"), les enzymes virales (*pol*, "polymerase"), et trois gènes accessoires : *vif*, *rev* et *tat*. Le nombre et le rôle de ces gènes accessoires varient en fonction du lentivirus considéré.

L'ARN viral est encadré par deux régions terminales (U3 et U5) jouant un rôle précoce au cours de la réplication du génome. L'extrémité 5' de l'ARN viral débute par une courte séquence dite répétée (R). L'organisation générale du génome est R-U5-gag-pol-env-U3-R, avec une extrémité 3' coiffée et une extrémité 5' polyadénylée.

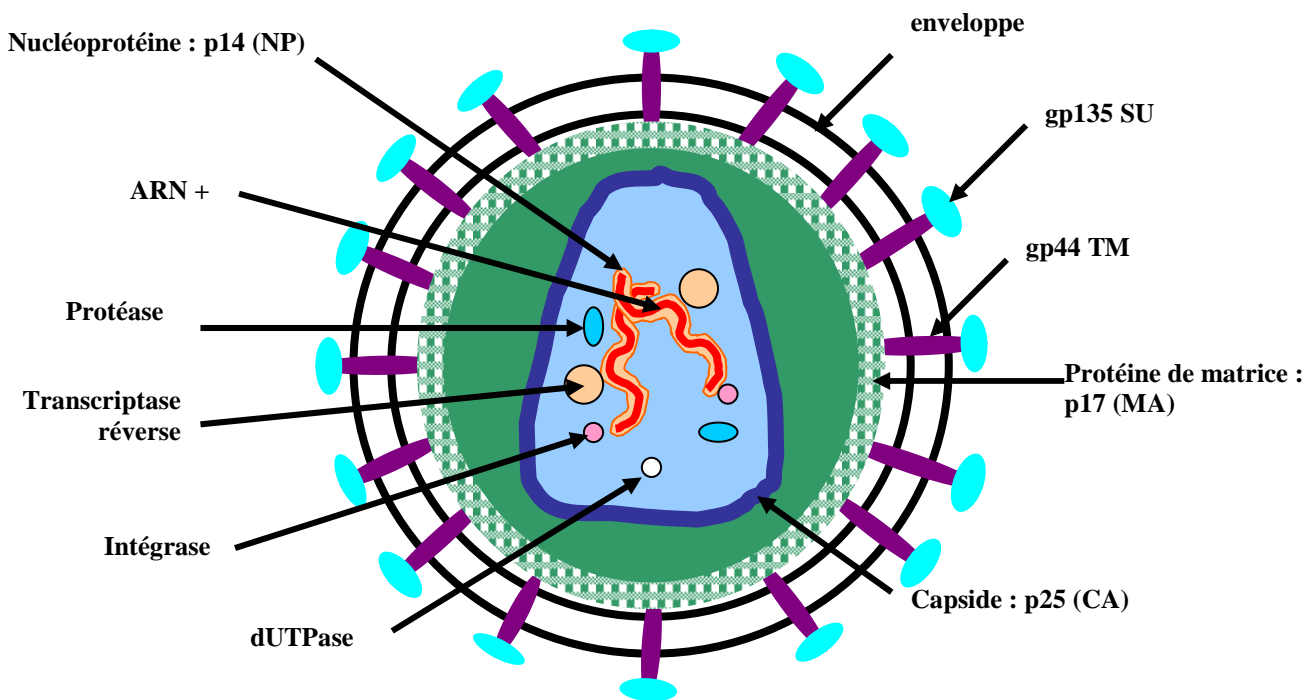


Figure 1 : Structure du virus Visna-Maedi

La région U3 contient une séquence promotrice et une séquence activatrice qui constituent le site d'action des produits de certains gènes transactivateurs viraux et aussi de facteurs de transcription cellulaires.

Lors de la réplication, chaque molécule d'ARN servira de matrice pour la synthèse de l'ADN proviral. L'ADN du VMV a une taille de 9,2 Kb. Le génome proviral est flanqué de régions terminales non codantes les LTR (Long Terminal Repeat); ces séquences LTR sont nécessaires à l'intégration de l'ADN proviral dans l'ADN cellulaire, ils sont aussi responsables de la régulation de l'expression des gènes viraux. Les lentivirus diffèrent des autres rétrovirus par leur capacité à réguler l'expression de leurs propres gènes.

Les trois gènes principaux : *gag*, *pol* et *env* du VMV codent des précurseurs qui seront ensuite clivés pour donner les protéines de structure et les enzymes virales (figure 2):

- ❖ Le gène *gag* code des protéines de structure essentielles dans l'assemblage et le bourgeonnement des particules virales. Il code un précurseur protéique Pr55^{gag} dont le clivage permet l'obtention des protéines de la matrice (MA) p17, de la capside (CA) p25 et de la nucléoprotéine (NP) p14.
- ❖ Le gène *pol* code les enzymes nécessaires à la réplication du virus, à l'assemblage et au bourgeonnement des particules virales. Le précurseur Pr^{gag-pol} sera scindé en plusieurs enzymes : la reverse transcriptase associée à une activité ribonucléase H (RNase H),

l'intégrase et la protéase. Dans le cas du virus Visna-Maedi, il existe une autre enzyme : la dUTPase. Ce gène est absent du génome des lentivirus de primates.

- ❖ Le gène *env* code un large précurseur (Pr160^{env}) qui est clivé par une protéase cellulaire pour donner naissance à la glycoprotéine de surface (SU) (gp135) et à la glycoprotéine transmembranaire (TM) (gp44) constituant avec les protéines de la membrane cellulaire, l'enveloppe virale.

Le génome comprend également des petits cadres ouverts de lecture situés entre les gènes *pol* et *env* et dans le gène *env*, codant différentes protéines régulatrices : Tat (transactivator of transcription), Rev (regulation of expression of viral proteins) et une protéine accessoire Vif (virion infectivity factor). Ces trois ORFs (Open Reading Frame) sont présents dans le génome du VMV, CAEV et EIAV. Le génome du HIV et du SIV comportent trois gènes supplémentaires, absents du génome du VMV : Vpu (viral protein u), Vpr (viral protein r) ou Vpx (Viral protein x) dans le cas du SIV et du HIV-2 et Nef (negative regulatory factor).

1.4. Les protéines virales du VMV et leur rôle

1.4.1. Les enzymes virales

Les enzymes virales sont issues du précurseur Pr^{gag-pol} (Pepin *et al.*, 1998).

1.4.1.1. La reverse transcriptase

L'enzyme clé des rétrovirus est une ADN polymérase-ARN dépendante codée par le gène *pol*. Elle permet la transcription de l'ARN viral en ADN monocaténaire puis bicaténaire, formant ainsi le provirus capable de s'intégrer alors dans le génome de la cellule hôte. Cette protéine est un hétérodimère qui possède une activité RNase H intrinsèque qui élimine l'ARN matrice.

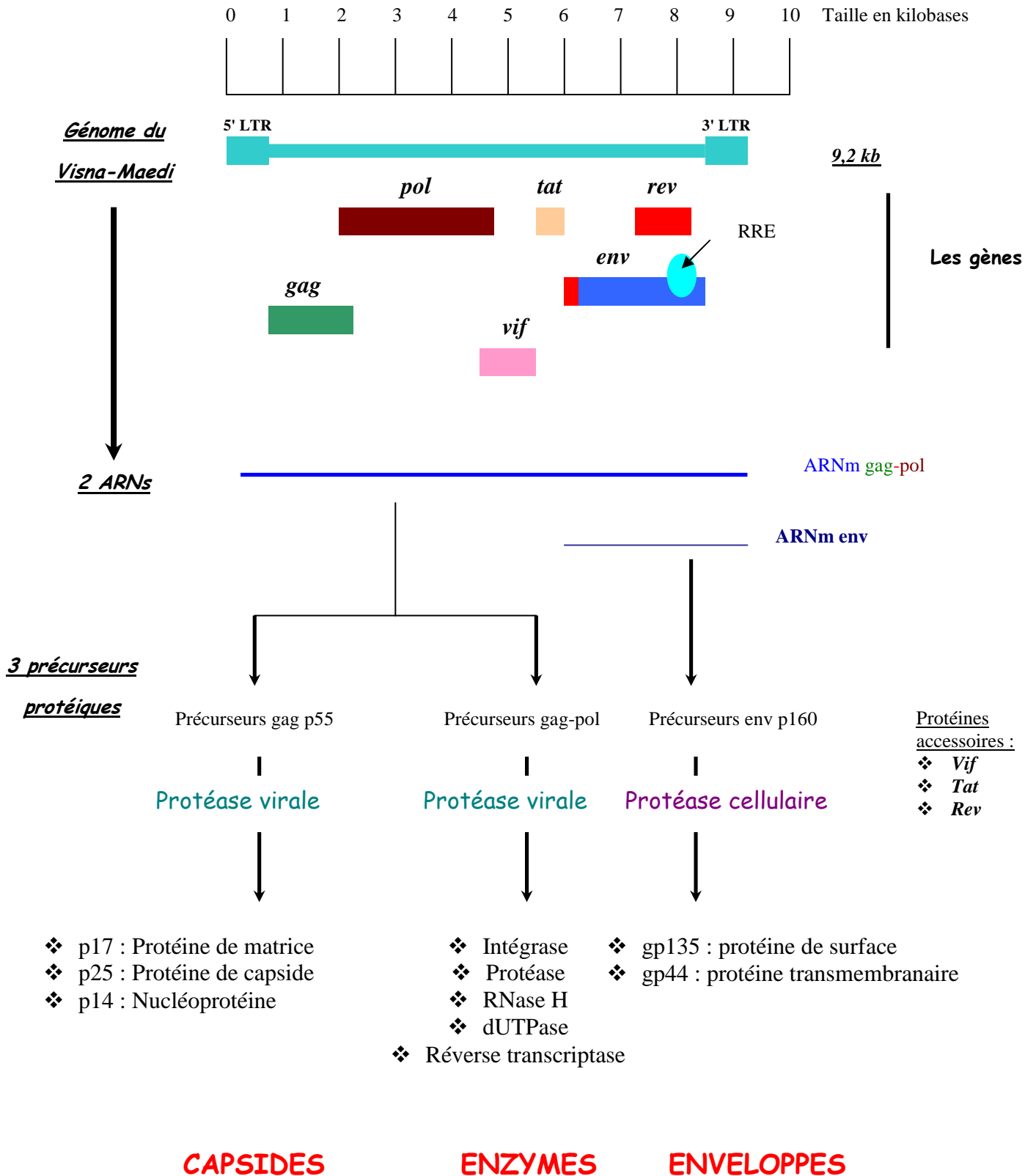


Figure 2 : Organisation génomique du virus Maedi-Visna

1.4.1.2. La dUTPase

Dans le génome des lentivirus, la séquence génomique codant la dUTPase est localisée dans le gène *pol*. Cette enzyme, absente des lentivirus de primates, est seulement présente chez le FIV, l'EIAV, le CAEV et le VMV. Le rôle de cette enzyme est de diminuer la fréquence des mutations G-A. *In vitro*, le virus CAEV déficient pour cette enzyme se réplique beaucoup plus lentement dans des macrophages (Turelli *et al.*, 1996), alors que le virus VMV déficient pour cette enzyme semble aussi pathogène *in vivo* que la souche sauvage (Petursson *et al.*, 1998).

1.4.1.3. L'intégrase

Cette enzyme est associée à l'ARN viral. Le rôle de l'intégrase virale est de permettre l'intégration du génome viral sous forme d'ADN bicaténaire dans l'ADN de la cellule hôte, après que le provirus issu de la transcription reverse dans le cytoplasme ait migré dans le noyau.

1.4.1.4. La protéase

La protéase virale clive les précurseurs protéiques Pr^{gag-pol} et Pr55^{gag}. Elle est impliquée dans la maturation des protéines virales et agit en fin de cycle de répllication. Sa structure tridimensionnelle ressemble à la structure des protéases cellulaires à acide aspartique.

1.4.2. Les protéines régulatrices

Dans le cas du VMV, on retrouve les protéines Tat et Rev qui régulent l'expression des autres gènes et Vif qui contrôle la production des particules virales infectieuses. Le nombre de cadres ouverts de lecture est différent selon les lentivirus, suggérant une régulation différente d'un lentivirus à l'autre mais le rôle de ces protéines régulatrices est identique d'un lentivirus à l'autre. Les ARNm codants pour Tat et Rev sont produits précocement après le début de la transcription.

1.4.2.1. La protéine Tat

La protéine Tat du VMV, du CAEV et du FIV est codée par un seul exon. Alors que les protéines Tat du HIV, de l'EIAV et du SIV sont codées par deux exons et par trois exons dans le cas du BIV. Le gène *tat* des lentivirus code des protéines de 9 à 15 Kda. La protéine tat du VMV à une taille de 10 Kda. Les lentivirus sont classées en deux groupes en fonction du mode d'action de leur protéine Tat. Le premier groupe comprend les HIV, SIV, BIV et EIAV pour lesquels Tat se lie à une structure en boucle de l'ARN appelé TAR (trans-activation response element) ; le second groupe formé par le VMV, le CAEV et le FIV ne possède pas de séquence TAR. La fonction transactivatrice de Tat qui permet l'accumulation d'ARNm viraux s'exercerait via les sites AP-1 et AP-4 situés dans la région U3 des LTR (Gdovin & Clements, 1992 ; De Parseval & Elder, 1999). La protéine Tat du VMV est caractérisée par un faible potentiel de transactivation (Davis & Clements, 1989 ; Villet *et al.*, 2003). La transactivation est une activation de gènes opérant à distance par un facteur diffusible, pour moduler l'expression des gènes d'autres molécules d'ADN. Dans le cas du CAEV, il a été démontré *in vitro* le rôle de Tat dans l'induction des chimiokines (Da Silva Texeira *et al.*, 1997) ; mais ces affirmations divergent en fonction du type cellulaire considéré (Lechner *et al.*, 1997). Ces constatations suggèreraient que la protéine Tat n'est pas indispensable dans la régulation de l'expression des cytokines.

1.4.2.2. La protéine Rev

Le gène *rev* du VMV est codé par quatre exons situés de part et d'autre du gène *env* ; il est transcrit en un ARNm de 1,4 Kb. La protéine Rev (19 Kda) possède un signal d'exportation nucléaire et facilite l'exportation des ARNm non épissés du noyau vers le cytoplasme en se fixant sur une région appelée RRE (Rev-responsive element) présente dans le gène *env* du génome. Les virus mutants *rev* sont non infectieux (Pepin *et al.*, 1998). Un niveau critique d'expression de Rev est nécessaire au passage de la phase précoce de réplication à la phase tardive de l'expression des gènes viraux (Olsen *et al.*, 1990; Arrigo *et al.*, 1991).

1.4.2.3. La protéine Vif

La protéine Vif (29 Kda) est transcrite lors des phases tardives de la réplication virale (Audoly *et al.*, 1992 ; Harmache *et al.*, 1995). L'importance de Vif lors de la réplication du VMV n'est pas démontrée mais dans le cas du CAEV et du HIV, Vif jouerait un rôle crucial dans les étapes tardives du cycle de réplication notamment pendant la morphogenèse du core (Hoglund *et al.*, 1994 ; Simon *et al.*, 1997). Vif faciliterait l'infectiosité et la propagation du virus dans les lymphocytes et macrophages. Le gène *vif* est absent du génome de l'EIAV.

1.4.3. Les protéines virales de structure

Le VMV est constitué de deux protéines d'enveloppe :

- ❖ une glycoprotéine de surface gp135 SU qui se fixe sur les récepteurs spécifiques de la cellule hôte. 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 (Narayan & clements, 1989).

La gp44 du virus est ancrée à la bicouche lipidique de l'enveloppe virale. La glycoprotéine 135 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) membranaire(s) à la surface des cellules hôtes. Il semblerait que le virus Visna-Maedi et le CAEV, deux lentivirus très proches de part leur structure et la séquence de leur génome, auraient des épitopes de natures différentes contenus au niveau de leur glycoprotéine d'enveloppe respective (Chebloune *et al.*, 1996). Ces glycoprotéines d'enveloppe sont dans le cas du CAEV : gp135 SU et gp42 TM (Abelson & Schoborg, 2003) et dans le cas du HIV on retrouve la gp120 et la gp41.

Les protéines de capsid sont représentées chez le VMV par : p25, p14 et p17, et pour le CAEV par p28, p19 et p16 (Cheevers *et al.*, 2003). La protéine de matrice (MA ou p17) est responsable de l'association du précurseur Pr55^{gag} avec la membrane cellulaire. La p17 est située entre l'enveloppe virale et la protéine de capsid (CA ou p25) du virus. La p25, protéine majeure du core, est l'antigène inducteur d'une forte réponse anticorps utilisé dans les

tests de dépistage pour rechercher les anticorps anti-p25. La nucléoprotéine (NP ou p14) est directement associée aux molécules d'ARN viral.

1.5. Les récepteurs et cibles cellulaires du VMV

La nature précise des récepteurs du VMV, mais aussi du CAEV, n'est pas encore clairement connue. Des anticorps dirigés contre une protéine de 50 Kda présente à la surface des cellules de plexus choroïde ovin, empêche l'infection de ces cellules par le VMV (Crane *et al.*, 1991). Jolly *et al.* (1989) ont montré l'entrée du VMV dans les macrophages par l'intermédiaire du récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines. L'infection des cellules de membrane synoviale de chèvre par le CAEV est bloquée par la préincubation de ces cellules avec la glycoprotéine de surface gp135. On peut supposer que l'infection de ces cellules met en jeu une interaction entre la gp135 et un/ou plusieurs récepteurs cellulaires (Hullinger *et al.*, 1993). L'équipe de Hotzel (2001) a réalisé des mutants du virus CAEV exprimant des glycoprotéines de différentes souches de Visna-Maedi et montré qu'en fonction de l'origine de la souche de Visna utilisée, l'infection par ce virus recombinant n'était pas toujours limitée à l'infection des cellules de petits ruminants. La capacité du VMV 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. La première étude réalisée par Bruett *et al.* (2000), a mis en évidence un complexe protéique constitué de deux protéines majeures de 30 et 45 Kda. Cette protéine de 30 Kda est un protéoglycane portant un groupement GAG (chondroïtin sulfate glycosaminoglycan) associé à la membrane cellulaire. La présence d'un inhibiteur de l'addition du groupement GAG sur le protéoglycane réduit de manière significative l'infection des cellules de PC (plexus choroïde) par le virus Visna. Une seconde étude (Barber *et al.*, 2000) a permis d'identifier la structure de la protéine de 45 Kda. Il s'agit d'une sérine-thréonine kinase présente dans les cellules susceptibles d'être infectées par le virus Visna. La protéine de 45 Kda associée à une autre protéine de 56 Kda est mise en évidence dans des cellules infectées et capables de produire de nouvelles particules virales. Cette protéine de 56 Kda pourrait être le substrat de la sérine thréonine kinase qui aurait un rôle auxiliaire dans la réplication virale.

Le HIV pénètre dans la cellule hôte par interaction spécifique entre la glycoprotéine gp120 et la molécule CD4 récepteur de haute affinité. Le récepteur CD4 est une protéine

membranaire exprimée à la surface des lymphocytes T auxiliaires. Il est aussi présent, à un moindre degré, sur les cellules présentatrices d'antigène : monocytes et macrophages, cellules dendritiques et de Langerhans, et sur la microglie du cerveau. Les cellules folliculaires dendritiques fixent le HIV à leur surface mais ne sont pas infectables. Des récepteurs accessoires des chimiokines sont nécessaires à la pénétration du virus dans la cellule hôte. Plusieurs co-récepteurs notamment CCR-5 et CXCR-4 sont présents sur les lymphocytes CD4⁺ et les macrophages. La molécule CD4 est aussi le récepteur du SIV et du FIV. Mais il a été démontré que certaines souches de SIV (Edinger *et al.*, 1997) et le FIV (Willett *et al.*, 1997) peuvent utiliser seulement les récepteurs aux chimiokines en absence de CD4. Les récepteurs de l'EIAV et du BIV sont inconnus.

Les cellules cibles du virus Visna-Maedi et du CAEV sont essentiellement les cellules de la lignée monocytes / macrophages. Au début de la maladie, seuls quelques monocytes et promonocytes issus de la moelle sont infectés avec une réplication limitée : le virus réside alors sous la forme d'ADN proviral. Lors de la maturation et de la différenciation des monocytes en macrophages, l'augmentation du nombre de récepteurs viraux et la production de certains facteurs cellulaires stimulent la transcription virale ce qui augmente la sensibilité à l'infection (Clements *et al.*, 1994). Mais d'autres populations cellulaires peuvent aussi être la cible des lentivirus. Certaines cellules du système nerveux central sont infectées par le VMV : les cellules épithéliales, les fibroblastes de PC, les astrocytes et les oligodendrocytes de la substance gliale. S'il est clairement établi aujourd'hui que la principale cible du lentivirus ovin est bien la lignée monocyttaire, il est reconnu que 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 (Zinck & Johnson, 1994).

Les cellules cibles des autres lentivirus sont principalement les cellules de la lignée monocytes et macrophages. Mais, les lymphocytes B, les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ dans le cas du FIV et les lymphocytes Tet B, dans le cas du BIV, sont également infectés (Pépin *et al.*, 1998).

1.6. Le cycle lentiviral (figure 3)

Le cycle lentiviral a surtout été étudié dans le cas du HIV-1. *In vitro*, le cycle de réplication du virus Visna-Maedi a principalement été observé sur cellules de plexus choroïde de mouton. L'interaction entre le virion et le récepteur cellulaire entraîne un changement de conformation de la glycoprotéine de surface, suivi de sa coupure protéolytique et du démasquage du domaine de fusion situé à l'extrémité amino-terminale de la protéine membranaire. Après fixation de la glycoprotéine gp135 sur le récepteur cellulaire (figure 3-1) et la fusion des lipides viraux et cellulaire (2), la capsid est éjectée dans le cytoplasme de la cellule puis dégradée, permettant la libération de l'ARN viral (3). La transcriptase inverse présente dans la capsid virale va synthétiser un brin d'ADN, complémentaire du génome viral, avec formation d'un hybride ARN-ADN ; le brin d'ARN sera éliminé grâce à l'activité Rnase H de la transcriptase reverse. Le brin d'ADN sera dupliqué en ADN bicaténaire dans le cytoplasme (4). L'ADN bicaténaire migre dans le noyau où il s'intègre à l'ADN cellulaire grâce à l'endonucléase virale ou intégrase (5). Les lentivirus à la différence des autres rétrovirus peuvent s'intégrer dans une cellule qui n'est pas en division. A partir de l'ADN proviral et à la faveur d'une activation par des facteurs extérieurs ou physiologiques, la transcription débutera. Il y a d'une part formation d'ARNm non épissés (ARN génomique) codant pour les protéines gag, pol et env, qui seront encapsidés et d'autre part formation d'ARNm épissés qui permettront la synthèse des protéines régulatrices et des protéines de structure. Après assemblage des protéines (8) de capsid et encapsidation des deux ARNs génomiques et des nucléoprotéines, les virions sont alors libérés (9) par bourgeonnement (10) à la surface de la cellule infectée.

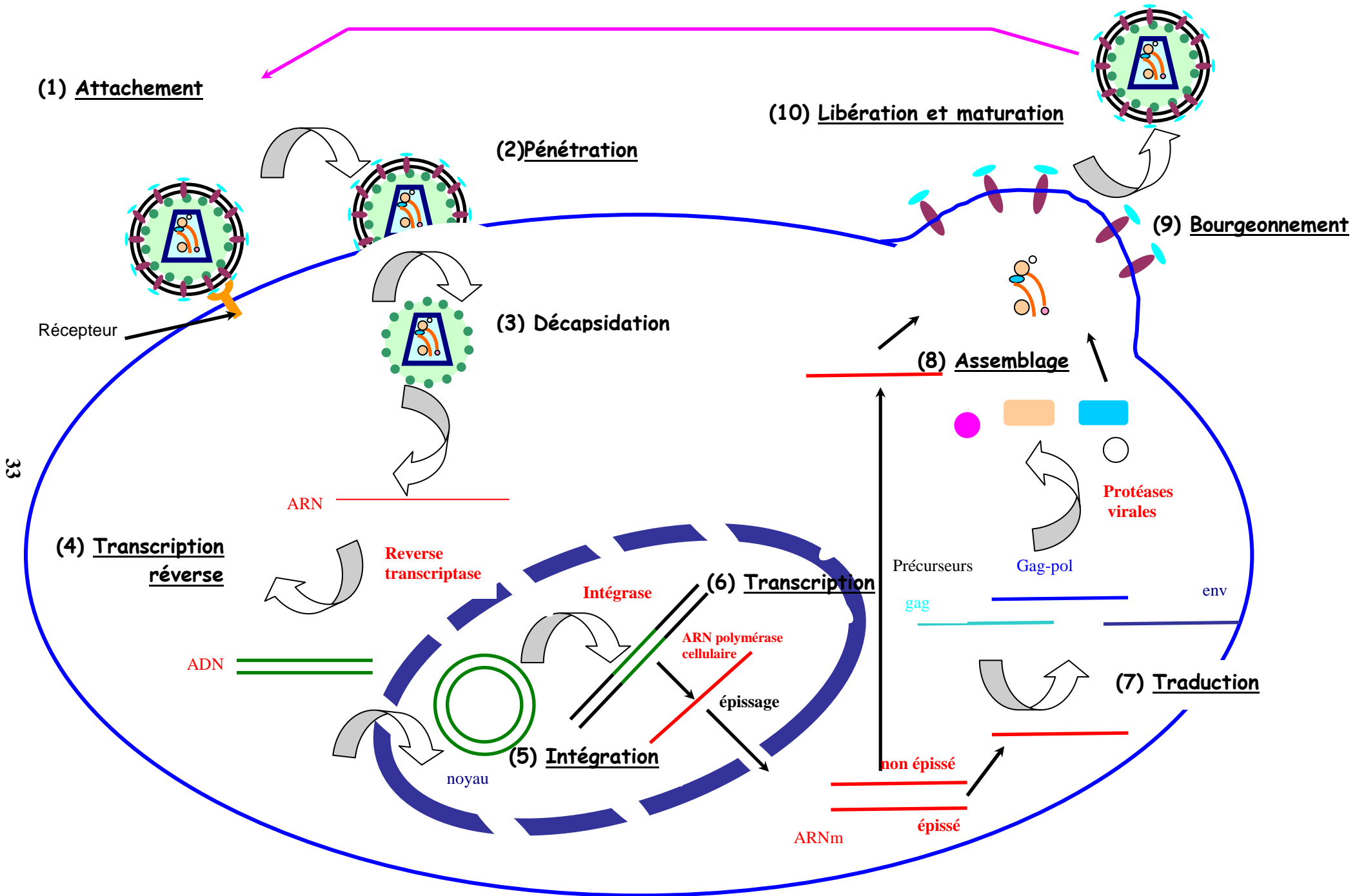


Figure 3 : Cycle de réplication des lentivirus

1.7. Les pathologies associées au VMV et aux lentivirus (tableau 1)

Plusieurs caractéristiques communes relient les infections à lentivirus:

- ❖ **une longue période d'incubation** : plusieurs semaines, mois, voire des années pendant lesquelles la maladie est silencieuse,
- ❖ **un développement lent et progressif**, généralement sans épisode aigu, sans rémission, aboutit à la mort en absence de traitement,
- ❖ **Une spécificité d'espèce**, excepté pour le CAEV et le VMV qui peuvent infecter le mouton ou la chèvre.

Dans ce paragraphe, nous nous limiterons aux principaux symptômes cliniques associés aux maladies Maedi et Visna qui se manifestent aussi lors d'autres maladies d'origine lentivirale.

1.7.1. Atteinte pulmonaire

L'atteinte pulmonaire est particulièrement observée lors des lentiviroses du mouton, de la chèvre, du cheval, de l'homme et du singe.

Dans le cas du mouton infecté par le VMV, et après une période d'incubation allant de 2 à 5 ans, **la maladie Maedi** se traduit par une pneumopathie interstitielle diffuse, d'évolution clinique chronique, appelée pneumonie progressive ovine. Elle s'accompagne d'une hyperplasie lymphoïde, d'une alvéolite murale et luminale, caractérisée par un afflux de macrophages, lymphocytes et neutrophiles, d'une myomatose et d'une fibrose (Georgsson & Palsson, 1971; Mornex *et al.*, 1994). Les moutons adultes présentent au début une altération de l'état général, puis une insuffisance respiratoire avec dyspnée d'effort et toux. Ensuite, ces manifestations respiratoires s'aggravent progressivement avec une polypnée et évoluent inexorablement vers la mort. Dans la forme Maedi, l'animal est cachectique, apyrétique et meurt par anoxie, conséquence de surinfections bactériennes et parasitaires. L'infection par le CAEV provoque chez la chèvre une atteinte pulmonaire semblable à celle observée chez le mouton.

L'atteinte pulmonaire est fréquente chez les patients infectés par le HIV-1 mais elle est décrite surtout chez l'enfant. Elle est aussi observée chez le singe infecté expérimentalement.

1.7.2. Atteinte du système nerveux central

Des atteintes du système nerveux central sont fréquemment décrites lors de l'infection par la plupart des lentivirus. Chez le mouton infecté par le VMV, **la maladie Visna** se déroule sous la forme d'une leucoencéphalomyélite démyélinisante qui apparaît après une période d'incubation de 9 mois à 5 ans. Les lésions du système nerveux sont de type inflammatoire avec afflux de nombreux macrophages, lymphocytes et plasmocytes dans les zones périvasculaires. Elles se traduisent par des troubles de la marche, un tremblement des lèvres, une inclinaison anormale de la tête puis à un stade plus avancé, on observe une parésie des muscles postérieurs et un amaigrissement. L'animal paralysé meurt dans un état général très dégradé (Zink & Johnson, 1994; Narayan & Cork, 1985; Cutlip *et al.*, 1979). Comme dans la forme Maedi, l'animal est apyrétique et l'évolution vers la mort dure plusieurs semaines ou mois. Des lésions du système nerveux identiques sont observées chez la chèvre infectée par le CAEV (Zink & Johnson, 1994).

Chez l'homme, les complications neurologiques sont particulièrement fréquentes au cours du SIDA (syndrome de l'immunodéficience acquise). Elles peuvent survenir à tous les stades de l'infection et concerner tous les organes du système nerveux (encéphale, moelle épinière et système nerveux périphérique), avec une diversité dans l'expression des manifestations cliniques. L'encéphalopathie est la plus fréquente des atteintes neurologiques (Lipton & Gendelman, 1995). L'infection du chat par le FIV entraîne des lésions analogues à celles observées chez l'homme (Egberink & Horzinek, 1992).

1.7.3. Atteinte des articulations

Chez le mouton atteint de la maladie Maedi, il peut apparaître une arthrite du carpe et du tarse qui se traduit par un œdème des tissus périarticulaires, une minéralisation des tendons et de la capsule articulaire, une prolifération des membranes synoviales avec infiltration de cellules mononucléées et formation d'un pannus synovial (Suarez *et al.*, 1993). Ces lésions sont très caractéristiques et plus fréquentes chez la chèvre adulte infectée par le CAEV (Andersson *et al.*, 1994).

Chez l'homme une arthrite est observée dans 12% des cas d'infection par le HIV et chez le singe infecté expérimentalement, une arthrite primaire a été mise en évidence.

1.7.4. Atteinte des glandes mammaires

Les lésions du tissu mammaire consistent en une infiltration plus ou moins intense de lymphocytes ou de plasmocytes dans le tissu interstitiel, avec accumulation autour des canaux galactophores pouvant aller jusqu'à la formation de nodules lymphocytaires. Ces lésions sont surtout présentes lors de l'encéphalite et de l'arthrite caprine (Lerondelle *et al.*, 1989). Elles sont parfois observées lors de l'infection par le VMV, mais de façon moins systématique. Elles se traduisent cliniquement soit par un syndrome aigu (le « pis de bois »), soit par une mammite.

1.7.5. Atteinte du système immunitaire

Seuls les HIV-1, HIV-2 et FIV sont capables de provoquer un syndrome de déficit immunitaire chez leur hôte naturel. L'infection expérimentale de singes par des souches de SIV provoque aussi une immunodéficience.

Les formes cliniques Visna et Maedi se manifestent chez l'animal adulte même s'il a été contaminé dans son plus jeune âge. Pour le moment il n'y a pas de prophylaxie vaccinale, ni de traitement. Les seules mesures prophylactiques efficaces sont l'éradication des animaux ou des troupeaux infectés. C'est ce qui s'est déroulé lors de l'épizootie islandaise où 65000 moutons ont été abattus entre 1944 et 1954 ayant pour résultat l'éradication complète de la maladie dans ce pays. Les maladies Visna, CAE et Maedi résident à l'état sporadique dans de nombreux pays dont la France où le dépistage est obligatoire pour les animaux destinés à l'exportation. Bien que non pathogène pour l'homme les virus VMV et CAEV sont deux exemples de lentivirus génétiquement et cliniquement très proches avec des infections croisées possibles entre deux espèces animales différentes. Ces deux virus sont des modèles viraux intéressants pour mettre en évidence les mécanismes d'induction de l'apoptose comparativement à ceux plus connus induits par le HIV.

Hôte	Virus	Maladie
<u>Ongulés</u>		
Petits ruminants	Maedi-Visna et CAEV	Pneumonie interstitielle diffuse Encéphalomyélite Amaigrissement Arthrite Mammite
Bovidés	BIV	Lymphadénopathie Lymphocytose Amaigrissement Fièvre Anorexie Lymphadénopathie Anémie
Equidés	EIAV	Pneumonie interstitielle diffuse Encéphalite Fièvre Amaigrissement Anémie
<u>Primates</u>		
Singe	SIV	Déficit immunitaire Infections opportunistes Lymphadénopathie Syndrome neurologique Pneumonie interstitielle diffuse Arthrite
Homme	HIV	Déficit immunitaire Infections opportunistes Lymphadénopathie Syndrome neurologique Pneumonie interstitielle diffuse
<u>Carnivores</u>		
Félidés	FIV	Déficit immunitaire Infections opportunistes Lymphadénopathie Syndrome neurologique Amaigrissement

Tableau 1 : Manifestations cliniques principales des infections lentivirales
(Narayan & Clements, 1989)

2. L'APOPTOSE

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée en réponse à des signaux intra ou extra-cellulaires déclencheurs de mort, ou à l'absence de signaux de survie dans l'environnement de la cellule. C'est une forme active d'autodestruction qui correspond à une réaction de l'organisme à des stimuli physiologiques ou pathologiques. Elle résulte de l'exécution d'un programme hautement régulé qui consiste en l'activation d'enzymes et l'expression de nombreux gènes pro ou anti-apoptotiques qui vont induire la destruction d'une cellule tout en préservant l'intégrité tissulaire environnante.

En 1972, Kerr, Wyllie et Currie ont appelé ce phénomène « apoptose », en référence à la chute des feuilles en automne, pour décrire une forme de mort différente de la nécrose, seule mort connue à cette époque.

La nécrose est une mort accidentelle et rapide, caractérisée par une ballonnisation de la cellule, une destruction de la membrane plasmique, une rupture de différents compartiments aboutissant à l'explosion de la cellule et à la libération de son contenu dans le tissu environnant, associée à une réaction inflammatoire. La nécrose provoque la destruction de plusieurs cellules.

L'apoptose est caractérisée par un certain nombre de modifications morphologiques et biochimiques très différentes de celles de la nécrose. Parmi les critères morphologiques, on observe une diminution du volume cellulaire, le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique au début du processus, une relocalisation des organites cytoplasmiques, une condensation de la chromatine puis la fragmentation du noyau et du cytoplasme. La cellule se scinde en corps apoptotiques délimités par une membrane intacte contenant des organelles, des fragments nucléaires et un cytoplasme condensé. Parmi les critères biochimiques, on observe une chute du potentiel mitochondrial transmembranaire, une externalisation des résidus phosphatidylsérines de la membrane plasmique, une activation de la famille de protéases à cystéine ou caspases et une fragmentation de l'ADN en fragments de haut poids moléculaires ou en oligonucléosomes. Puis des marqueurs de surface, dont les résidus phosphatidylsérines, permettent la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages environnants, dans lesquels elles subissent une dégradation rapide.

2.1. Rôle physiologique

La mort cellulaire ne se limite pas à la période embryonnaire mais elle intervient tout au long de la vie d'un l'organisme, de sa naissance à sa mort.

L'apoptose assure le remodelage et le maintien de l'homéostasie tissulaire, c'est à dire la conservation du nombre et de la qualité des cellules qui les constituent (Evan & Littlewood, 1998). La mort cellulaire participe aux phénomènes de différenciation qui donnent naissance aux trois types de tissus (mésoderme, endoderme et ectoderme) dont dériveront l'ensemble des cellules qui constituent notre corps.

Elle joue un rôle essentiel dans la sculpture des métamorphoses successives de notre corps (Strange *et al.*, 2001 ; Vinatier *et al.*, 2001). Elle sculpte la forme interne et externe de l'embryon, puis la forme de nos bras, de nos jambes, elle élimine les tissus qui séparent les doigts, permettant leur individualisation (Meier *et al.*, 2000).

L'apoptose participe à la construction de nos deux organes de régulation les plus complexes, notre cerveau et notre système immunitaire.

La mise en place du réseau synaptique entre les neurones dépend d'un contrôle dynamique et séquentiel de la vie et de la mort. Une fois que le câblage des synapses est établi, la survie des neurones dépend de la capacité de ces connexions à faire preuve de leur fonctionnalité ; l'absence de circulation d'information nerveuse à travers une synapse entraîne l'autodestruction des neurones qui la composent. En quelques jours, plus de la moitié des neurones meurt. Disparaissent ainsi les neurones dits « inutiles » ou « dangereux ». Le contrôle de la vie et de la mort cellulaire par des signaux de l'environnement joue un rôle dans ces signaux d'auto-organisation, sélectionnant parmi toutes les interactions neuronales initialement possibles, celles qui réussissent à faire preuve de leur capacité à fonctionner (Flanagan, 1999 ; Verhage *et al.*, 2000). Ce sont des mécanismes semblables qui permettent la sculpture et la complexité de notre système immunitaire.

La mort cellulaire permet l'adaptation du système immunitaire au soi, sélectionnant à partir de l'immense diversité initiale de lymphocytes, les 1 à 5 % qui ont fait la preuve de leur capacité à défendre l'organisme sans l'agresser et qui seront par la suite capables de combattre un microbe qui nous aura envahi. La mort cellulaire est aussi essentielle à la régulation de la réponse immunitaire. Les cellules immunitaires prolifèrent suite à la présence d'un agent étranger. Une fois éliminé, un grand nombre de cellules est détruit pour ralentir la réponse

immunitaire qui pourrait causer de graves dommages à l'organisme (Ekert & Vaux, 1997 ; Goldrath & Bevan, 1999).

2.2. Apoptose et pathologies

De très nombreuses maladies sont liées à des dérèglements de mécanismes qui contrôlent l'apoptose. Toute anomalie de l'apoptose peut être responsable du déclenchement et de la progression de nombreuses pathologies caractérisées par un excès (maladie neurodégénérative) ou un défaut d'apoptose (cancer, infection virale, ...). Le déclenchement anormal ou excessif de l'apoptose joue un rôle essentiel dans le développement de la plupart de ces pathologies. Citons les exemples des maladies neurodégénératives chroniques comme l'amyotrophie spinale, la sclérose latérale amyotrophique, la chorée de Huntington, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, les rétinopathies dégénératives, et d'autres atteintes comme, les accidents vasculaires cérébraux, les complications immunologiques ou neurologiques dues à l'infection par le HIV, les hépatites fulminantes ou alcooliques et enfin les lésions causées par des méningites (Thompson, 1995).

Il existe une autre catégorie de maladies liées à une augmentation anormale du nombre de certaines cellules c'est le cas des cancers. Le blocage anormal de l'apoptose est important dans le développement des métastases permettant à des cellules cancéreuses de voyager à travers le corps sans s'autodétruire et de survivre dans un organe qui n'est pas le leur (Thompson, 1995 ; Evan & Littlewood, 1998). Il existerait aussi un lien entre le vieillissement, la sénescence et le processus apoptotique. Le vieillissement se caractérise par une altération progressive des capacités fonctionnelles de notre corps et par l'apparition de trois catégories de maladies graves : les maladies cardio-vasculaires, les maladies neurodégénératives et les cancers, tous liés comme nous l'avons vu à un excès ou un défaut d'apoptose (Johnson *et al.*, 1999).

De nombreux virus modulent la régulation des signaux apoptotiques, soit pour maintenir une infection virale latente soit pour maintenir viable la cellule hôte et ainsi augmenter l'efficacité de la réplication virale. La plupart des virus possèdent un ou plusieurs gènes permettant la synthèse de protéines dont l'effet est de réprimer à différents stades l'apoptose des cellules qu'ils infectent ; c'est le cas du virus de l'hépatite C (VHC), du virus Herpès simplex type-1 (VHS-1), des papillomavirus, du virus Epstein Barr (EBV) et des adénovirus (Teodoro & Branton, 1997a ; Hay & Kannourakis, 2002). En empêchant la mort

de ces cellules, les virus favorisent la survie de la cellule qu'ils infectent et donc leur propre survie, jusqu'à favoriser l'apparition de cancers pour certains. D'autres virus possèdent la capacité de déclencher l'apoptose des cellules qu'ils infectent, entraînant des déficits cellulaires en particulier immunitaire. Les virus peuvent alors se propager. Dans ce cas, on peut citer le HIV (Selliah & Finkel, 2001 ; Muthumani *et al.*, 2003), le virus de l'hépatite B (VHB), les virus poliomyélitiques et le virus de la grippe (Hay & Kannourakis, 2002). Quelque soit les moyens de réguler l'apoptose, les virus parviennent toujours à leur fin.

2.3. Les mécanismes généraux de l'apoptose

Il existe aujourd'hui plusieurs voies de signalisation aboutissant à la mort cellulaire par apoptose. La première, appelée voie intrinsèque, met en jeu la mitochondrie qui occupe une place centrale dans les mécanismes de l'apoptose. Une autre voie est initiée à la surface de la cellule par des récepteurs membranaires, c'est la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort. Ces deux voies de signalisation aboutissent toutes deux à l'activation des caspases, famille de protéases ayant un rôle clé dans l'apoptose. Aujourd'hui, d'autres voies de signalisation s'ajoutent à celles précédemment décrites ; la voie indépendante des caspases met en jeu une protéine mitochondriale appelée AIF (Apoptosis Inducing Factor). Et, outre la mitochondrie, le réticulum endoplasmique apparaît comme un compartiment cellulaire déclencheur de l'apoptose en cas de stress.

2.3.1. La voie intrinsèque mitochondriale

2.3.1.1. Fonctions physiologiques de la mitochondrie dans la cellule

La mitochondrie possède une double membrane délimitant deux compartiments : la matrice et l'espace intermembranaire. Elle comprend un génome circulaire et des systèmes propres de transcription-traduction. La plupart des cellules eucaryotes contient des centaines de mitochondries. Leurs nombres, leurs tailles et leurs positions dépendent du type cellulaire et reflètent les besoins énergétiques de la cellule. Leur forme et leur changement de localisation sont associés à un transport actif *via* des interactions avec les éléments du cytosquelette. Les trois principales fonctions des mitochondries sont : la production d'énergie, la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la régulation de l'apoptose. La mitochondrie génère l'énergie sous forme d'ATP grâce au processus de phosphorylation

oxydative qui a lieu au niveau de la membrane interne (MI) (figure 4). Dans les conditions physiologiques, la MI est quasi imperméable. Au cours de la phosphorylation oxydative, des électrons sont générés à partir du NADH, produit par l'oxydation des nutriments, et sont transférés à l'oxygène moléculaire par une série de quatre complexes enzymatiques : NADH déshydrogénase (I), succinate déshydrogénase (II), cytochrome bc_1 (III) et cytochrome c oxydase (IV), tous présents dans la membrane interne de la mitochondrie. Le passage des électrons entre ces complexes produit de l'énergie qui est utilisée pour expulser des protons H^+ de la matrice vers l'espace intermembranaire. Ce couplage chimio-osmotique crée un gradient électrochimique ($\Delta\Psi$), positif et acide du côté externe de la membrane interne et négatif dans la matrice. L'existence du $\Delta\Psi_m$ autorise une diffusion facilitée spontanée de H^+ de la matrice par le canal F_0 de la F_1F_0 ATPase (ATP synthase, complexe V). Ce flux de protons est utilisé par ce complexe pour fabriquer de l'ATP qui est exporté en échange d'ADP par le translocateur nucléotidique à adénine (ANT : adenine nucleotide translocator) qui fonctionne comme un antiport. La phosphorylation oxydative est la principale source de ROS (anion superoxide O_2^- , peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , radical hydroxyl OH^\cdot). Outre son rôle essentiel dans la production d'énergie pour la cellule, il est clairement décrit aujourd'hui que la mitochondrie est un des acteurs principaux de l'apoptose (Green & Kroemer, 1998).

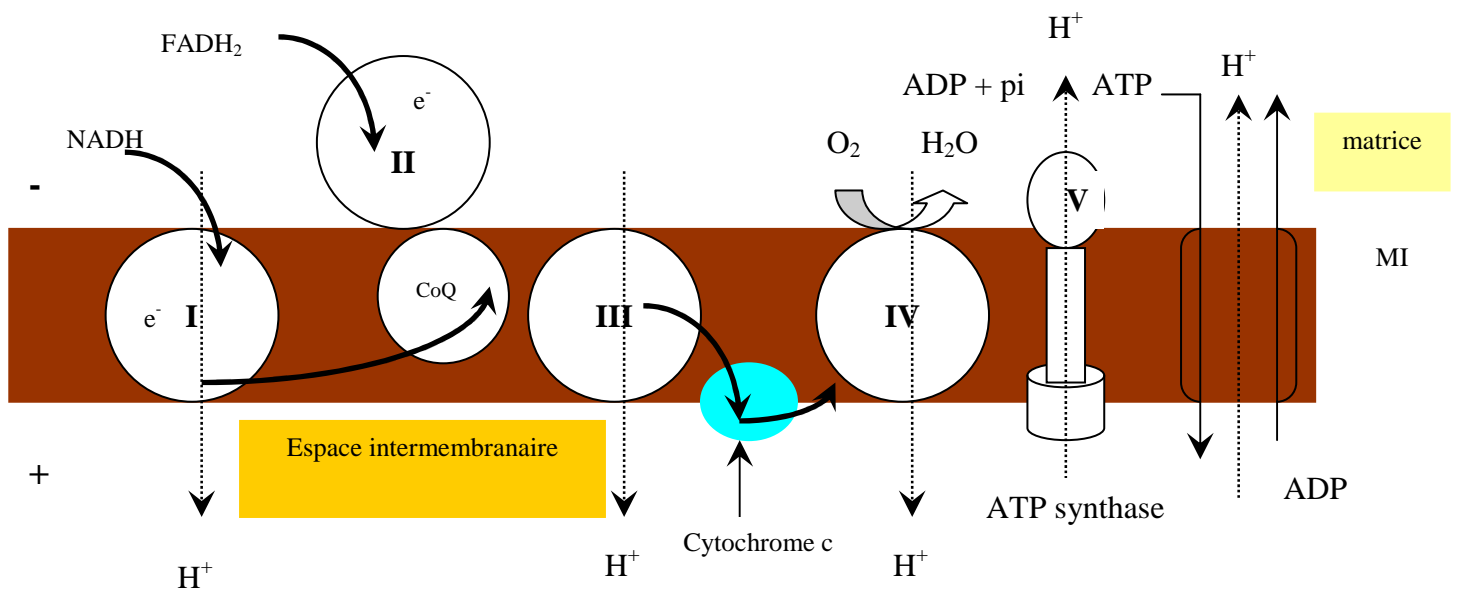


Figure 4 : La respiration mitochondriale

2.3.1.2. Rôle de la mitochondrie au cours de l'apoptose

Certains auteurs tels que Kroemer *et al.* (1998), décrivent la mitochondrie comme le centre des phénomènes apoptotiques qui fonctionnent selon un modèle triphasique (figure 5) avec **une phase d'initiation** au cours de laquelle les signaux inducteurs d'apoptose convergent vers la mitochondrie, **une phase de décision** contrôlée par les membres de la famille de protéines Bcl-2 entraînant la perméabilisation des membranes mitochondriales et la libération de facteurs apoptogènes (sIMPs, soluble intermembrane mitochondrial proteins) et enfin **une phase de dégradation** mettant en jeu les caspases et DNases qui dégraderont de nombreux constituants cellulaires (Green & Kroemer, 1998).

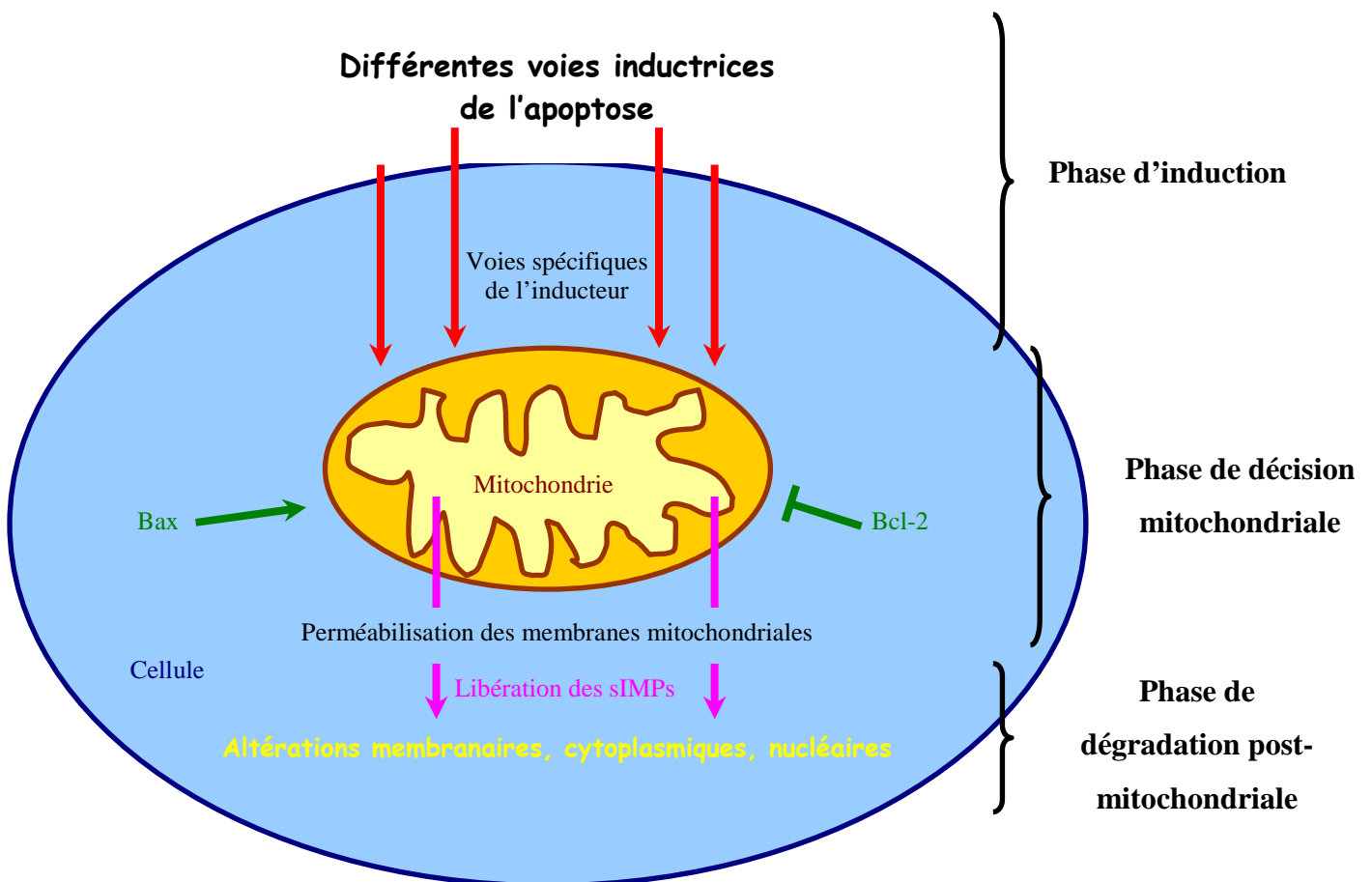


Figure 5 : Modèle apoptotique impliquant la mitochondrie

La première perturbation cellulaire détectable est une dissipation du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$), qui se produit bien avant l'exposition des phosphatidylsérines au niveau de la membrane cytoplasmique cellulaire, la fragmentation de l'ADN, l'activation de la cascade des caspases et l'activation des endonucléases (Kroemer *et al.*, 1998). A la suite de la chute du $\Delta\Psi_m$, la mitochondrie libère des protéines apoptogènes séquestrées dans l'espace intermembranaire mitochondrial, parmi lesquelles l'AIF, le cytochrome c (Cyt-c), Smac/DIABLO (Second Mitochondrial Activator of Caspases or Direct IAP Binding Protein with Low pI), les procaspases-2, -3, -8 et -9, et l'endonucléase G (Endo G) (Parone *et al.*, 2002) (figure 6).

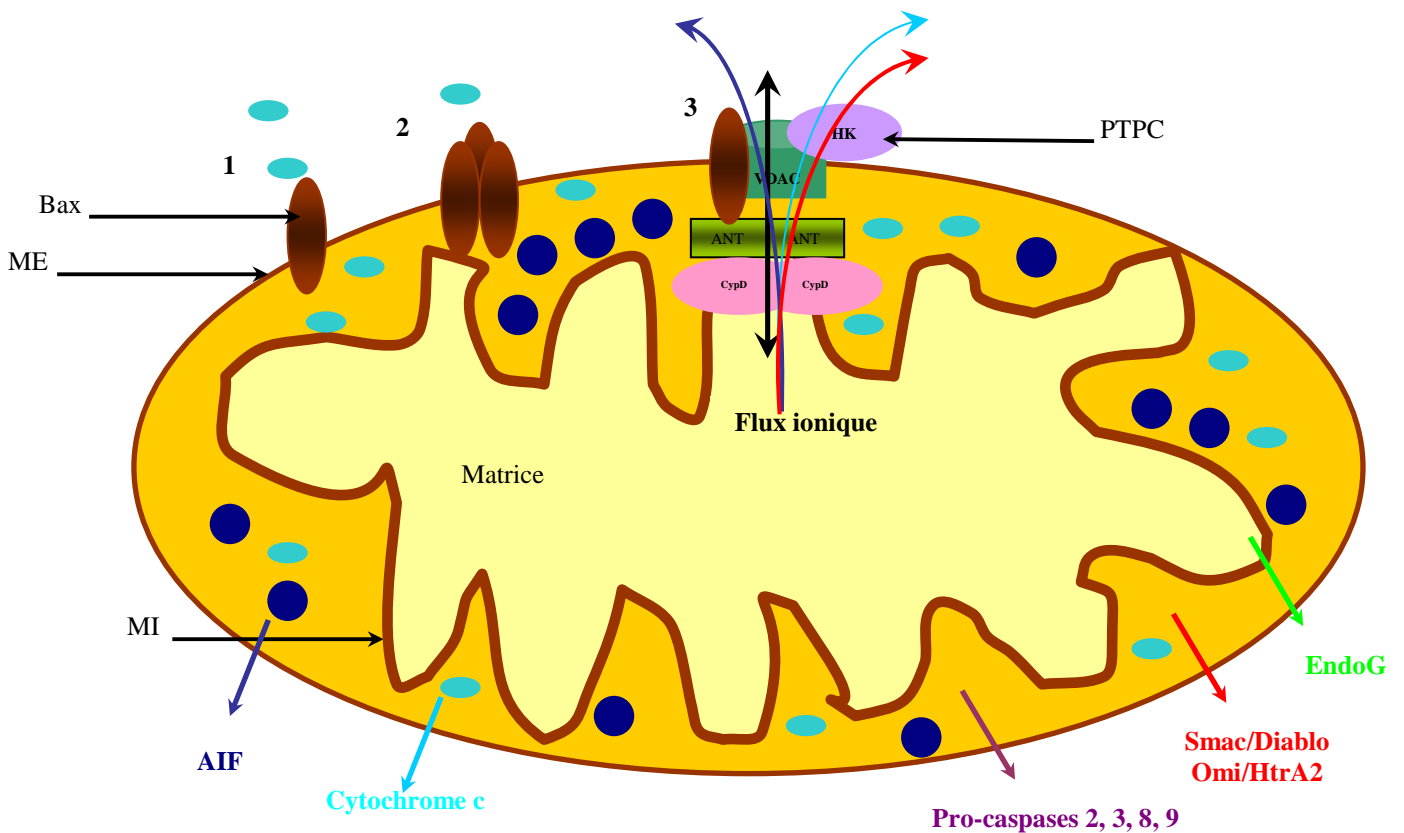


Figure 6 : Mécanismes de perméabilisation des membranes mitochondriales

Les nombreuses études concernant les mécanismes de relargage des protéines mitochondriales apoptogènes se sont focalisées sur le relargage du cytochrome c (Parone *et al.*, 2002). Le mécanisme exact de ce relargage n'est pas encore tout à fait connu mais plusieurs hypothèses sont proposées (Borner, 2003). On sait aujourd'hui que les membres de la famille de protéines Bcl-2 sont capables de former des canaux dans les membranes

lipidiques : ils ont donc été les premiers candidats désignés pour la formation de pores dans la membrane externe (ME) mitochondriale afin de permettre la libération du Cyt-c. Plusieurs études ont montré que les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak pouvaient s'insérer dans la membrane mitochondriale et former des oligomères avec des pores assez larges pour permettre le passage du Cyt-c (Korsmeyer *et al.*, 2000). Ceci a été démontré sur des liposomes et des mitochondries isolés, où l'incubation avec les protéines proapoptotiques Bax, Bad ou Bid déclenche une perméabilisation des membranes mitochondriales. Bax et Bid peuvent s'associer pour former des pores au niveau de la ME mitochondriale. Bad et une autre protéine proapoptotique, Bim, sont aussi capables de migrer du cytoplasme vers la mitochondrie. D'autres membres antiapoptotiques de la famille Bcl-2 sont capables d'empêcher le relargage du Cyt-c en interférant avec Bax et Bak dans la formation des pores.

Concernant, le déclenchement de la perméabilisation des membranes mitochondriales, plusieurs mécanismes pourraient coexister qui font tous intervenir la protéine proapoptotique Bax :

- ❖ La protéine Bax (figure 6-1) s'ancre dans la membrane externe mitochondriale induisant la formation d'un pore assez large pour permettre la sortie du Cyt-c. Cet ancrage pourrait s'effectuer par liaison directe avec un lipide ou une protéine membranaires, ou bien par un changement conformationnel lui permettant d'une part son ancrage à la membrane mitochondriale et d'autre part la formation d'un pore (Borner, 2003).
- ❖ Une autre hypothèse décrit une oligomérisation de Bax dans la ME mitochondriale (figure 6-2) (Borner, 2003). En effet, une mutation au niveau du domaine d'oligomérisation de Bax ou de Bak inhiberait leur fonction pro-apoptotique (Antonsson & Martinou, 2000). Ainsi, la multimérisation de Bax pourrait favoriser son changement conformationnel.
- ❖ Bax pourrait également se lier à des canaux déjà présents à la surface de la ME mitochondriale (figure 6-3). Le pore de transition de perméabilité (PTPC ou pore transition permeability complex) est un complexe polyprotéique localisé au point de contact entre les membranes mitochondriales interne et externe. Les principaux composants de ce complexe, qui pourraient varier en fonction du type cellulaire ou

de l'état physiologique, sont le translocateur ANT (Adenine Nucleotide Translocator), le « voltage-dependent anion channel » ou porine (VDAC) protéine la plus abondante de la ME mitochondriale, une hexokinase (HX) et la cyclophiline D (Cyp D) (Zamzami & Kroemer, 2001). La chute du $\Delta\Psi_m$ serait la conséquence de l'ouverture du PTPC et la liaison de Bax régulerait la taille du pore pour permettre la sortie de molécules d'un poids moléculaire supérieur à 1,5 Kda comme le cytochrome c (15 Kda), l'AIF (57 Kda) et Smac/Diablo (Borner, 2003).

Ainsi le mécanisme emprunté par les molécules mitochondriales apoptogènes pour s'échapper de la mitochondrie n'est pas encore bien connu, mais il fait suite à la chute du potentiel mitochondrial transmembranaire.

Le cytochrome c est codé par un gène nucléaire qui est transcrit puis traduit dans le cytoplasme en un précurseur, l'apo-cytochrome c, incapable de participer au processus apoptotique. Ce précurseur est ensuite transporté dans la mitochondrie, où il est transformé en une protéine globulaire en même temps qu'une cytochrome c lyase catalyse son attachement par des liaisons covalentes à un noyau hème. On l'appelle alors holo-cytochrome c ; celui-ci est séquestré dans l'espace intermembranaire mitochondrial où il permet le transport d'électrons entre les complexes III et IV (figure 4) de la chaîne respiratoire mitochondriale (Ravagnan *et al.*, 2002). En 1996, Liu *et al.* (a) ont observé que l'holo-cytochrome c, et non l'apo-cytochrome c, est indispensable à l'activation de la caspase-3 dans un système a-cellulaire. Ces résultats ont été très vite confirmés démontrant que le relargage du cytochrome c et l'activation de la caspase-3 sont bloqués par la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Kluck *et al.*, 1997 ; Yang *et al.*, 1997). Aujourd'hui, il est clairement établi que suite à un stimulus apoptotique, le cytochrome c transloque de la mitochondrie vers le cytoplasme de la cellule, où il s'associe pour former **un complexe protéique : l'apoptosome** (figure 7). Le Cyt-c se lie au domaine C-terminal de APAF-1 (Apoptosis-Protease Activating Factor 1) dans une région riche en motifs répétés « WD » connus pour être impliqués dans les interactions protéines-protéines. Ceci facilite la fixation de l'ATP par APAF-1 qui se dimérise par attachement de ses domaines N-terminaux.

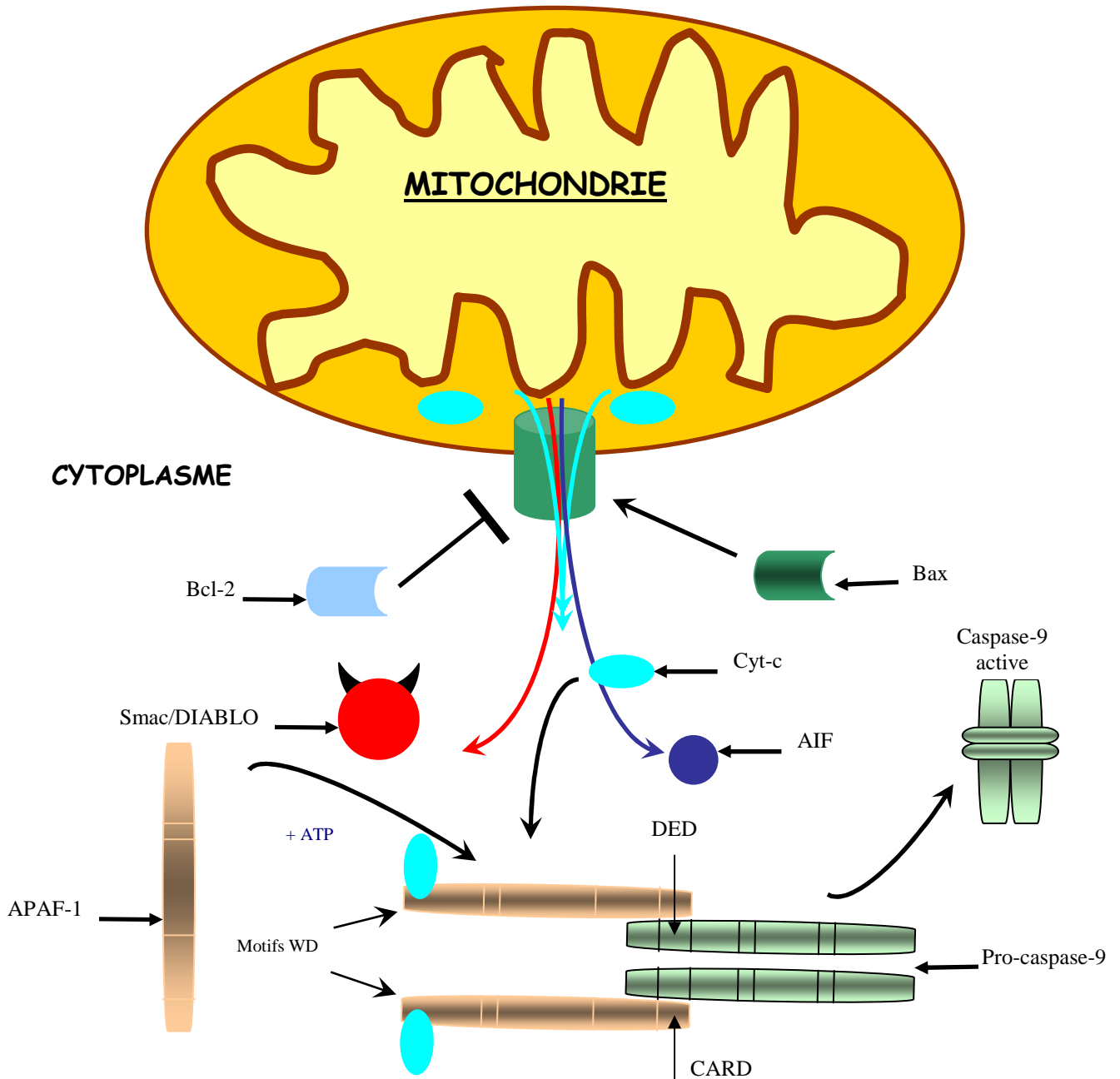


Figure 7 : Formation de l'apoptosome

La fixation du Cyt-c et de l'ATP provoque l'oligomérisation et un changement conformationnel de APAF-1 qui s'accompagne du recrutement de la pro-caspase-9, elle aussi libérée par la mitochondrie (figure7) (Ravagnan *et al*, 2002). La pro-caspase-9 se lie aux domaines CARD (caspase recruitment domain) de APAF-1, ce qui provoque son activation en caspase-9 (figure 7). L'importance de ce complexe chez les mammifères a été montré par des études génétiques chez la souris où des animaux déficients en Cyt-c ont une surproduction de cellules neurales due à un défaut d'apoptose, se traduisant par une mort prénatale ou périnatale. Les cellules dérivées de ces animaux déficients en Cyt-c ont une activité caspase-3

réduite. Par contre la formation de l'apoptosome ne semble pas indispensable ni à la formation du système immunitaire ni à l'activation des caspases, mais il peut constituer une boucle d'amplification de la cascade apoptotique (Van Gurp *et al.*, 2003).

L'AIF a été identifié en 1996 par l'équipe de Susin. La protéine AIF est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 67 Kda constitué de trois domaines protéiques : la région N-terminale qui contient un domaine de localisation mitochondriale, une séquence centrale et un domaine C-terminal homologue des NAD (nicotinamide adenine dinucleotide)-oxydoréductases bactériennes, portant deux domaines de localisation nucléaire (figure 8). Une fois le précurseur introduit dans la mitochondrie, il est clivé et libère son domaine N-terminal donnant naissance à la protéine mature : une flavoprotéine de 57 Kda. Cette flavoprotéine à une fonction duale de NAD(P)H oxydase et monodéhydroascorbate réductase mitochondriales, et de facteur apoptogène. Son activité oxydoréductase n'est pas essentielle à sa fonction apoptotique (Ye *et al.*, 2002). Après un stimulus apoptotique, l'AIF est libéré par la mitochondrie, transloque dans le noyau des cellules en apoptose et induit une condensation de la chromatine et un clivage de l'ADN en fragments de hauts poids moléculaires (50 Kpb) (Ravagnan *et al.*, 2002). Par détermination de la structure cristallographique de l'AIF, Ye *et al.* (2002) ont mis en évidence une région fortement positive à sa surface suggérant une interaction directe de l'AIF avec l'ADN. En effet, des mutants AIF défectifs pour leur liaison à l'ADN sont incapables de provoquer l'apoptose bien qu'ils migrent dans le noyau. Le mécanisme d'action de l'AIF est encore mal connu mais il est proposé que sa liaison à l'ADN pourrait entraîner un changement conformationnel de la chromatine dont la désorganisation aboutirait à des cassures. Ce changement conformationnel pourrait augmenter sa sensibilité aux nucléases et ainsi induire, via un mécanisme indépendant des caspases, la dégradation partielle de la chromatine. La topoisomérase II et les cyclophilines pourraient être des effecteurs secondaires de l'AIF (Ye *et al.*, 2002). L'interaction de l'AIF avec l'ADN est indispensable à sa fonction apoptotique. Lors de l'apoptose, la translocation mitochondrie-noyau de l'AIF apparaît être un processus important observé dans les cellules humaines ou de souris. La surexpression de Bcl-2 empêche la redistribution de l'AIF dans des lignées cellulaires de mammifères (Ferri *et al.*, 2000a). Lorsque l'AIF est micro-injecté dans le cytoplasme de cellules intactes, il induit plusieurs manifestations d'apoptose, comme la chute du potentiel mitochondrial membranaire, l'exposition des phosphatidylsérines à la surface de la membrane plasmique et des modifications nucléaires (Ferri *et al.*, 2000a). Ces mêmes effets sont obtenus dans des cellules transfectées par un mutant AIF qui ne possède pas de signal de

localisation mitochondriale, il est alors accumulé dans le noyau des cellules. En revanche, dans ce cas, ces effets ne sont pas inhibés par des inhibiteurs de caspases ou une surexpression de Bcl-2. L'AIF provoque l'apoptose des cellules déficientes en APAF-1 ou en caspase-3 (Loeffler *et al.*, 2001). La protéine Hsp 70 (Heat Shock Protein) a été décrite récemment comme un inhibiteur endogène de l'AIF, *in vitro* et *in vivo* (Ravagnan *et al.*, 2002).

N ter

C ter

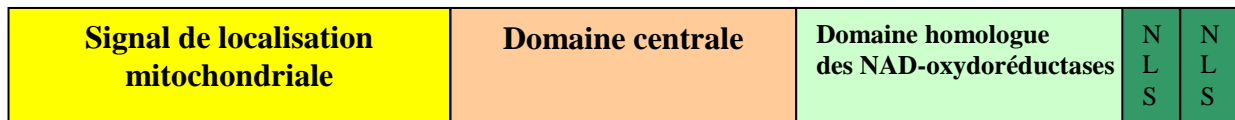


Figure 8 : Structure schématique du précurseur de la protéine AIF (67 Kda)

La protéine AIF mature ne possède pas de signal de localisation mitochondriale.

NLS : « Nuclear Localization Signal »

Smac/DIABLO est une protéine mitochondriale libérée lors de l'apoptose (figures 6 et 7). La libération du cytochrome c et la formation de l'apoptosome ne sont pas les seuls mécanismes aboutissant à la cascade des caspases. Cette protéine, synthétisée sous la forme d'un précurseur de 29 Kda, transloque dans la mitochondrie par son domaine N-terminal qui possède un signal de localisation mitochondriale. Il est ensuite clivé pour donner naissance à une protéine mature de 23 Kda. En réponse à différents stimuli apoptotiques, la protéine Smac/DIABLO mature est relarguée dans le cytosol où elle agit comme un inhibiteur des IAPs (Inhibitor of apoptosis proteins). Les IAPs cellulaires ont pour rôle de bloquer l'activation des pro-caspases et d'inhiber l'activité des caspases matures. Sous forme de dimères, Smac se lie aux IAPs, empêchant leur liaison aux caspases et ainsi leur inactivation (Ravagnan *et al.*, 2002). La famille des IAPs est caractérisée par la présence d'un ou plusieurs domaines BIR (Baculovirus IAP Repeat), motifs de 70 acides aminés très conservés que ce soit chez la levure ou chez l'homme. Ce domaine leur permet de se lier aux caspases ou à Smac. Par exemple, la liaison de Smac au domaine BIR2 de XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein) empêche l'inhibition de l'activation des caspases-3 et -7 par XIAP (figure 9). En revanche, la fonction physiologique mitochondriale de Smac/DIABLO est inconnue (Van Gurp *et al.*, 2003).

Lors de l'apoptose, deux autres facteurs apoptogènes sont libérés de la mitochondrie : **Omi/HtrA2 et l'endonucléase G (Endo G).**

Omi/HtrA2 a été identifié comme un nouvel inhibiteur des IAPs. Cette protéine est un précurseur de 49 Kda. Comme pour les autres facteurs apoptogènes, elle migre vers la mitochondrie où son signal de localisation mitochondriale est clivé pour donner naissance à une protéine mature de 37 Kda. HtrA2 fait partie de la famille des protéases à sérine. Cette protéine est confinée dans l'espace intermembranaire mitochondrial et suite à l'action de facteurs comme la staurosporine, TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) ou les ultra-violets, elle est relarguée dans le cytoplasme, où elle se lie aux IAPs comme Smac/DIABLO facilitant l'activation des caspases (figure 9) (Ravagnan *et al.*, 2002). Sa fonction n'est pas clairement connue mais elle pourrait être surexprimée dans des conditions de stress cellulaires, notamment au niveau du réticulum endoplasmique. Elle pourrait être impliquée dans l'apoptose dépendante et indépendante des caspases (Van Gurp *et al.*, 2003). Cette protéine montre de grandes similitudes avec la protéine Smac/DIABLO, mais elles sont toutes les deux exprimées différemment en fonction des tissus.

Endo G est une endonucléase mitochondriale codée par le génome nucléaire et son rôle principal est d'être impliqué dans la réplication du génome mitochondrial. Durant l'apoptose de cellules de mammifères, elle est relarguée par la mitochondrie puis transloque dans le noyau (figure 9). Elle digère l'ADN nucléaire en absence d'activation par les caspases. Widlak *et al.* (2000) ont démontré que l'Endo G est responsable, d'une part du clivage internucléosomal aboutissant à la formation des « ladders » dans des noyaux isolés, et d'autre part de l'obtention de fragments d'acides nucléiques de hauts poids moléculaires. Dans le noyau, elle pourrait agir de concert avec la DNase I ou avec l'héxonucléase. Ainsi l'action combinée de l'Endo G et de l'AIF, tous deux relargués par la mitochondrie, est un mécanisme totalement indépendant des caspases (Van Gurp *et al.*, 2003).

Hormis, les pro-caspases-2, -3, -8 et -9, on ne connaît pas actuellement d'autres protéines apoptogènes relarguées par la mitochondrie durant le processus apoptotique. Cependant, il n'est pas exclu que d'autres protéines soient identifiées à l'avenir. La voie apoptotique mettant en jeu la mitochondrie est appelée voie apoptotique intrinsèque et est présentée dans la figure 9. La voie mitochondriale intrinsèque est caractérisée par deux voies :

- ❖ une voie dépendante des caspases faisant intervenir les caspases-3, -9 et le cytochrome c,
- ❖ et une voie mitochondriale indépendante des caspases faisant intervenir l'AIF et l'Endo G.

Ces deux voies aboutissent aux modifications morphologiques nucléaires terminales de l'apoptose. En ce qui concerne la chronologie des événements moléculaires, les travaux publiés sont contradictoires. En effet, le cyt-c et l'AIF, acteurs clé de chacune de ces deux voies mitochondriales, seraient relargués de la mitochondrie à la suite de la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial et de l'ouverture des pores. D'autres auteurs proposent que ces deux protéines, une fois libérées, seraient par rétro-contrôle les déclencheurs de la chute du $\Delta\Psi_m$ (Van Gurp et al., 2003). Les avis des chercheurs divergent aussi sur l'ordre de relargage du Cyt-c et de l'AIF (Candé *et al.*, 2002). En effet pour certains le relargage du Cyt-c précède celui de l'AIF alors que pour d'autres l'AIF serait libéré de la mitochondrie bien avant le relargage du Cyt-c. Par exemple, lors de l'apoptose induite par la staurosporine (Susin *et al.*, 1999b) ou lors de l'infection de cellules Hela par le HIV-1 (Ferri *et al.*, 2000a et b), le relargage de l'AIF précède celui du Cyt-c.

2.3.2. Régulation de la voie mitochondriale par la famille de protéines Bcl-2

Les membres de la famille Bcl-2 ont une importance dans la régulation des voies de signalisation de la mort cellulaire. Tous les signaux inducteurs d'apoptose, à de rares exceptions près et dans de rares types cellulaires, semblent être modulés par les gènes de cette famille. Cette modulation se situe en amont de l'activation des caspases. La famille de protéines Bcl-2 comprend aussi bien des protéines pro-apoptotiques qu'anti-apoptotiques (figure 10). Le proto-oncogène Bcl-2 a été le premier membre identifié dans les lymphomes folliculaires de type B (Tsujiimoto & Croce, 1986). Il est capable de bloquer l'apoptose induite par un grand nombre de facteurs ; c'est un régulateur négatif de l'apoptose.

L'alignement des séquences protéiques des membres de la famille Bcl-2 a permis de définir quatre régions de forte conservation appelées domaines BH (Bcl-2 homology), de 1 à 4. Ces membres sont classés en trois groupes (Borner, 2003):

- ❖ le premier groupe ou « CED-9 (*Caenorhabditis elegans* death genes)-like survival factors » (Bcl-2-like survival factors, figure 10A) : les membres de ce premier groupe contiennent 3 à 4 domaines BH absolument essentiels à leur fonction de survie. On peut citer par exemple Bcl-2, Bcl-X_L ou Mcl-1. Il comprend les membres anti-apoptotiques de cette famille.

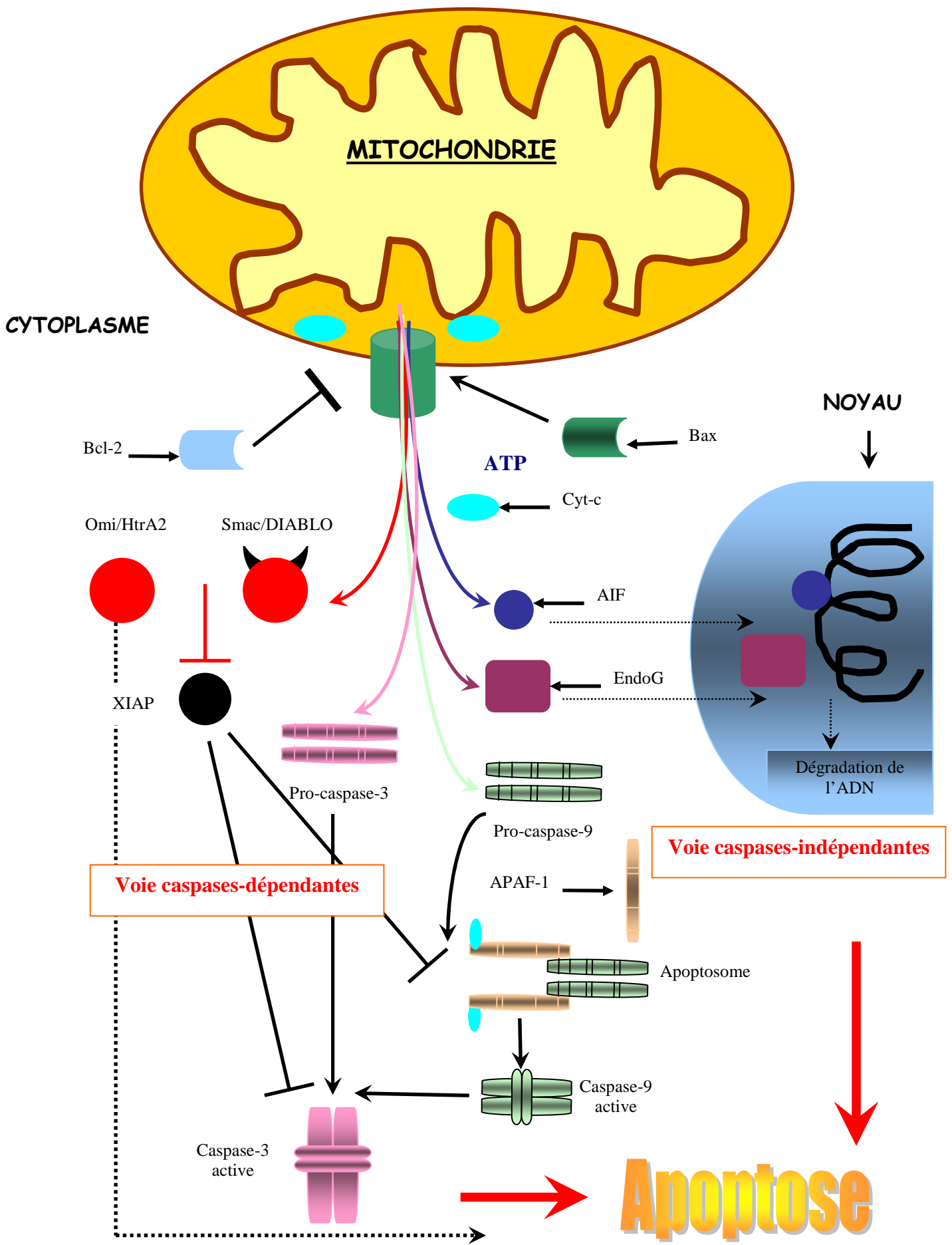


Figure 9 : Voie apoptotique mitochondriale ou voie intrinsèque

- ❖ Le deuxième groupe ou « EGL-like-pro-apoptotic factors » (BH3-only death factor figure 10B) comprend des membres possédant tous un domaine BH3 considéré comme un signal de mort. Ce sont par exemple Bik, Bad, Bid et Bim.
- ❖ Le troisième groupe ou « Bax-like death factors » (figure 10B) comprend entre autre Bax, Bak et Bok. L'absence du domaine BH4 peut expliquer leur fonction pro-apoptotique mais ce n'est pas le seul critère.

Ces deux derniers groupes comprennent les membres pro-apoptotiques de cette famille.

Les membres anti- et pro-apoptotiques semblent avoir des localisations sub-cellulaires différentes. Les membres anti-apoptotiques siègent au niveau des membranes cellulaires des mitochondries, du noyau et du RE (reticulum endoplasmique) alors que les protéines pro-apoptotiques auraient une localisation cytosolique ou près des microtubules. Une grande majorité des protéines de cette famille contient une partie carboxy-terminale hydrophobe qui leur permet de s'ancrer au niveau de la membrane externe mitochondriale, mais aussi du reticulum endoplasmique ou du noyau. A l'inverse de Bax, soit cytosolique soit ancré à la ME mitochondriale, la protéine Bcl-2 est toujours localisée au niveau de la mitochondrie. La capacité d'insertion dans la membrane mitochondriale des protéines Bcl-2, Bax, Bid et Bcl-X_L est due à leur analogie structurale avec les toxines bactériennes capables de former des pores ou des canaux transmembranaires (Gross *et al.*, 1999).

L'activation ou inactivation des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 **sont régulées par des modifications post-traductionnelles nombreuses**, telles les phosphorylations-déphosphorylations, le clivage, la séquestration dans le cytoplasme, ou la protéolyse (Gross *et al.*, 1999) (figure 11).

- ❖ **Bad est phosphorylé en présence de facteurs de croissance**, entraînant sa séquestration dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3. A la suite de signaux apoptotiques, comme la privation en cytokines ou en facteurs de croissance, la liaison d'un ligand à un récepteur de mort, Bad est déphosphorylé pour former des hétérodimères avec Bcl-X_L ou Bcl-2, par liaison avec son domaine BH3. Seule la forme non phosphorylée de Bad est capable de lier Bcl-X_L.
- ❖ A la suite de l'action du TNF- α ou du traitement par le ligand Fas, à la surface de la cellule, **le domaine N-terminal de la protéine pro-apoptotique Bid est clivé par la caspase-8** générant une protéine tronquée (tBid) de 15 Kda qui transloque

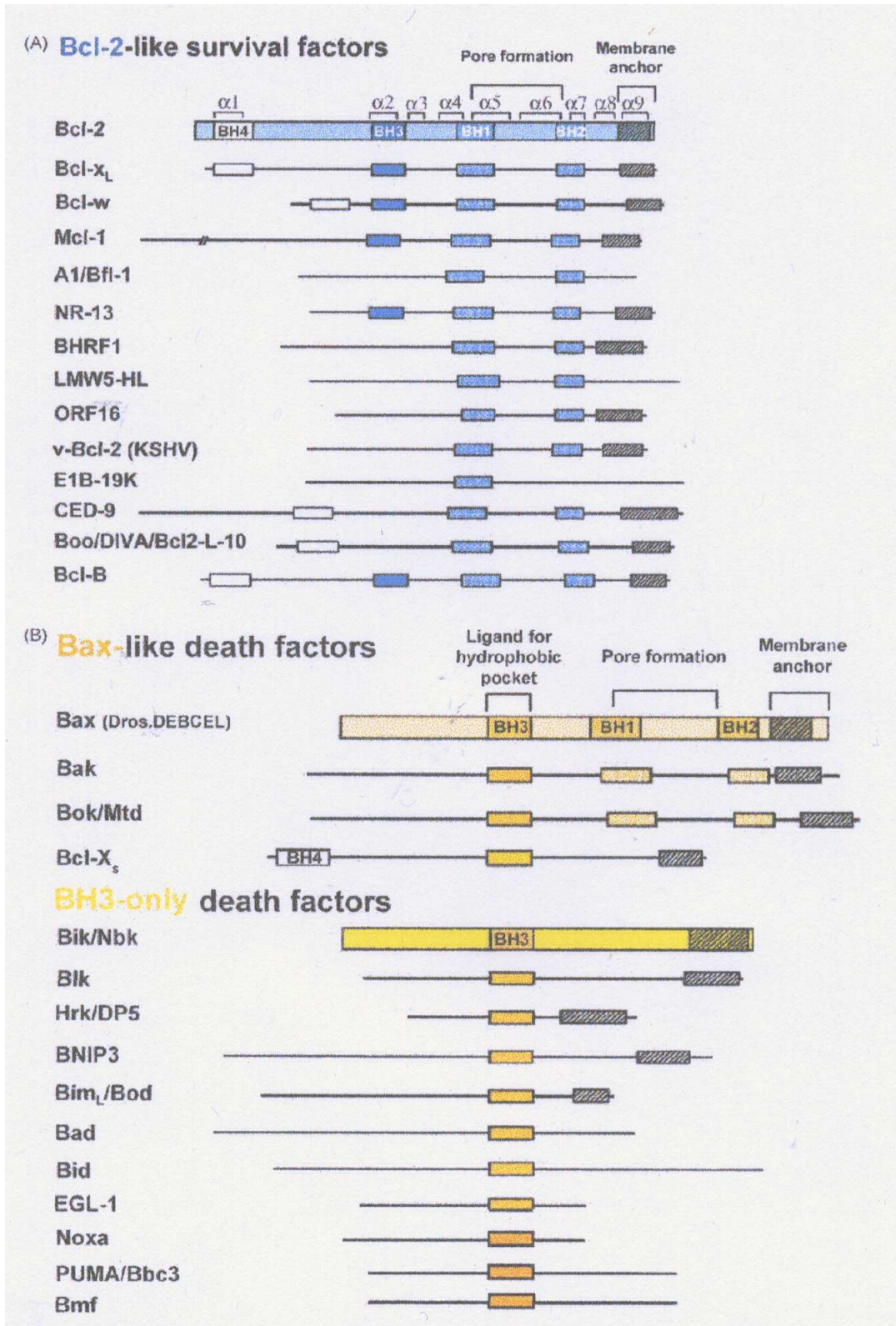


Figure 10 : Classification des membres de la famille Bcl-2 (d'après Borner , 2003)

et s'ancre dans la mitochondrie. Cette forme tronquée serait indispensable au relargage du Cyt-c. On suppose que la forme tronquée de Bid s'associerait à Bax par son domaine BH3 pour causer le dysfonctionnement de la mitochondrie. Il est décrit que Bid pourrait servir de chaperonne à Bax (Borner, 2003).

- ❖ **D'autres membres pro-apoptotiques sont séquestrés par des éléments du cytosquelette.** La molécule pro-apoptotique Bim est essentielle à l'apoptose durant l'embryogénèse. Son inactivation est due à sa séquestration par la dynéine. A la suite d'une privation en facteurs de croissance, ou de dommages causés par des radiations UV, Bim est relargué dans le cytosol et se lie aux membres pro-apoptotiques. Récemment il aurait été démontré que Bmf est aussi séquestrée par des protéines du cytosquelette (Borner, 2003).
- ❖ **Certains membres de la famille Bcl-2 subiraient une régulation transcriptionnelle.** L'expression des gènes *Bax*, *Bcl-2*, *PUMA* et *Noxa* est régulée au niveau transcriptionnelle par la protéine suppresseur de tumeur p53. Les protéines Mcl-1, Bcl-X_L et A-1 sont aussi régulées transcriptionnellement.

Toutes ces protéines interagissent entre elles pour former des homo ou hétérodimères, suggérant une neutralisation compétitive entre elles. Le niveau relatif de chaque protéine dans la cellule détermine sa sensibilité à un signal de mort. A la suite d'un signal apoptotique les molécules anti-apoptotiques, telle que Bax changeraient de conformation pour s'ancrer sous forme d'homodimère au niveau de la ME mitochondriale et induiraient sa perméabilisation, modulant ainsi la libération des facteurs apoptogènes.

Comme nous l'avons décrit précédemment Bax mais aussi Bak seraient responsables de l'ouverture des pores mitochondriaux entraînant la chute de $\Delta\Psi_m$. Par contre Bcl-2 et Bcl-X_L assureraient le fonctionnement des pores et empêcheraient le relargage du Cyt-c, favorisant la survie cellulaire. Les membres anti-apoptotiques pourraient soit contrôler l'ouverture des pores soit séquestrer la molécule APAF-1 et ainsi inhiber l'activation des caspases (Tsujimoto, 2003).

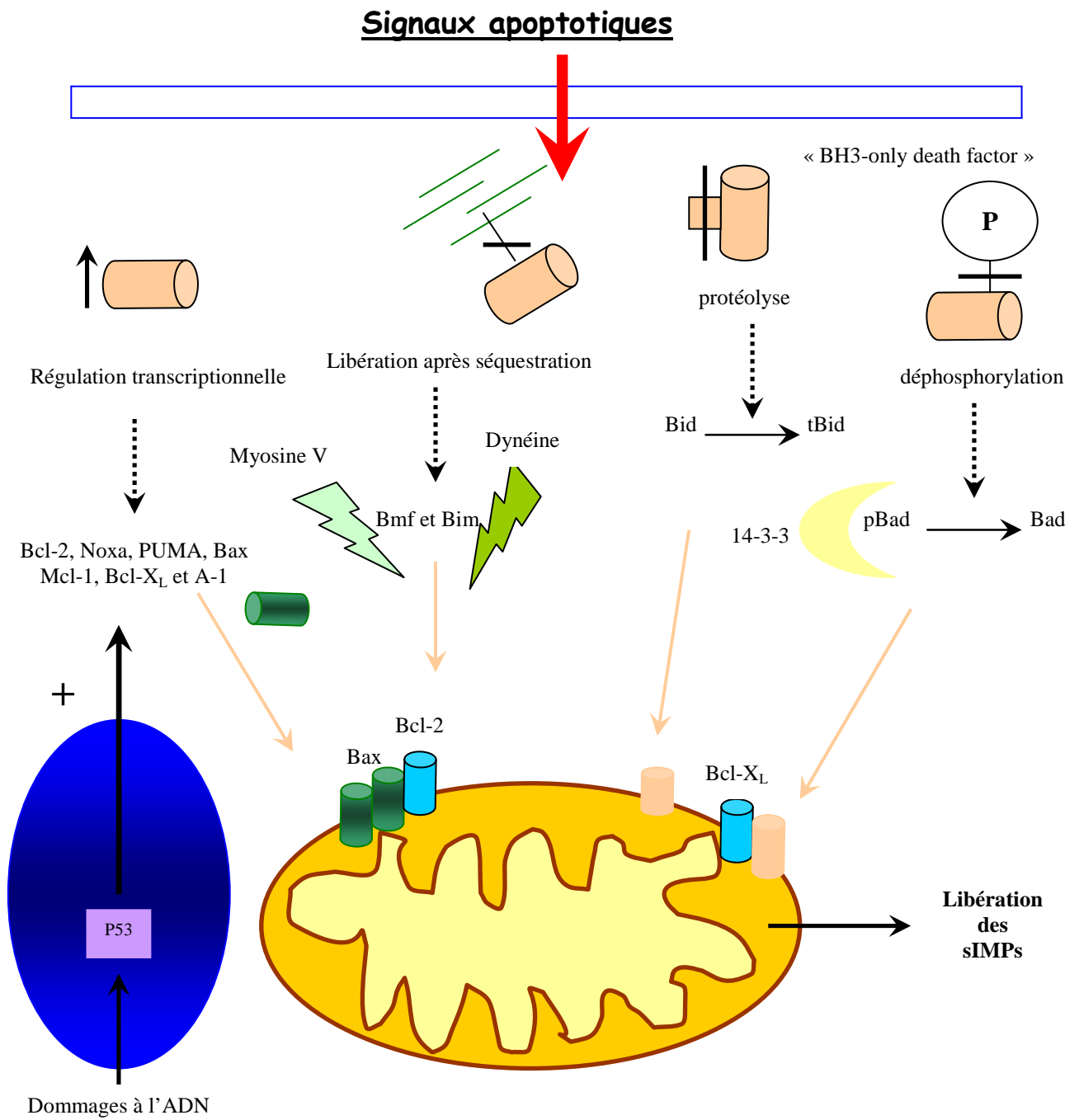


Figure 11 : Régulation de l'apoptose par les membres de la famille Bcl-2

2.3.3. La voie extrinsèque des récepteurs de mort

La deuxième voie apoptotique caspase-dépendante active dans les cellules de mammifères est appelée **la voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque**. Elle est initiée par la liaison entre des ligands de mort extracellulaires de la super famille du TNF (Tumor necrosis factor) comme TNF α , FasL/CD95L (Fibroblast-associated ligand), DR3L/TWEAK (Death Receptor 3 Ligand/weak homologue of TNF) et TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand). Ces ligands se lient à des récepteurs de mort présents à la surface des membranes cellulaires. Les récepteurs les plus décrits appartiennent à la super-famille du TNFR (Tumor necrosis factor receptor), Fas/CD95/Apo1, DR3 (death receptor 3) (ou Apo3, WSL-1, TRAMP, LARD), DR4, DR5 (ou Apo2, TRAIL-R2, TRICK2, KILLER) DR6 et TRAIL R1 (Garg & Aggarwal, 2002 ; Borner, 2003).

2.3.3.1. Mécanisme d'activation de la voie extrinsèque

La traditionnelle cascade d'évènements induite par le TNF commence par sa liaison aux membres de la super-famille des TNFR. La liaison du ligand provoque l'activation du récepteur qui induit la prolifération, la survie ou la différenciation cellulaire (Arch & Thompson, 1999 ; Locksley *et al.*, 2001), mais aussi l'apoptose (figure 12). Plus de 20 membres dans la famille des **TNFR** ont été identifiés et **sont classés en deux groupes** :

- ❖ **les récepteurs qui possèdent dans leur structure un domaine de mort DD** (death domain). Ces récepteurs permettent la transmission d'un signal apoptotique par activation des caspases. C'est le cas de **TNFR1 et de Fas** (figure 12) ;
- ❖ **les récepteurs qui ne possèdent pas de domaine de mort intracellulaire comme TNFR2** recrutent d'autres molécules permettant notamment d'activer le facteur de transcription NF- κ B, favorisant la survie cellulaire (Garg & Aggarwal, 2002) (figure 12).

Comme le présente la figure 12, la fixation du ligand, TNF- α , sur les récepteurs TNFR1 ou TNFR2 entraîne leur trimérisation. Le TNFR1 induit des signaux de survie mais aussi des signaux de mort, alors que TNFR2 induit principalement des signaux de survie ; cependant il a été démontré récemment que le TNFR2 pourrait jouer un rôle dans la régulation des signaux de mort induits par TNFR1 (Gupta, 2003).

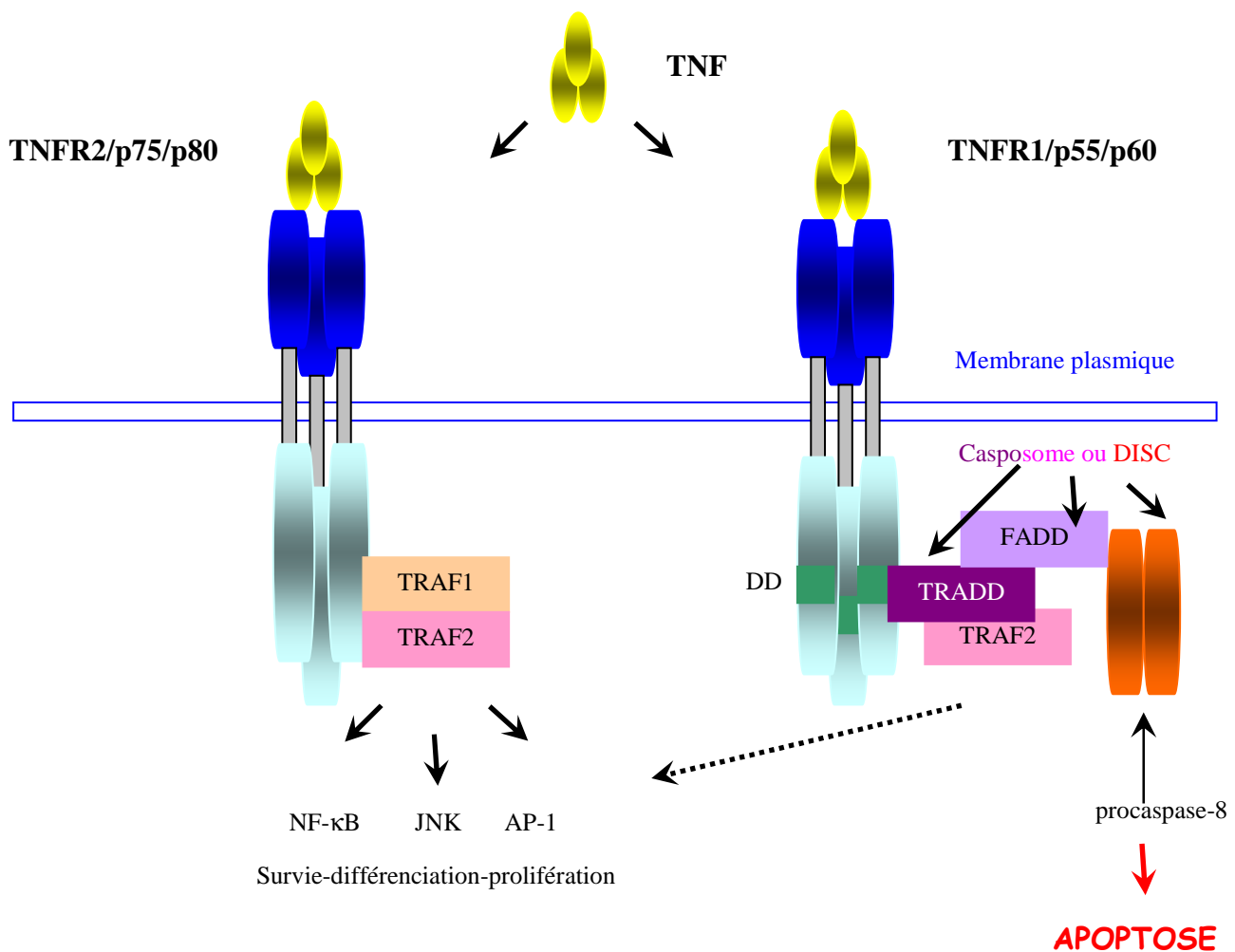


Figure 12 : Voies d'activation des TNFR

Les signaux de survie ou de mort induits par l'un ou l'autre des récepteurs dépendent du recrutement différent de molécules adaptatrices en aval.

La trimérisation du récepteur TNFR1 (figure 13) entraîne le recrutement de protéines adaptatrices cytoplasmiques comme TRADD (TNFR-Receptor Associated Death Domain), qui elle-même recrute FADD (Fas-Associated Death Domain). Ces protéines se lient alors aux domaines effecteurs de mort (DED) des caspases initiateuses, notamment les pro-caspases-8 et -10, **formant le casposome ou DISC** (Death-Inducing Signalling Complex). Pendant la formation du DISC, la pro-caspase-8 est immédiatement convertie en caspase-8 active libérée du DISC. Elle active alors les caspases effectrices -3, -6 et -7 permettant l'amplification du signal apoptotique. Les caspases effectrices et principalement la caspase-3, clivent de nombreux substrats provoquant ainsi l'apoptose. Cette voie peut être bloquée d'une part par des inhibiteurs de caspases ou par des FLIPs (FLICE-inhibitory

proteins) molécules homologues des caspases qui contiennent un domaine DED et se lient à FADD.

La voie apoptotique impliquant TNF/TNFR est essentielle dans l'apoptose des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (Gupta, 2003). Cette voie peut être activée en réponse à de nombreux autres stimuli. Des agents TNF-like utilisent cette même voie d'apoptose : les UV, les irradiations γ , les molécules chimiothérapeutiques, les virus, les bactéries, la privation en cytokines, ou neurotrophines, ou facteurs de croissance et le détachement de la matrice extracellulaire (anoikis) (Borner, 2003).

Cette même voie de signalisation peut aussi intervenir dans les lymphocytes T pour *a contrario* induire un signal de survie par recrutement d'autres molécules adaptatrices (figure 13). Le mécanisme par lequel cette orientation se déroule est encore mal connu : le TNFR1 recrute alors les molécules TRAF2 (TNF-Receptor-Associated Factor 2) et RIP (Receptor Interactive Protein). Ces molécules adaptatrices conduisent à l'activation des MAP (Mitogen-Activated Protein) kinases jusqu'à la kinase JNK ou bien à l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Le facteur de transcription NF- κ B est un répresseur d'apoptose (Liu *et al.*, 1996b ; Beg & Baltimore, 1996) alors que les MAP kinases peuvent inhiber (Darnay & Aggarwal, 1997) ou activer l'apoptose (Ichijo *et al.*, 1997). Lin *et al* (1999) ont supposé que RIP pourrait être un substrat de la caspase-8 lors de l'apoptose induite par le TNF α , ce qui bloquerait l'activation de NF- κ B. RIP a un rôle contradictoire dans cette signalisation, il serait aussi capable de recruter la protéine RAIDD (RIP Adaptator with Death Domain) qui contient un domaine CARD lui permettant d'interagir avec la caspase-2. Par le clivage de Bid, la caspase-2 provoque le relargage des facteurs apoptogènes mitochondriaux (Ashe & Berry, 2003).

La voie de signalisation mettant en jeu le récepteur TNFR2 (figure 13) permet le recrutement des molécules TRAF1 et TRAF2 au niveau la partie cytoplasmique du récepteur ne possédant pas de domaines DD. TRAF2 se lie alors à RIP permettant l'activation du facteur de transcription NF- κ B et l'inhibition de l'apoptose. Le rôle du récepteur TNFR2 dans l'apoptose ou la survie de la cellule est mal connu puisqu'il pourrait également réguler l'apoptose *via* le récepteur TNFR-1 (Grell *et al.*, 1999).

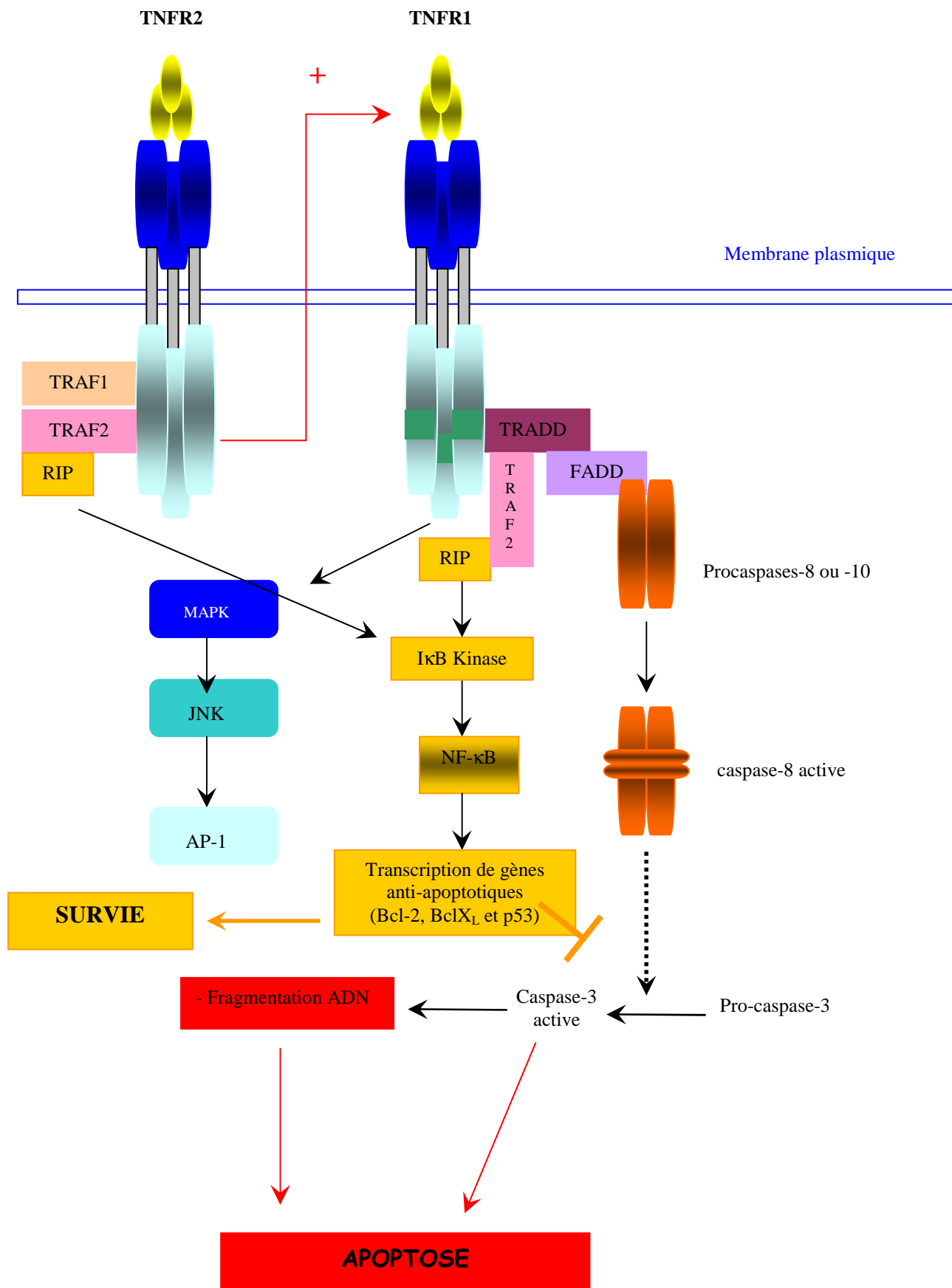


Figure 13 : La voie du TNF induit des signaux pro et anti-apoptotiques

Dans les lymphocytes, il existe une voie impliquant d'autres récepteurs de mort, par exemple le **récepteur Fas/CD95 et son ligand FasL/CD95L** (figure 14). Le récepteur FasL est exprimé de manière constitutive dans les lymphocytes alors que son ligand a une expression plus restrictive. La voie utilisant le récepteur Fas permet le recrutement de la molécule adaptatrice FADD qui interagit avec les domaines DD de Fas. FADD se lie alors à la pro-caspase-8 pour former le DISC qui libèrera la caspase-8 active. La caspase-8 clive et active la caspase-3 et entraîne l'apoptose. Ce schéma classique est spécifique des cellules « de type I » (Scaffidi *et al.*, 1998). Ainsi, le processus est différent dans les cellules dites « de type II ». Dans les cellules de type II, la quantité de pro-caspase-8 est trop faible pour former le DISC. La cascade des caspases est alors amplifiée par la mitochondrie. La caspase-8 active clive Bid pro-apoptotique. Bid tronqué (tBid) transloque vers la mitochondrie pour induire la chute du $\Delta\Psi_m$, la formation du PTP, la libération du Cyt-c, des autres facteurs apoptogènes et l'activation de la caspase-9 (Li *et al.*, 1998). Les lymphocytes T périphériques et les thymocytes sont classés dans les cellules de type I, alors que les cellules du foie sont de type II (Algeciras-Schimmich *et al.*, 2002).

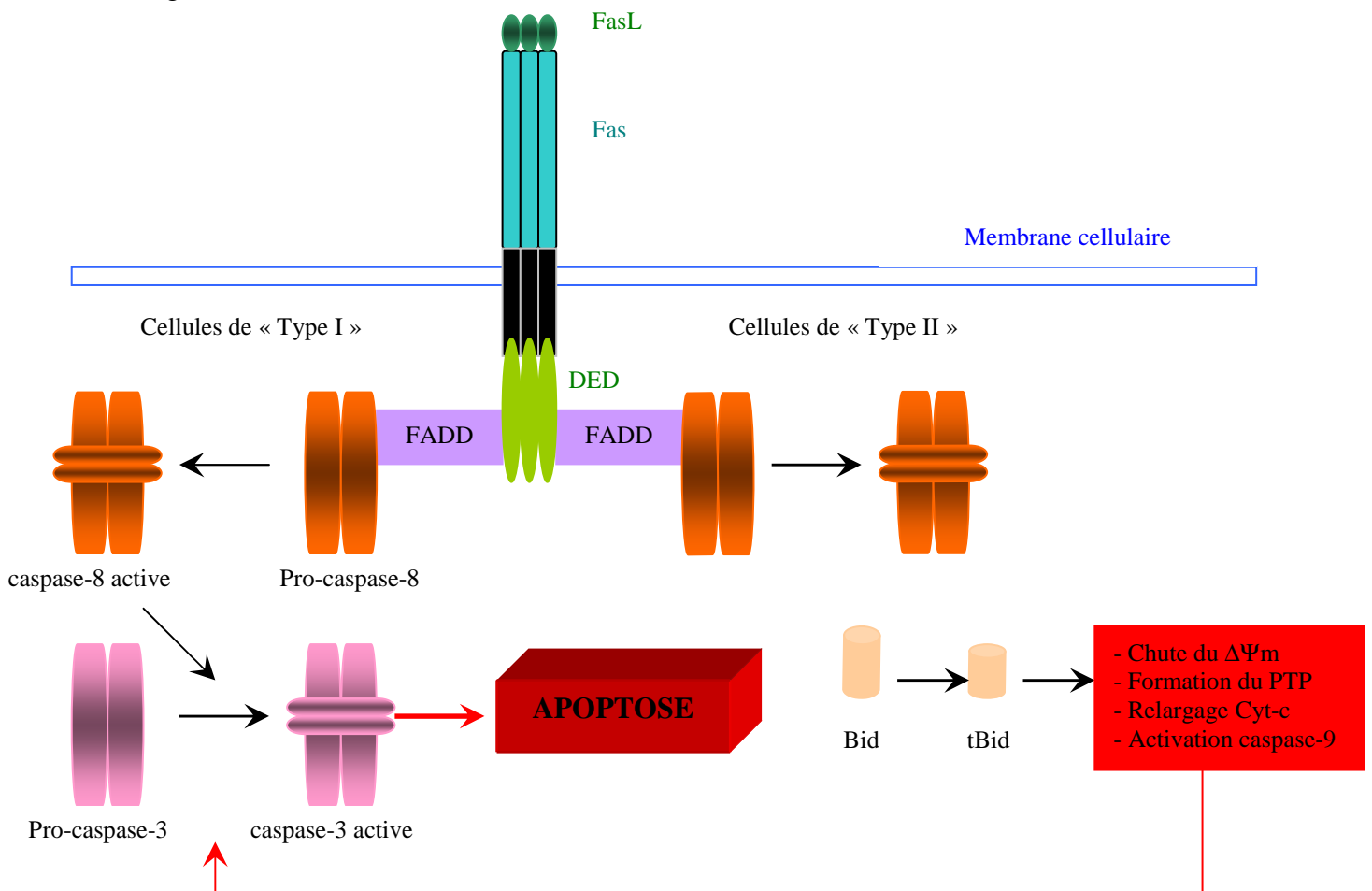


Figure 14 : Représentation de la voie de signalisation de Fas

Parmi les membres de la famille du TNF, **il existe d'autres ligands dont TRAIL** (TNF-Related-Apoptosis-Inducing-Ligand ou Apo2L) découvert récemment. Par fixation sur son récepteur de mort spécifique TRAILR, TRAIL induit l'apoptose principalement dans des lignées cellulaires tumorales mais il est non toxique pour les cellules normales. TRAIL est exprimé de manière constitutive dans un grand nombre de tissus. Ces différences pourraient être dues à l'existence de quatre membres de récepteurs TRAILR 1 à 4, qui seraient capables de transduire différents signaux, apoptotiques ou non, en fonction du type cellulaire (McFarlane, 2003). Les voies de signalisation induites par TRAIL sont très similaires à celles induites par le TNF α ou Fas.

2.3.4. Les caspases : acteurs principaux dans l'étape d'exécution

La première mise en évidence du rôle primordial **des protéases à cystéine ou caspases** (cysteinyll aspartate-specific proteinases ou cystéine aspartate protéases) dans l'étape d'exécution de l'apoptose provient de l'identification, puis du clonage du gène pro-apoptotique *ced-3* chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. Le gène homologue chez les mammifères code pour la protéine ICE (interleukin-1 β converting enzyme), renommée caspase-1. Il existe 14 caspases différentes, variables en fonction de leur poids moléculaires : 32 à 55 Kda ; à l'exception des caspases-11 et -13, elles existent toutes chez l'homme (Le blanc, 2003).

2.3.4.1. Structure et nomenclature

Sous leur forme inactive (zymogène), ces enzymes sont constituées d'un pro-domaine N-terminal, d'une grande sous-unité de 20 Kda portant le site catalytique et d'une petite sous-unité de 10 Kda. Leur clivage en deux étapes successives, libérant d'abord la petite sous-unité p10, puis la grande p20, conduit à la forme active de l'enzyme. Ce clivage protéolytique est déclenché par l'action d'autres caspases ou du granzyme B ou de la caspase elle-même (Nicholson & Thornberry, 1997). La caspase active possède une structure tétramérique : c'est à dire deux hétérodimères composés chacun de l'association des deux sous-unités, et comprenant donc deux sites catalytiques (figure 15).

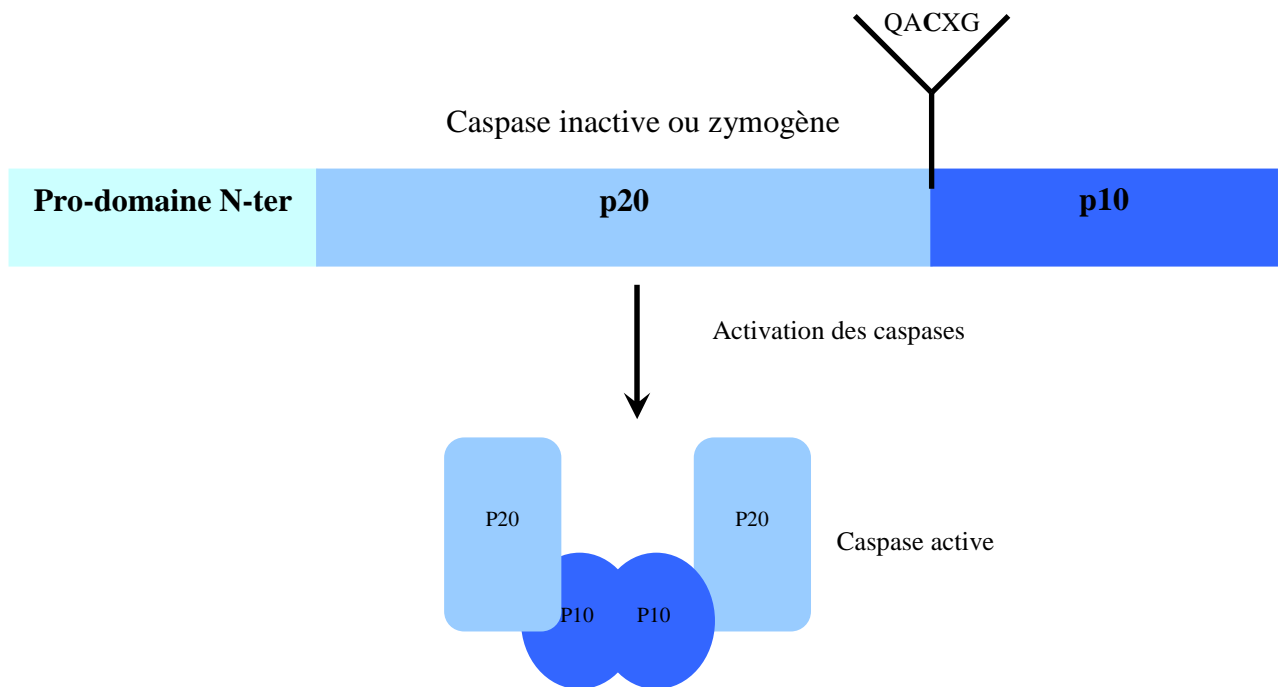


Figure 15 : Représentation schématique du mécanisme d'activation des caspases

Les caspases ont été classées d'après la spécificité de leur substrat ou selon la taille de leur pro-domaine (LeBlanc, 2003). En fonction de la taille de leur pro-domaine on distingue, **les caspases à pro-domaine long** : caspases-2, -8, -9 et -10, et **les caspases à pro-domaine court**: caspases-3, -6 et -7.

Les caspases possédant un pro-domaine long sont les caspases dites initiatrices ou régulatrices. Par exemple, les caspases-8 et -10 possèdent des domaines DED (death effector domain ou domaine effecteur de mort). Alors que, les caspases-1, -2, -4 et -9 possèdent des domaines CARD (CAspase Recruitment Domain) qui permettent leur recrutement au niveau de complexes protéiques puis leur activation. Les caspases initiatrices se situent en amont de la cascade de signalisation. Elles ne participent pas directement à l'apparition des modifications morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose.

Les caspases qui possèdent un pro-domaine court se situent en aval. Ce sont les **caspases exécuteurs ou effectrices.** Les caspases -3, -7 et -6 sont les caspases directement impliquées dans l'exécution de l'apoptose. Leur activation par les caspases initiatrices aboutit à un fonctionnement dit en cascade, phénomène irréversible. L'activation des caspases effectrices conduit au clivage de nombreuses protéines cellulaires, aboutissant aux étapes terminales et ultimes de l'apoptose.

D'autres membres incluant les caspases-1, -4, -5, -11, -12 et -13 sont impliqués dans les processus inflammatoires, principalement dans le clivage protéolytique des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1 et l'IL8 (Amarande-Mendes & Green, 1999).

Les caspases peuvent aussi être classées d'après la spécificité de leur substrat. Le site de liaison du substrat varie d'une caspase à l'autre, il en résulte une spécificité différente pour les substrats (Zimmermann *et al.*, 2001).

L'activation des caspases est retrouvée dans la plupart des mécanismes apoptotiques. L'inhibition de l'activation des caspases par des peptides, des inhibiteurs viraux ou cellulaires, empêchent l'apparition des modifications morphologiques caractéristiques de l'apoptose. Enfin, l'administration de caspases recombinantes dans des systèmes acellulaires induit les changements cytoplasmiques et nucléaires caractéristiques de l'apoptose.

2.3.4.2. Les substrats des caspases

Le site catalytique de ces enzymes comprend un résidu cystéine (C) localisé au centre du motif QACXG (où X= R, Q ou G) (Figure 15).

Les caspases clivent **leur substrat protéique** au niveau d'un résidu aspartique de la partie carboxy-terminale de leur substrat. La spécificité des caspases pour leur substrat est déterminée par la nature du résidu en P2 (position 2) ou P4 du site de clivage dans le substrat.

On connaît à ce jour **plus d'une centaine de substrats des caspases** ; par exemple, la pro-IL-1 β , la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP), des lamines nucléaires, l'unité de 70 Kda de la ribonucléoprotéine U1, la topo-isomérase 1, une protéine kinase dépendante de l'ADN, les SEBP (Sterol Element Binding Protein), l'actine, la fodrine, la protéine kinase C, ainsi que diverses formes inactives de caspases.... L'activation en cascade des caspases permet l'amplification du signal initial. Le clivage du substrat, induit par la caspase, inactive principalement la protéine cible, mais il peut aussi l'activer en clivant un domaine régulateur négatif ou en inactivant une sous-unité régulatrice de ce substrat (Hengartner, 2000). On peut citer l'exemple du clivage protéolytique par la caspase-3 du complexe formé par la Dnase CAD/DFF40 (DNA fragmentation factor) et son inhibiteur iCAD/DFF45. La caspase-3 clive la sous-unité iCAD/DFF45 permettant la libération et l'activation de l'enzyme CAD/DFF40. Cette dernière sera responsable du clivage de l'ADN entre les nucléosomes, générant des

fragments de 180 à 200 pb. La fragmentation de l'ADN responsable du profil en échelle de l'ADN en électrophorèse ou ladders est une des caractéristiques majeures observées au cours de l'apoptose. Le clivage par la caspase-3 de la gelsoline provoque la formation des corps apoptotiques et le clivage de p21-activated kinase-2 et de la fodrine permet la dissociation de la membrane plasmique et du cytosquelette (Zimmermann *et al.*, 2001).

Des protéines naturelles, virales ou de synthèse sont autant de stratégies développées pour élucider ou compliquer les phénomènes. Les principales protéines inhibitrices des caspases ont été décrites précédemment : les IAPs (protéines cellulaires) (2.3.1.2). Les protéines virales et les inhibiteurs de synthèse feront l'objet des paragraphes 3.2 et 3.3.

2.4. La protéine suppresseur de tumeur p53 et l'apoptose

La protéine p53 est souvent décrite comme le « gardien » du génome. Elle intervient pour maintenir l'intégrité du génome lors de nombreuses perturbations cellulaires : lésions génotoxiques, hypoxie, activations d'oncogènes cellulaires ou viraux, anomalies de la concentration en ribonucléotides, etc.... L'activation de p53 conduit à l'arrêt de la progression du cycle cellulaire dont elle régule la phase G1/S, ou à l'apoptose (Levine, 1997). Chez l'homme, 50 % des tumeurs sont dues à des mutations du gène *p53* (Hollstein *et al.*, 1991). p53 joue un rôle important dans le cycle cellulaire ; par exemple, des souris « knock-out » se développent normalement, mais développent des tumeurs comme des souris transgéniques portant un gène p53 muté (Somasundaram & El-Deiry, 2000).

2.4.1. Structure de p53

La protéine p53 est constituée de quatre domaines : le domaine N-terminal essentiel à l'activation transcriptionnelle, un domaine central de liaison à l'ADN, un domaine de tétramérisation et un domaine C-terminal qui régule la liaison de p53 à l'ADN (figure 16) (Somasundaram & El-Deiry, 2000). Le domaine N-terminal interagit avec le complexe TFIID composé de TBP (Tata Binding Protein-TAFs) et TFIIF (Transcription Factor). Ce complexe forme la machinerie transcriptionnelle et régule positivement l'expression des gènes (figure 16). **La protéine p53 active est un tétramère**, son oligomérisation est essentielle à sa fonction de suppresseur de tumeurs.

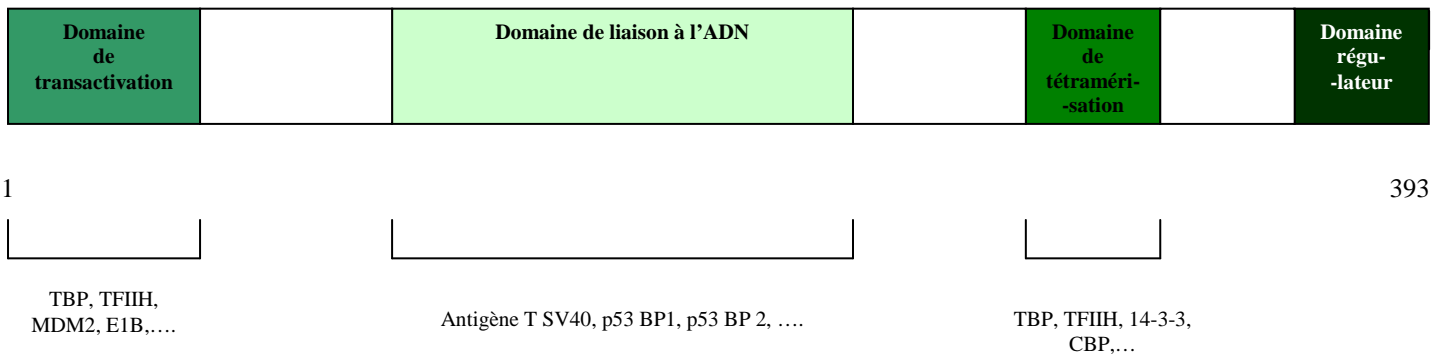


Figure 16 : Structure de la protéine p53 humaine

Les principales mutations de p53 impliquées dans l'apparition de tumeurs sont retrouvées dans le domaine de liaison à l'ADN. Sous la figure, sont répertoriées les principales protéines virales ou cellulaires capables de se lier à p53. Dans la partie C-terminale de la molécule, on retrouve des signaux NES (nuclear export signal) et NLS (nuclear localization signal).

2.4.2. Régulation de p53

La protéine p53 à une durée de vie courte dans la cellule où elle est maintenue à un taux très bas voire indétectable dans les conditions normales. L'ubiquitine ligase MDM2 régule la stabilité de la protéine p53 dans la cellule. Elle se fixe au domaine N-terminal de p53 provoquant sa dégradation par le protéasome. Suite à une exposition à des stimuli apoptotiques, p53 est activée par des modifications post-traductionnelles ce qui augmente sa stabilité et son activité (Levine, 1997). La capacité de liaison de MDM2 est alors fortement diminuée, p53 n'est plus dégradée et sa concentration augmente.

La localisation cellulaire de p53 est aussi régulée, car sa localisation cellulaire dépend de sa fonction. L'import et l'export de p53 dans le noyau sont régulés. Le transport de p53 dans le noyau dépend de son interaction avec les microtubules et la dynéine, moteur moléculaire. Sa translocation dans le noyau est due au signal de localisation nucléaire (NLS) dans sa structure. Son export vers le cytoplasme est régulé par MDM2. En effet, MDM2 transloque du noyau vers le cytoplasme (Ryan *et al.*, 2001).

Les mécanismes d'activation de p53 sont peu connus, mais ils sont aussi régulés notamment par des modifications post-traductionnelles, telles des phosphorylations, déphosphorylations, acétylations, délétion du domaine C-terminal ou addition d'un peptide en

C-terminal. D'autres inconnues restent à élucider, comment la cellule interprète-t-elle les dommages engendrés à l'ADN et comment sont-ils transmis à p53 pour la stabiliser ?

2.4.3. Les fonctions de p53

La protéine p53 active est un facteur de transcription, qui régule l'expression de nombreux gènes *p21*, *MDM2*, *GADD45*, *14-3-3*, *Bax*, *Bcl-2*, *DR5*, *NOXA*, *PUMA* dont les produits de gènes interviennent à différents stades du cycle cellulaire et/ou des voies apoptotiques (figure 17).

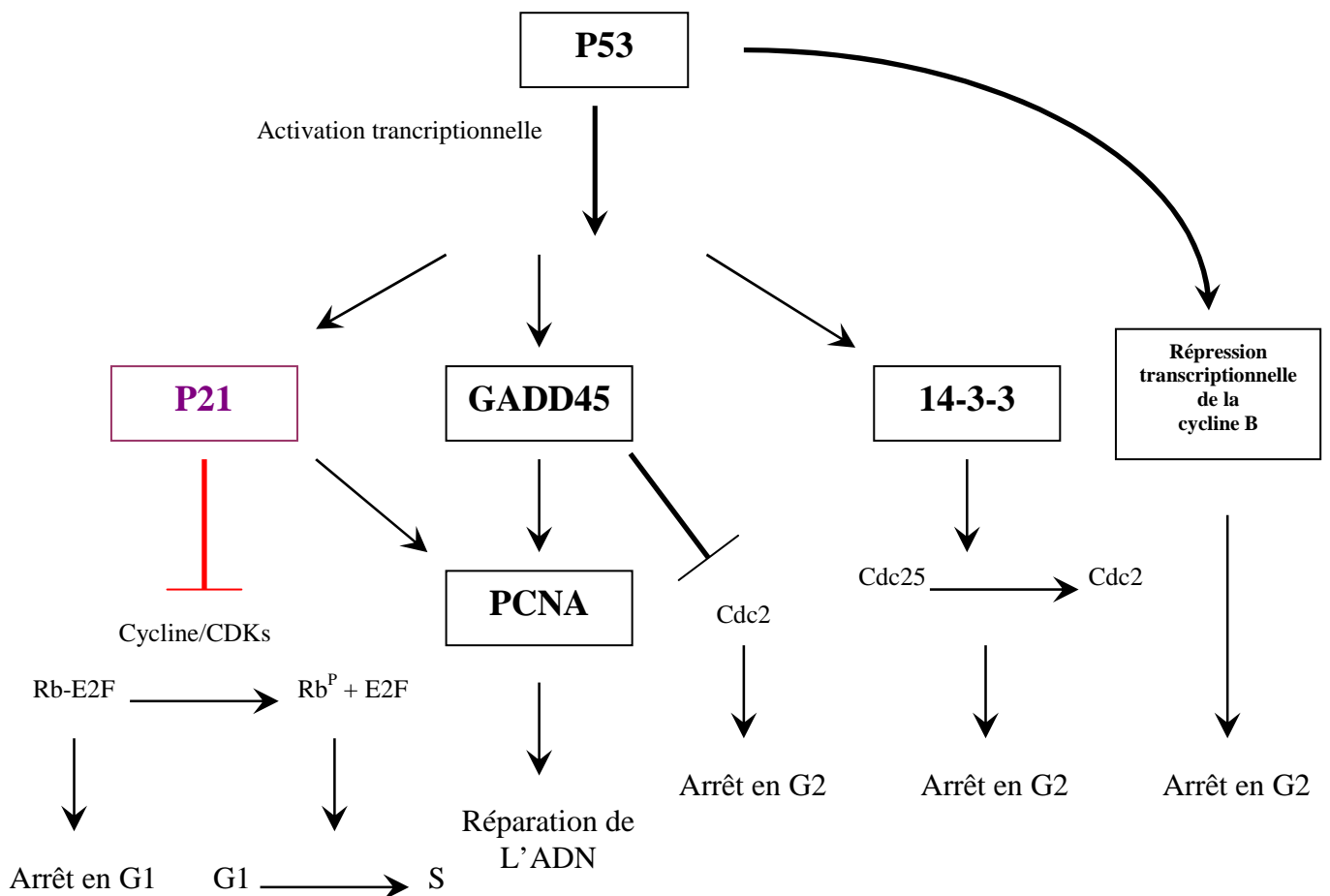


Figure 17 : régulation du cycle cellulaire par p53

P53 possède aussi des fonctions pro-apoptotiques indépendantes de sa fonction transcriptionnelle, mais dont les mécanismes d'action sont mal connus aujourd'hui (Ryan *et al.*, 2001). P53 pourrait provoquer la relocalisation des récepteurs de mort à la surface des cellules (Bennett *et al.*, 1998) ; elle aurait aussi un rôle direct au niveau de la mitochondrie

(Marchenko *et al.*, 2000) où elle pourrait réguler la transcription de gènes par liaison directe avec l'extrémité 5' non transcrite des ARNm (Miller *et al.*, 2000).

2.4.3. Quelques cibles de p53

Le tableau suivant est une liste non exhaustive des principales cibles transcriptionnelles de la protéine p53. L'activation de certaines cibles permet l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN endommagé alors que d'autres cibles sont activées dans le but d'induire l'apoptose. Certaines cibles telles que p21 ont un rôle dual soit d'inhibiteur soit d'inducteur d'apoptose (Gartel & Tyner, 2002). Les interactions moléculaires de la protéine cible avec d'autres protéines cellulaires ou avec p53 sont mentionnés dans le tableau 2 (d'après Somasundaram & El-Deiry, 2000); certaines sont parfois inconnues.

Gènes	Interactions moléculaires	Effets
<i>p21WAF1/CIP1</i>	Cyclin-Cdks et PCNA	Arrêt en G2/M et G1 Apoptose
<i>MDM2</i>	p53	Inhibe l'activation de p53 Permet le dégradation de p53
<i>GADD45</i>	Cdc2 et PCNA	Arrêt en G2/M et réparation de l'ADN
<i>14-3-3 σ</i>	Phosphoryle Cdc25	Inhibe la déphosphorylation de Cdc25 et l'activation de Cdc2 par Cdc25 Arrêt en G2/M
<i>B99</i>	inconnues	Arrêt en G2
<i>Cycline G</i>	inconnues	Arrêt de la prolifération
<i>Bax</i>	Translocation vers la mitochondrie et relargage du Cyt-c	APOPTOSE
<i>IGF-BP3</i>	Se lie à IGF1 et inhibe la voie des facteurs de croissance	APOPTOSE
<i>FAS/APO1</i>	Active la voie extrinsèque	APOPTOSE
<i>KILLER/DR5</i>	Active la cascade des caspases	APOPTOSE
<i>PIG1-PIG14</i>	Stress oxydatif	APOPTOSE
<i>PAG608</i>	Stress oxydatif	APOPTOSE
<i>TSP1</i>	inconnues	Inhibition de l'angiogénèse
<i>BAlI</i>	inconnues	Inhibition de l'angiogénèse
<i>GD-AIF</i>	inconnues	Inhibition de l'angiogénèse

Tableau 2 : Les cibles transcriptionnelles de p53

La protéine p53 induit l'apoptose en sur-régulant des gènes impliqués dans différentes voies apoptotiques. Elle sur-exprime Bax et sous-régulerait Bcl-2. Elle agit donc indirectement en modulant la voie intrinsèque mitochondriale, mais intervient aussi sur la voie extrinsèque par régulation des gènes *Fas* et *DR5*.

2.4.4. Interactions entre p21 et p53

La protéine p21 (nommée aussi WAF1, CAP20, Cip1 et Sdi1) fait partie de la famille des CKIs (Cyclin Kinase Inhibitor) qui comprend également les protéines p27 et p57. Ces trois CKIs contiennent une région C terminale variable et une région N-terminale conservée indispensable à l'inhibition des complexes cyclines/CDK (cyclin dependant kinase). Ces complexes régulent la progression du cycle cellulaire : ils phosphorylent et inactivent les protéines Rb (Retinoblastome), des régulateurs négatifs de la progression dans les phases G1 et S du cycle cellulaire et induisent l'expression des gènes régulés par le facteur de transcription E2F et ainsi la prolifération cellulaire. Par liaison aux complexes cyclines/CDK, les CKIs inhibent leur activité, et empêchent la progression dans les différentes phases du cycle cellulaire (figure 18).

La protéine p21 joue un rôle essentiel dans l'arrêt du cycle cellulaire lorsque l'ADN cellulaire est modifié ou fragmenté et sa surexpression provoque l'arrêt du cycle en G1 et G2 ou en S.

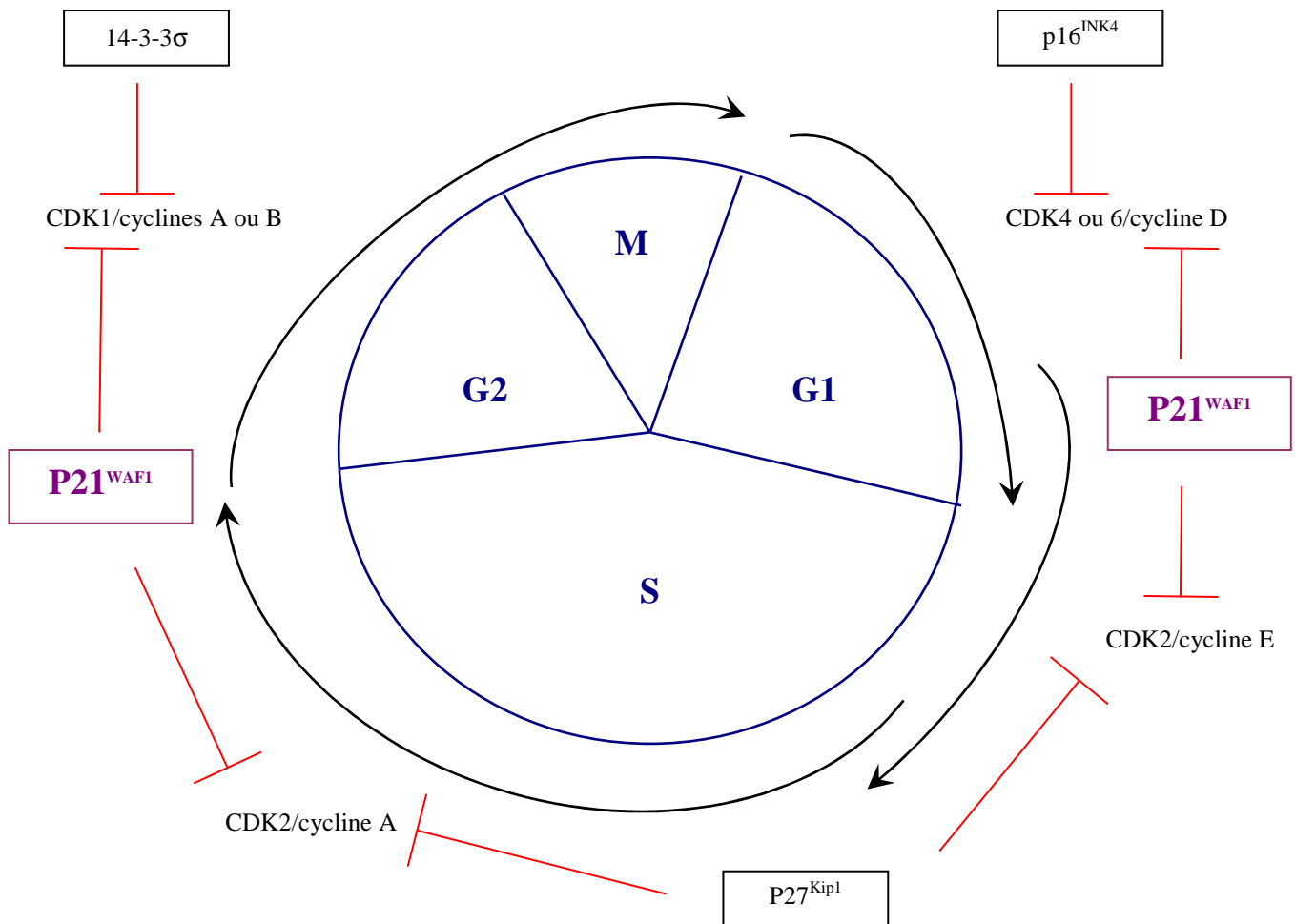


Figure 18 : Représentation schématique du cycle cellulaire (Luch, 2002)

L'intervention exacte de p21 dans l'apoptose est controversée : elle dépendrait du signal inducteur. Certains auteurs lui attribuent des propriétés pro-apoptotiques (Lincet *et al.*, 2000 ; Kang *et al.*, 1999) alors que d'autres décrivent p21 comme un inhibiteur d'apoptose dépendant ou indépendant de p53 (Gartel & Tyner, 2002). **La protéine p21 serait comme un régulateur négatif de l'apoptose-dépendante de p53** en réponse aux irradiations ou à des traitements chimiques (Gartel & Tyner, 2003) **et -indépendante de p53**, en réponse à des signaux tels que le TGF-β, le TNFα ou l'IFNγ.

Le rôle principal de p21 est de permettre l'arrêt du cycle cellulaire et d'empêcher l'apoptose mais il apparaît aujourd'hui dans la bibliographie que **p21 pourrait aussi avoir des fonctions pro-apoptotiques**. La fonction apoptotique de p21 a été observée dans des thymocytes où la surexpression de p21 augmente l'apoptose-induite par des radiations ionisantes, mais également dans des cellules de tumeurs mammaires déficientes en p53. Dans des lignées hépatiques humaines Hep3B déficientes en p53, la surexpression de p21

provoque l'induction de Bax modulant ainsi le rapport Bcl2/Bax. L'expression de p21-indépendante de p53 est observée après la liaison de Fas sur son récepteur dans des lymphocytes T alors que dans des thymocytes déficients en p21, on observe une baisse de l'apoptose Fas-dépendante (Gartel & Tyner, 2003). Ainsi, p21 serait capable de provoquer l'apoptose dans certains types cellulaires : c'est la surexpression de p21 qui serait responsable du processus apoptotique. Le mécanisme par lequel p21 pourrait induire l'apoptose est encore très vague ; p21 pourrait interagir avec des composants de la machinerie de réparation de l'ADN.

2.5. Implication du réticulum endoplasmique dans l'apoptose

La mitochondrie n'est pas le seul organite intracellulaire impliqué dans l'apoptose. Le **réticulum endoplasmique (RE)** intervient dans **la rétention du calcium intracellulaire et le maintien de l'homéostasie calcique**. Il est essentiel à la survie de la cellule et toute perturbation de sa fonction induit l'apoptose. Les facteurs capables de perturber son fonctionnement sont rassemblés sous le terme « ER stress ». Ces stress incluent l'inhibition de la glycosylation des protéines, la réduction de la formation des ponts di-sulfures protéiques, la chute du calcium intra-RE ou le blocage du transport des protéines du RE à l'appareil de Golgi.

Le mécanisme déclencheur de l'apoptose dépendante du RE n'est pas clairement identifié mais il impliquerait le calcium et la caspase-12 (Oyadomari *et al.*, 2002).

Trois mécanismes d'induction apoptotique par le RE sont décrits aujourd'hui :

- ❖ **le premier** implique le **facteur de transcription CHOP** (C/EBP homologous protein)/GADD153. Ce facteur n'est pas ou peu exprimé dans les conditions physiologiques ; mais suite à un stress, sa surexpression provoque l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Wang *et al.*, 1996 ; Barone *et al.*, 1994). Il active aussi l'expression d'un certain nombre de gènes appelés DOCs (DOWnstream of CHOP) dont celui de la carbonic anhydrase VI, celle-ci activerait l'apoptose *via* une augmentation intracellulaire de la concentration en protons et une diminution du pH intracellulaire (Sok *et al.*, 1999). La fonction du facteur pro-apoptotique Bax est élevée à bas pH. Des fibroblastes déficients en Bax et Bak sont résistants au stress du RE, suggérant l'implication de Bax et Bak dans l'apoptose *via* le RE (Wei *et al.*, 2001). McCullough *et al.* (2001) ont montré que CHOP sous-régule Bcl-2 et augmente la production des ROS.

- ❖ **Le second mécanisme** s'effectue par **l'activation de la kinase c-JUN (JUNK)**, enzyme décisionnelle du sort de vie ou de mort. Elle serait activée via IRE1 α ou IRE1 β (type I transmembrane endonuclease localized in the RE). L'endonuclease IRE1 se lie à la protéine adaptatrice TRAF2 facilitant le recrutement des deux protéines p38 et ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase) ce qui entraîne l'apoptose (Urano *et al.*, 2000 ; Tobiume *et al.*, 2001).

- ❖ **Le troisième mécanisme met en jeu la caspase-12** localisée sur la face cytosolique du RE. Cette caspase serait activée suite à des stress au niveau du RE et non par les voies apoptotiques extrinsèques et intrinsèques. La caspase-12 serait activée par la m-calpain, par IRE1 α /TRAF2 et par la caspase-7 (Nakagawa & Yuan, 2000 ; Yoneda *et al.*, 2001 ; Rao *et al.*, 2001). La m-calpain (cytosolic calcium-activated neutral cysteine endopeptidase) activée serait responsable du clivage de la pro-caspase-12 et de Bcl-X_L. Une augmentation de calcium cytosolique activerait alors la caspase-12. La protéine TRAF2 pourrait recruter et activer la caspase-12 (Yoneda *et al.*, 2001) et la translocation de la caspase-7 au niveau du RE est décrite suite à un stress du RE (Rao *et al.*, 2001), elle pourrait donc activer, par clivage, la caspase-12.

Le relargage du calcium du RE à l'intérieur du cytosol est un phénomène déclenchant l'apoptose (Hajnoczky *et al.*, 2003). De nombreuses enzymes cytoplasmiques impliquées dans l'apoptose sont calcium-dépendantes comme les endonucléases, la calpain et la calcineurine. En plus du clivage de la caspase-12 et de Bcl-X_L, la calpain cliverait Bid et Bcl-2. La calcineurine déphosphorylerait Bad qui transloque vers la mitochondrie pour s'associer à Bcl-X_L. La propagation du calcium vers la mitochondrie stimule la production d'ATP par l'activation des déshydrogénases calcium-dépendantes ; une quantité excessive de calcium au niveau de la mitochondrie provoque l'apoptose en stimulant le relargage des protéines apoptogènes et en produisant des ROS (Smaili *et al.*, 2003).

L'apoptose induite par le calcium est aussi régulée par les membres de la famille de protéines Bcl-2 qui agissent sur la perméabilité des membranes du RE. La surexpression de Bcl-2 empêche un relargage trop important de calcium et régule la concentration calcique à l'intérieur du RE, alors que la surexpression de Bak ou Bax induit un relargage de calcium ; ainsi il pourrait y avoir une redistribution précoce de Bax et Bak au niveau des membranes du RE lors de l'apoptose (Hajnoczky *et al.*, 2003).

2.6. Lentivirus et apoptose

En agissant sur les mécanismes de mort cellulaire programmée, les virus ont développé des stratégies pour échapper au système immunitaire et faciliter leur dissémination au cours de l'infection (Barber, 2001).

L'apoptose précoce d'une cellule infectée par un virus peut constituer un mécanisme de défense de l'hôte ; elle permet de limiter le nombre de particules virales libérées en interrompant la réplication virale. Les endonucléases cellulaires produites au cours de l'apoptose peuvent agir sur l'ADN viral et inhiber la synthèse des protéines virales, structurales et régulatrices et la formation de particules virales infectieuses limitant ainsi la dissémination des virions chez l'hôte.

Ainsi certains virus retardent ou inhibent la mort de la cellule hôte, facilitant une production plus importante de virions. La suppression des voies apoptotiques cellulaires peut entraîner une persistance et une latence virale. Certains virus sont capables d'induire l'apoptose à une phase tardive de l'infection. Cette stratégie permet la propagation des virions dans les cellules voisines tout en échappant à la réponse inflammatoire et immunitaire de l'hôte (Everett & McFadden, 1999).

Parmi les lentivirus seuls le HIV, le SIV, le FIV (Bishop *et al.*, 1993), le CAEV et le VMV sont capables d'induire l'apoptose chez leur hôte naturel. Le HIV induit l'apoptose de la plus grande partie de la population lymphocytaire *in vitro* et *in vivo*. A propos des CAEV et VMV, quelques études seulement *in vitro* ont montré que ces deux rétrovirus animaux induisaient l'apoptose (Gendelman *et al.*, 1997 ; Duval *et al.*, 2002a, 2002b).

2.6.1. HIV et apoptose

Le virus HIV a la particularité de s'attaquer à une cellule clé du système immunitaire, le lymphocyte T auxiliaire, qui exprime à sa surface la molécule CD4, récepteur spécifique du HIV.

Au travers des cytokines qu'ils synthétisent, les lymphocytes T CD4 aident les effecteurs de l'immunité naturelle, telles les cellules NK (natural killer), les lymphocytes T $\gamma\delta$ et les macrophages, à détruire les cibles infectées par le virus. Ils sont aussi nécessaires à l'activation et la maturation des lymphocytes B en cellules productives d'anticorps ; ces derniers sont requis pour la différenciation des lymphocytes T CD8 en cellules cytotoxiques (CTL) spécifiques du HIV et ils représentent une source de chimiokines, inhibant l'entrée du virus par la cible T CD4. En conséquence, la disparition progressive des lymphocytes T auxiliaires dépendante du HIV, conduit à un défaut de contrôle par le système immunitaire de la réplication virale, à la destruction des organes lymphoïdes où a lieu la réponse immunitaire, et à l'apparition du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Les mécanismes

responsables de la disparition des lymphocytes T CD4 au cours de l'infection par le HIV sont complexes et ne sont que partiellement élucidés. Malgré le développement d'une réponse immunitaire et en absence de traitement, le virus persiste à un niveau élevé dans le sang et les organes lymphoïdes des patients, et détruit progressivement les défenses immunitaires.

La destruction des lymphocytes T CD4 est due soit directement à l'infection virale soit indirectement par l'intermédiaire de l'activation par les protéines du HIV de **certaines voies pro-apoptotiques dans les lymphocytes non infectés**. L'infection, *in vitro*, de lymphocytes T CD4 est associée à un effet cytopathologique qui induit **la mort par apoptose des cellules infectées**. En effet, des lymphocytes périphériques de patients HIV-positifs sont anormalement programmés pour une mort par apoptose, déclenchée après une culture à court-terme. La quantité de cellules qui meurent est beaucoup plus élevée que le nombre de cellules T infectées de façon productive (< 0,1%). Chez un grand nombre de patients, l'excès d'apoptose concerne toutes les populations lymphocytaires (T CD4, T CD8 et B), et le degré d'apoptose est corrélé à l'évolution de la maladie (Gougeon *et al.*, 1996). Dans les ganglions, site important de la réplication virale, l'apoptose lymphocytaire est élevée par rapport à des sujets sains témoins (Amendola *et al.*, 1996) ; le plus surprenant est que **les cellules infectées de façon productive sont peu apoptotiques et les cellules apoptotiques sont rarement infectées** (Finkel *et al.*, 1995). Ces observations suggèrent que le HIV active des mécanismes directs mais aussi indirects pour détruire les lymphocytes par apoptose.

Dans l'apoptose induite par le HIV, il existe plusieurs mécanismes :

- ❖ l'apoptose directe des cellules infectées par le HIV suite à l'expression des gènes viraux ;
- ❖ la mort des cellules non infectées appelées « Bystander cells » par les protéines proapoptotiques libérées par les cellules infectées ;
- ❖ la mort des cellules immunitaires par recrutement au niveau des organes lymphoïdes infectés ;
- ❖ l'intervention de ACAD (Activated T-Cell Autonomous Death) et de AICD (activation-Induced Cell Death) : ces deux mécanismes d'induction d'apoptose ont été mis en évidence dans des cultures de lymphocytes T du sang périphérique de patients infectés par le HIV. ACAD est induit par les membres de la famille de protéines Bcl-2 et intervient spontanément en culture en absence de tout stimulus exogène. AICD est un mécanisme dépendant des récepteurs de mort qui intervient

ex vivo dans les cellules T de patients infectées par le HIV traitées, par exemple, par des agents mitogènes ;

- ❖ l'apoptose des syncytia issus de la fusion de cellules infectées exprimant à leur surface la protéine gp120 avec une cellule non infectée exprimant le récepteur CD4 ou le co-récepteur CXCR4.

2.6.1.1. Les mécanismes de régulation de l'apoptose dans les cellules infectées par le HIV : les voies directes

L'apoptose des cellules directement infectées par le HIV concerne un faible pourcentage de l'apoptose totale observée (Finkel *et al.*, 1995). L'apoptose des cellules infectées dépend principalement de la réplication du virus avec la synthèse des nombreuses protéines virales qui y sont impliquées : **gp120, Tat, Vpr, la protéase et Nef** (tableau 3).

Les deux voies apoptotiques principales intrinsèque et extrinsèque sont les cibles des protéines virales du HIV. Certaines agissent surtout *via* la voie intrinsèque mitochondriale, c'est le cas de Vpr et de la protéase virale ; alors que d'autres agissent par activation des deux voies : gp120, Tat et Nef.

Le mécanisme de la gp120 est le mieux connu, principalement par son action sur la voie des récepteurs de mort. La liaison de la gp120 aux récepteurs CD4 active la voie de Fas (Banda *et al.*, 1992) et induit aussi la sous-régulation de Bcl-2 (Hashimoto *et al.*, 1997), la libération du Cyt-c et l'apoptose. Vpr et Tat agissent essentiellement sur la voie intrinsèque. Vpr provoque une chute rapide du potentiel transmembranaire mitochondriale, un relargage du cytochrome c et l'apoptose (Jacotot *et al.*, 2000). Elle pourrait aussi se lier directement au translocateur mitochondrial ANT (Muthumani *et al.*, 2003). Tat provoque l'apoptose par la sous-régulation du facteur anti-apoptotique Bcl-2 (Sastry *et al.*, 1996), et en sur-régulant la caspase-8 (Bartz & Emerman, 1999). La dégradation protéolytique de Bcl-2 est observée suite à l'activation de la caspase-8 par la protéase du HIV (Strack *et al.*, 1996) (figure 19).

Protéines du HIV	Mécanismes d'action sur l'apoptose
gp120	Activation des caspases (surtout caspases-3 et -6) ↓ de l'expression de Bcl-2 et ↑ de l'expression de Bax ↑ de l'expression de Fas et FasL Perte du $\Delta\Psi_m$
Tat	↑ de l'expression de Fas et FasL ↑ de l'expression de la caspase-8 ↓ de l'expression de Bcl-2 et ↑ de l'expression de Bax ↑ de l'expression de TRAIL ↑ de l'expression de Par-4 ↓ du $\Delta\Psi_m$ ↓ de la production de SOD2 ↑ de la production de ROS
Vpr	↓ du $\Delta\Psi_m$ Libération de Cyt-c et AIF Activation des caspases Arrêt du cycle cellulaire en G2/M Découplage de la chaîne de transport d'électrons Baisse de la phosphorylation oxydative ↓ de l'activité de NF- κ B
Protéase	Clivage de Bcl-2 Activation des caspases-8, -9 et -3 Relargage du Cyt-c ↑ de l'expression de FasL
Nef	↑ de l'expression de FasL ↓ de l'expression de Bcl-2 et Bcl-X _L ↓ du $\Delta\Psi_m$ Activation de la caspase-3 Clivage de PARP
Facteur viral inconnu	↑ de l'expression et de la phosphorylation de p53
ARN du HIV	↓ du $\Delta\Psi_m$

Tableau 3 : Mécanismes d'apoptose proposés dans les cellules infectées par HIV

2.6.1.2. Les mécanismes de régulation de l'apoptose dans les syncytia

L'effet cytopathologique du HIV se manifeste par l'apparition de syncytia. La fixation de la gp120 exprimée à la surface des cellules infectées aux récepteurs CD4 ou co-récepteurs (CXCR4) de cellules non infectées induit la formation de syncytia qui vont entrer en apoptose. L'apoptose des syncytia est indépendante de Fas et du TNFR1 (Ohnibus & Jassoy, 1997) mais dépendante de la voie mitochondriale (Ferri *et al.*, 2000b). Ce mécanisme est initié par la surexpression du complexe cyclin B/CDK1 et la translocation nucléaire de MTOR (Mammalian Target of Rapamycin) (Castedo *et al.*, 2002). Cette translocation nucléaire provoque la phosphorylation de p53 au niveau d'une sérine spécifique : la sérine 15. Cette phosphorylation active p53 entraînant la sur-régulation transcriptionnelle de Bax et l'activation de la voie mitochondriale. L'insertion de Bax dans la mitochondrie provoque la libération du Cyt-c, l'activation des caspases et l'apoptose. Ce mécanisme apoptotique est associé à l'induction de la voie indépendante des caspases *via* le relargage de l'AIF de la mitochondrie suite à la chute du $\Delta\Psi_m$ (Ferri *et al.*, 2000b). Dans les syncytia, les voies apoptotiques prédominantes sont la voie intrinsèque et la voie caspase-indépendante (figure 19).

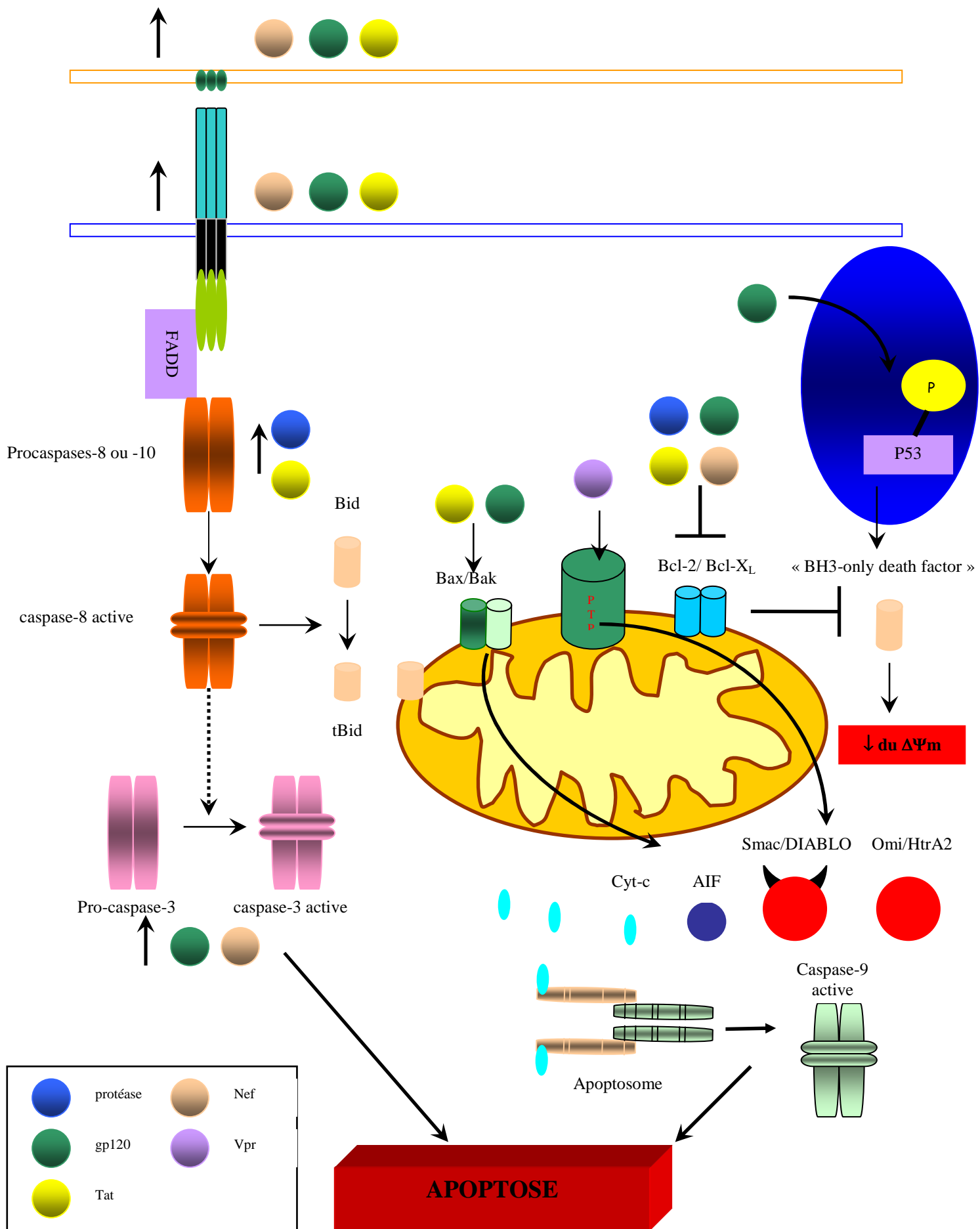


Figure 19: Apoptose dans les cellules infectées et les syncytia

2.6.1.3. L'apoptose dans les cellules « Bystander » : les voies indirectes

L'influence du HIV sur la voie extrinsèque est décrite dans les cellules « Bystander ». *In vivo*, les lymphocytes CD4 sont capables de sur-réguler le ligand de Fas (Fas-L) suite à une infection directe par le virus ou par l'effet de protéines virales comme gp120, tat et Nef (tableau 4). Ces protéines sont alors capables de détruire indirectement les cellules exprimant le récepteur Fas, sans qu'elles soient infectées par le HIV. *In vitro*, des lymphocytes CD4 exprimant le ligand FasL peuvent provoquer l'apoptose des lymphocytes CD8 indépendamment d'une reconnaissance antigénique (Piazza *et al.*, 1997).

Protéines du HIV	Mécanismes d'action sur l'apoptose
gp120	Activation des caspases (surtout caspase-3) ↓ de l'expression de Bcl-2 et ↑ de l'expression de Bax ↑ de l'expression de Fas et FasL Perte du $\Delta\Psi_m$
Tat	Induit l'apoptose ↑ de l'expression de Fas dans les lymphocytes B
Vpr	↓ du $\Delta\Psi_m$ Libération de Cyt-c et AIF Activation des caspases Arrêt du cycle cellulaire en G2/M Découplage de la chaîne de transport d'électrons Baisse de la phosphorylation oxydative
Nef	↑ de l'expression de FasL ↑ de l'expression de TRAIL ↓ de l'expression de Bcl-2 et Bcl-X _L ↓ du $\Delta\Psi_m$ Activation de la caspase-3 Clivage de PARP
Cytokines/chimiokines	↑ de IL-10, ↓ du TNF α

Tableau 4 : Mécanismes d'apoptose proposés dans les cellules non-infectées
(d'après Phenix & Badley, 2002)

De même la protéine tat, libérée par les cellules infectées, provoque la surexpression de Fas et FasL par les cellules non infectées, ce qui augmente leur sensibilité à l'apoptose *via* la voie dépendante du récepteur Fas (Li *et al.*, 1995).

D'autres protéines virales modulent la voie intrinsèque mitochondriale. C'est le cas de la protéine Vpr qui provoque la chute du potentiel mitochondrial transmembranaire et la libération du cyt-c dans des cellules intactes (Jacotot *et al.*, 2000).

La mort des cellules « Bystander » peut aussi être provoquée dans les macrophages : la liaison de la gp 120 au récepteur CXCR4, exprimé par les macrophages, entraîne la production de TNF qui provoque alors l'apoptose des lymphocytes CD8 *via* le TNFR2 (Herbein *et al.*, 1998).

Tous ces exemples suggèrent que le HIV sait manipuler habilement la machinerie apoptotique aboutissant à la destruction du système immunitaire. On ne sait pas exactement aujourd'hui si les protéines virales agissent de la sorte sur les cellules « Bystander » *in vivo* (Gougeon, 2003).

2.6.1.4. La régulation négative de l'apoptose par les protéines virales du HIV

La régulation de l'apoptose par le HIV est très complexe, car il développe également des mécanismes de blocage de l'apoptose (tableau 5). Il persiste à l'état latent dans les cellules où l'apoptose est bloquée. Le contrôle des mécanismes d'apoptose permet au virus de détruire le système immunitaire de son hôte et de lui échapper.

Protéines du HIV	Mécanismes de suppression de l'apoptose
Tat	↑ de l'expression de Bcl-2 ↓ de l'expression de p53
Vpr	↑ de l'expression de Bcl-2 ↓ de l'expression de Bax
Nef	↑ de l'endocytose de CD4 <i>Downregulation</i> du TCR ↓ de l'expression de MHC Inhibition de prolifération à l'IL2
Vpu	Dégradation de CD4

Tableau 5 : Mécanismes de suppression de l'apoptose mis en jeu dans les cellules non infectées (Gougeon, 2001)

2.6.2. VMV, CAEV et apoptose

A notre connaissance la seule observation qui a montré l'induction de l'apoptose par le CAEV, *in vitro*, date de 1997 (Gendelman *et al.*, 1997). L'infection des cellules de

membrane synoviale de chèvre (GSM) par le CAEV se caractérise par la condensation de la chromatine et l'apparition des corps apoptotiques. Le pourcentage de cellules en apoptose après infection n'excède pas 24%, dans des cellules de GSM ou des cellules de poumon (cellules tahr). La fragmentation de l'ADN a été mise en évidence par la présence de « ladders » par électrophorèse de l'ADN des cellules infectées et la technique TUNEL (Terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling), qui permet de visualiser spécifiquement par marquage *in situ* les extrémité 3'-OH de l'ADN fragmenté. La cytométrie en flux et l'analyse de la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire ont permis de mettre en évidence la présence d'un pic sub-G1 dans les cellules de poumons infectées par le CAEV. Ce pic correspond aux cellules en apoptose et le pourcentage de cellules en sub-G1 croît avec le temps d'infection (Gendelman *et al.*, 1997). Ces auteurs suggèrent que le faible taux d'apoptose obtenu dans les cultures infectées serait dû à la présence d'une population hétérogène à savoir cellules infectées et non infectées, et que ces deux populations pourraient répondre différemment à l'apoptose.

Les premières études concernant l'apoptose induite, *in vitro*, par le rétrovirus VMV sont très récentes et ont été mises en évidence au sein de notre laboratoire de Microbiologie (Duval, 2003).

Les modifications morphologiques caractéristiques ont été observées telles que la condensation et la fragmentation de la chromatine. Lors de l'infection des cellules primaires de PC par la souche Visna, les cellules apoptotiques détectées sont soit des cellules individuelles soit des syncytia (Duval *et al.*, 2002b). Par la technique de TUNEL, les cellules individuelles et les syncytia présentent une fragmentation chromatiniennne. Ces premiers résultats permettent de dire que **l'infection *in vitro* par le virus Visna induit l'apoptose** (Duval *et al.*, 2002b). La cinétique de libération d'une **activité lactate déshydrogénase (LDH)** a montré un maintien de l'intégrité membranaire jusqu'à une libération tardive correspondant à une nécrose secondaire due à l'absence de phagocytose dans un système *in vitro* (Duval *et al.*, 2002a). La principale voie apoptotique jusque là démontrée est celle de **la cascade des caspases** (Duval *et al.*, 2002a) par la mise en évidence de l'activation des caspases-3, -8 et -9. La PARP (poly ADP ribose Polymerase), substrat de la caspase-3, n'est pas clivé dans notre modèle. D'autres auteurs ont décrit ce même phénomène avec le HIV-1 (Taddeo *et al.*, 2000). Une activité PARP fonctionnelle est nécessaire pour la production de particules rétrovirales, notamment lors de la formation du

provirus (Gäken *et al.*, 1996). Grâce à l'utilisation d'inhibiteurs irréversibles des caspases, on a aussi prouvé que l'apparition de l'effet cytopathologique (ECP) du virus Visna est retardée. L'activation des caspases-3, -8 et -9 conduit à l'ECP induit par le virus Visna, au processus de mort cellulaire conjointement à une diminution du titre viral et à la multiplication ou la libération des particules virales (Duval *et al.*, 2002a).

Les lentivirus sont capables de manipuler la machinerie apoptotique à leur avantage soit en inhibant l'apoptose, soit en l'activant. L'apoptose des cellules du système immunitaire conduit, dans le cas de l'infection par le HIV, à la destruction complète des effecteurs du système immunitaire par des actions directes et indirectes, très complexes. Il en résulte l'apparition d'infections opportunistes qui conduisent à plus ou moins long terme à la mort du patient. Si les mécanismes d'action du HIV sur la modulation de l'apoptose sont de mieux en mieux connus, il est intéressant de rechercher les effets de molécules antirétrovirales sur l'apoptose.

3. LES INHIBITEURS POTENTIELS DE L'APOPTOSE

VIRO-INDUITE

Il existe dans la cellule des gènes codant des protéines potentiellement anti-apoptotiques ainsi que dans le génome de certains virus. Les inhibiteurs de l'apoptose, drogues, inhibiteurs de caspases ou cytokines, ont fait l'objet de nombreuses recherches dans le but de modifier l'évolution des pathologies. Dans ce chapitre, nous avons choisi quelques exemples représentatifs mais non exhaustifs.

3.1. Les antirétroviraux

Les acquis récents en matière de thérapeutique antirétrovirale ont bouleversé favorablement le pronostic et le déroulement de la maladie à HIV. L'objectif du traitement est de limiter la propagation des virus et ainsi de prolonger l'espérance de vie et le confort des malades.

Deux enzymes sont actuellement la cible des traitements antirétroviraux : l'une, **la reverse transcriptase**, agissant au tout début du cycle répliatif rétroviral avant l'intégration de l'ADN viral dans l'ADN de la cellule hôte, et l'autre, **la protéase**, agissant à la fin du cycle, lors de la maturation des protéines virales nouvellement synthétisées. Les molécules antivirales aujourd'hui disponibles sont toutes des inhibiteurs de la reverse transcriptase ou de la protéase du HIV. Des molécules ciblant d'autres étapes de la multiplication virale sont en cours d'essais, comme par exemple les inhibiteurs de la fusion qui bloquent la pénétration du virus dans la cellule, des inhibiteurs de récepteurs ou co-récepteurs ou des oligonucléotides anti-sens ou des inhibiteurs de l'intégrase (tableau 9, figure 21).

3.1.1. Les inhibiteurs nucléosidiques de la reverse transcriptase, un exemple: l'AZT

Les inhibiteurs de la reverse transcriptase sont des analogues nucléosidiques ou INTI (inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse), des analogues non nucléosidiques ou INNTI (inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse) et des analogues nucléotidiques (tableaux 6, 7 et 8).

Les inhibiteurs nucléosidiques entrent en compétition avec les nucléosides naturels sur le site actif de la reverse transcriptase et bloquent l'élongation de l'ADN viral, ce sont des terminateurs de chaîne. Ils sont actifs sur le HIV-1 et le HIV-2.

Le 3' azido-2',3'-déoxythymidine, AZT, zidovudine, ou azidothymidine (RETROVIR[®]) (figure 20) a été le premier antirétroviral utilisé pour lutter contre l'infection à HIV. Il a été pendant longtemps le seul traitement proposé. Sa prescription en monothérapie a été vite abandonnée au profit d'association d'antirétroviraux. Cette molécule avait été initialement développée dans le cadre de la recherche de nouveaux agents antimitotiques, mais son efficacité s'est révélée peu intéressante.

DCI	Mécanisme	Spécialités
Zidovudine ou AZT	2',3'-didésoxythymidine	RETROVIR [®] ,
Didanosine ou ddi	2',3'-didésoxyinosine	VIDEX [®]
Zalcitabine ou ddC	2',3'-didésoxycytidine	HIVID [®]
Stavudine ou d4T	2',3'-didéhydro-2',3'- didésoxythymidine	ZERIT [®]
Lamivudine ou 3TC	2',3'-didésoxy-3' thiacytidine	EPIVIR [®] , ZEFFIX [®]
Abacavir ou ABC	Analogue carboxylique de la guanosine	ZIAGEN [®]

Tableau 6: Les inhibiteurs nucléosidiques de la reverse transcriptase (INTI)

DCI	Mécanisme	Spécialités
Ténofovir Ou bis-POC-PMPA	Analogue nucléotidique de l'adénosine monophosphate	VIREAD [®]

Tableau 7: Les inhibiteurs nucléotidiques de la reverse transcriptase

DCI	Mécanisme	Spécialités
Névirapine ou NEV	Inhibiteurs non compétitifs qui se fixent en aval du site actif de la transcriptase inverse	VIRAMUNE [®]
Efavirenz		SUSTIVA [®]
Délavirdine ou DLV		RESCRIPTOR [®]

Tableau 8: Les inhibiteurs non nucléosidiques de la reverse transcriptase (INNTI)

DCI	Mécanisme	
V 165	Anti-intégrase	} Essais <i>In vitro</i>
PA 457	Inhibiteur de la maturation tardive virale	
UK 427 857 TAK-220	Antagonistes des récepteurs CCR5 et CXR4	
Enfuvirtide ou T 20 FUZEON® (ATU)	Inhibiteurs de fusion	} Essais <i>In vitro</i>
Amdoxovir ou DAPD	Inhibiteur nucléosidiques	
T 1249	Inhibiteurs de fusion	

Tableau 9: Quelques nouvelles molécules en cours d'essais

C'est un nucléoside analogue de la thymidine. Les analogues nucléosidiques doivent être phosphorylés en position 5' par des enzymes cellulaires pour être actifs (figure 22).

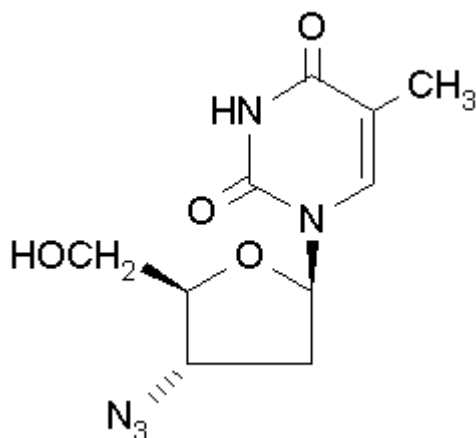


Figure 20 : Formule chimique de l'AZT

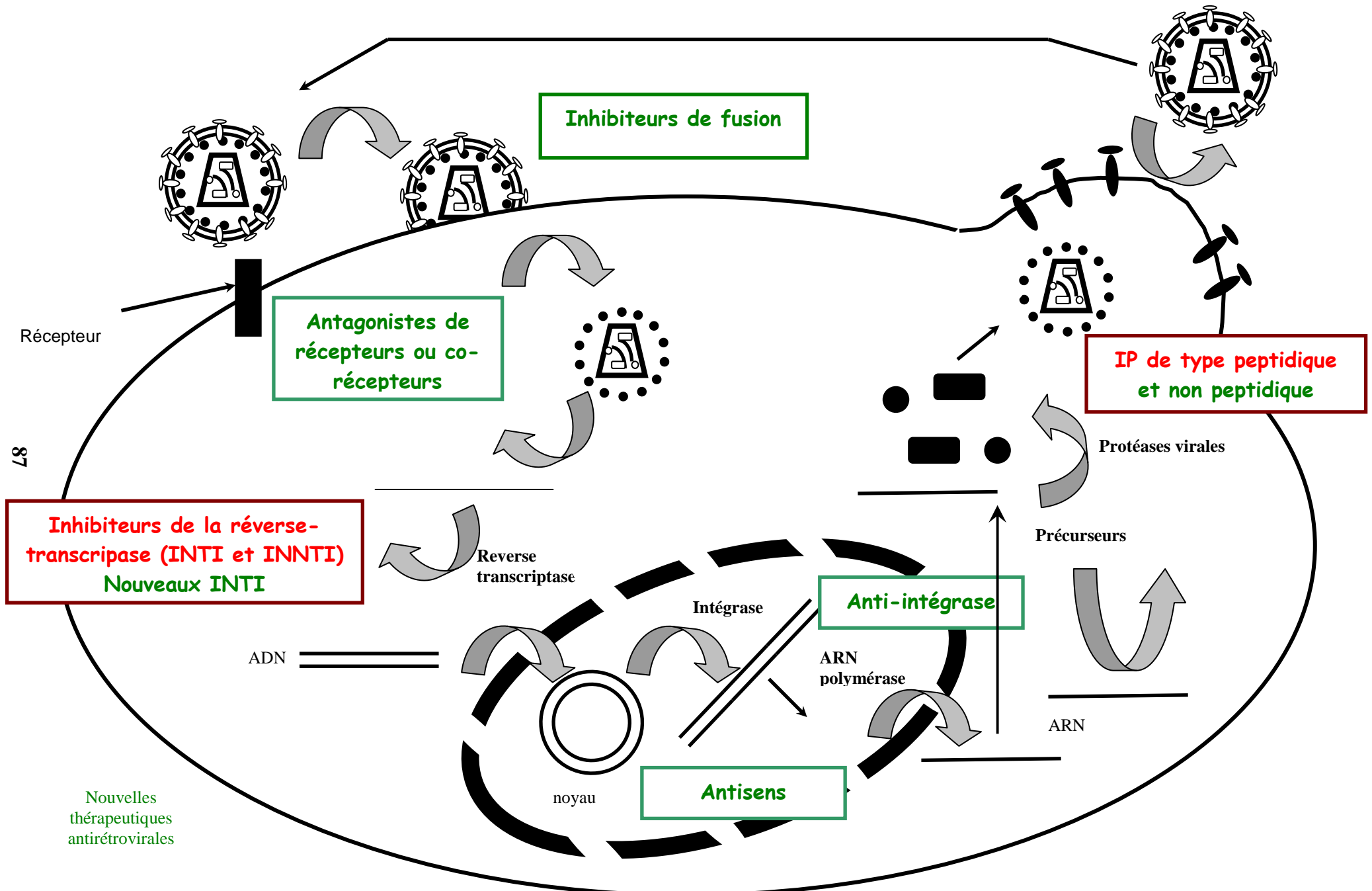


Figure 21 : Site d'action des antirétroviraux

Nouvelles
thérapeutiques
antirétrovirales

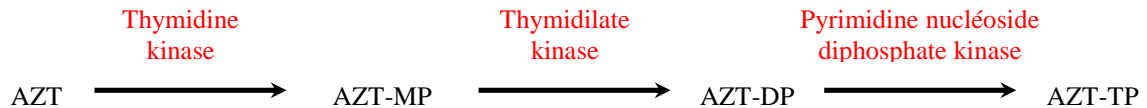


Figure 22 : Etapes de phosphorylation intracellulaires de l'AZT

L'AZT triphosphate (AZT-TP) entre en compétition avec la thymidine triphosphate (dTTP) (figure 23) au niveau du site actif de la reverse transcriptase. Il est utilisé préférentiellement par l'enzyme virale et très peu par les transcriptases cellulaires qu'il inhibe 100 fois moins. L'AZT est donc un inhibiteur compétitif. L'infection de la cellule par le virus est bloquée et l'activité des cellules est ainsi préservée. De par son mode d'action, l'AZT empêche donc l'infection de nouvelles cellules mais il est sans effet sur le réservoir de virus déjà intégré au génome sous forme de provirus.

Les autres INTI sont des analogues d'autres nucléosides cellulaires. Ils fonctionnent comme l'AZT (tableau 6).

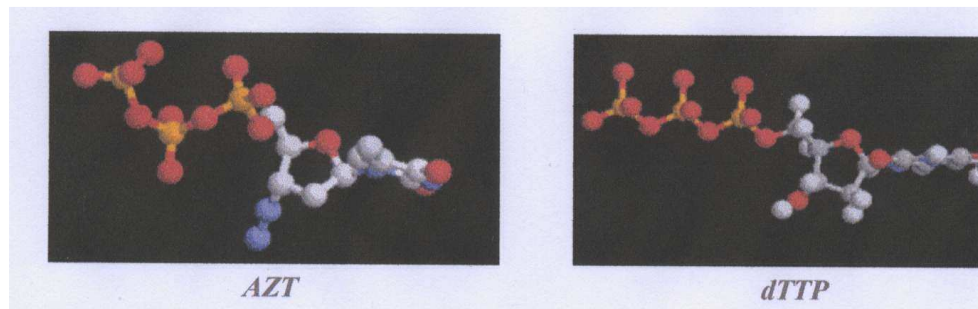


Figure 23 : Structure moléculaire de l'AZT comparée à la thymidine triphosphate (dTTP)

La toxicité des analogues nucléosidiques de la reverse transcriptase est variable selon les molécules. Son mécanisme reposerait sur un phénomène de toxicité mitochondriale. En effet, ces molécules peuvent interférer avec l'ADN polymérase γ dans la mitochondrie où il n'existe pas de mécanismes de réparation de l'ADN comparables à ceux de l'ADN chromosomique (Moyle, 2000).

3.1.1.1. INTI et VMV

Au cours de précédentes études réalisées au laboratoire de Microbiologie, l'action inhibitrice de plusieurs familles de molécules telles AZT, ddC, ddi, ddU, suramine, PFA et méthyl-aza-uridine a été recherchée sur le VMV. Parmi les INTI, AZT et ddC sont les composés les plus actifs sur la réplication de la souche Visna (Larrouturou, 1993). D'autres analogues de nucléosides tels le 3-alkyl 2-piperazone et le b-ribosylamine ont aussi manifesté un effet antiviral sur la souche Visna (Benjahad *et al.*, 1994 et 1996, Depelley *et al.*, 1996). D'autres analogues de nucléosides ont un effet inhibiteur sur la réplication du VMV ; Balzarini *et al.* (1998) ont testé des dérivés de didésoxynucléosides avec pour résultat l'inhibition de la réplication du VMV et de la formation de syncytia, *in vitro* sur des cellules de plexus choroïde. Ils confirment les résultats décrits par Thormar *et al.* (1993 et 1995) qui ont décrit une très grande efficacité *in vitro* des analogues nucléosidiques anti-HIV alors que des inhibiteurs d'adsorption et de fusion comme des polysaccharides sulfates, ont une très faible activité antivirale sur le virus comparativement à leur efficacité sur le HIV. Les auteurs ont supposé que ces différences d'activité seraient dues aux métabolismes cellulaires différents. Dans la littérature, le VMV est présenté comme un excellent modèle animal d'infection virale et de par ses nombreuses analogies avec le HIV, il peut servir de modèle *in vitro* pour cribler de nouvelles molécules (Salvatori *et al.*, 2001 et 2002).

3.1.1.2. AZT et apoptose

A ce jour, peu de recherches ont été réalisées sur l'effet des INTI sur l'apoptose. L'AZT est-elle une molécule pro- ou anti-apoptotique ? Les résultats actuels sont assez contradictoires aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

Mediavilla & Sanchez (2000) ont montré que l'AZT induit l'apoptose sur des cellules cancéreuses humaines de glandes mammaires. Cette action pro-apoptique dépend du temps de traitement et de la dose. Des cellules de carcinome mammaire de souris entrent en apoptose lorsqu'elles sont exposées à l'AZT par activation de la caspase-3 (Tejera *et al.*, 2001). Ces travaux ont été confirmés par ceux de Zhang *et al.* (2001) qui, en exposant des cellules humaines «human cord blood mononuclear cells» à de faibles doses d'AZT, permettant une activité antirétrovirale contre le HTLV-1 n'ont constaté aucune cytotoxicité, alors que de très fortes doses d'AZT induisent l'apoptose.

In vivo l'impact des traitements antiviraux et des multithérapies sur l'apoptose est peu exploré. En 1999, l'équipe de Roger a comparé le niveau d'apoptose de lymphocytes T de patients infectés par le HIV ; ces auteurs ont montré que les traitements antiviraux peuvent réduire *in vivo* l'apoptose des cellules T CD4⁺. Moretti *et al.* (1999, 2002) ont observé, chez des patients asymptomatiques infectés par le HIV et soignés par un traitement combiné AZT et ddI, que la L-carnitine, molécule décrite comme anti-apoptotique, réduit l'apoptose des CD4⁺ et CD8⁺, *in vitro*. Plus récemment, des résultats totalement contradictoires ont été publiés par Benveniste *et al.* (2001) stipulant que l'AZT limite le renouvellement des cellules CD4⁺ chez des patients infectés par le HIV et traités ; le taux d'apoptose des cellules CD4⁺ est passé d'environ 60% à 10% après arrêt du traitement. Il a été alors suggéré que l'AZT induit *in vivo* l'apoptose des cellules CD4⁺ et CD8⁺.

De nombreuses études ont été réalisées sur des cellules transformées par des virus opportunistes au cours de l'infection par le HIV. L'AZT induit l'apoptose des cellules de lymphomes de Burkitt (BL) infectées par le virus Epstein Barr (EBV). En revanche, il n'induit l'apoptose de cellules PEL (Primary Effusion Lymphoma) infectées par le HHV-8 (Human Herpes Virus Type 8) que combiné à un traitement par l'interféron alpha (IFN α) (Toomey *et al.*, 2001). Ces auteurs ont prouvé que l'IFN α augmente l'expression de TRAIL et que l'AZT potentialise l'effet de ce ligand pour induire l'apoptose. Des résultats comparables ont été décrits par Lee *et al.* (1999). Plus récemment Ghosh *et al.* (2003) ont confirmé la sur-régulation de TRAIL par l'IFN α et ont décrit le rôle probable de l'AZT dans l'induction de l'apoptose des lignées de lymphomes primaires (PEL) et de cellules issues de patients infectés par le HIV. Ils ont constaté un niveau très élevé d'AZT-MP dans les deux types cellulaires. L'AZT-MP bloquerait la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- κ B. Une fois dans le noyau, NF- κ B se fixe sur des séquences spécifiques de l'ADN et permet la transcription de gènes anti-apoptotiques. En bloquant la translocation du facteur de transcription NF- κ B, l'AZT favorise l'apoptose. Cet effet n'a pas été observé avec d'autres INTI.

L'AZT a aussi été décrit, *in vitro*, comme un inhibiteur de la télomérase, enzyme exprimée à 90% dans les cellules cancéreuses et non exprimée dans les cellules normales. Par blocage de cette enzyme, l'AZT provoquerait l'apoptose des cellules cancéreuses, et pourrait avoir un rôle important dans les traitements anti-cancéreux (Mo *et al.*, 2003).

En 2002, Puccinini *et al.* ont étudié l'effet d'association d'antirétroviraux [indinavir, lamivudine et AZT] sur le protéasome responsable de la machinerie de dégradation des

protéines dans la cellule et impliqué dans l'apoptose. L'activité du protéasome est inhibée par ces trois drogues utilisées séparément, et cet effet augmente avec la combinaison des trois. Par conséquent, les enzymes virales ne sont pas les seules cibles des antirétroviraux, les enzymes cellulaires le sont aussi.

Les résultats obtenus par Aquaro *et al.* (2000) ont aussi démontré l'effet anti-apoptotique de l'AZT en réalisant une co-culture de macrophages et d'astrocytes *in vitro*. Les astrocytes ne possèdent pas de récepteur pour le HIV, pourtant, *in vivo* l'infection par le HIV provoque la mort des neurones. Des astrocytes mis en culture en présence de macrophages infectés par le HIV et capables de produire des particules virales, entrent en apoptose par relargage dans le surnageant du ligand de Fas. Le traitement des macrophages par l'AZT empêche l'entrée en apoptose des astrocytes. La production de virus par les macrophages est requise pour provoquer l'apoptose des astrocytes en culture. Cette étude s'oppose à celle de Maldarelli *et al.*, 1995 qui en testant des co-cultures de cellules H9 vierges et infectées par le HIV ne révèlent aucun effet de l'AZT sur l'apoptose de ces cellules.

Ces quelques résultats publiés permettent de se rendre compte que les avis sur les effets de l'AZT sur l'apoptose sont partagés, surtout entre les études *in vitro* et *in vivo*. Les données bibliographiques présentent beaucoup d'études ponctuelles et isolées. *In vitro*, il semble que l'action de l'AZT dépende de la dose, du temps de traitement et surtout du type cellulaire considéré.

3.1.2. Les inhibiteurs de protéase (IP)

Les inhibiteurs de protéase ou antiprotéases sont le produit d'une recherche de modélisation fondée sur la connaissance de la structure tridimensionnelle de la protéase du HIV et de ses sites de clivage. La protéase est requise pour la maturation des protéines virales et l'infectivité des virions. Elle clive les précurseurs polyprotéiques en protéines de structure et enzymes virales, donnant naissance à des protéines matures et fonctionnelles. Son site actif est constitué par l'assemblage d'un homodimère symétrique. En mimant le substrat naturel de l'enzyme, les IP ont une forte affinité pour le site enzymatique grâce à des interactions fortes entre l'inhibiteur et certains acides aminés tapissant la face interne du site actif. Ce sont des molécules peptidomimétiques qui se fixent aux sites de liaison du substrat de l'enzyme empêchant le clivage des précurseurs protéiques (gag et gag-pol), ce qui aboutit à la production de particules virales défectueuses et non infectieuses. Actuellement des IP de type

non peptidiques sont en cours d'études (figure 21). Ces molécules sont directement actives, sans recours au métabolisme cellulaire. Leur action se situe en aval de celle des inhibiteurs de la reverse transcriptase. Il existe 6 antiprotéases commercialisés à ce jour (tableau 10).

DCI	Mécanisme	Spécialités
NELFINAVIR ou NLFN	Inhibiteurs peptidomimétiques	VIRACEPT®
SAQUINAVIR ou SQN		INVIRASE®, FORTOVASE®
RITONAVIR ou RTN		NORVIR®
INDINAVIR ou IDV		CRIXIVAN®
AMPRENAVIR		AGENERASE®
LOPINAVIR		KALETRA®

Tableau 10: les inhibiteurs de protéase

3.1.2.1. IP et apoptose

Les études sur les antiprotéases et l'apoptose sont relativement récentes. La première date de 1995 où les effets d'un INTI (ddI) et d'un IP (Saquinavir), sur des cellules T CD4⁺ infectées par le HIV, ont été recherchés dans le but d'identifier à quelle étape du cycle de réplication l'induction de l'apoptose se produit (Corbeil & Richmann, 1995). La ddI inhibe l'apoptose des cellules lorsqu'elle est en contact avec les cellules avant infection par le HIV alors que le saquinavir n'a aucune action inhibitrice sur l'apoptose des cellules CD4⁺. Ces résultats suggèreraient que l'induction de l'apoptose requière l'étape de reverse transcription et l'expression de nouvelles particules virales mais pas leur maturation.

Les autres recherches réalisées sur les inhibiteurs de protéase et l'apoptose sont plus récentes. Comme pour les INTI, les résultats présentés dans la littérature sont souvent contradictoires. Il est difficile d'établir une action précise des IP sur l'apoptose. Ils sont aujourd'hui parfois décrits comme des molécules ayant des propriétés anti-apoptotiques (Phenix *et al.*, 2002) ou des propriétés cytoprotectrices sur les neurones (Wan & Depetrillo, 2002) ; *a contrario* on leur attribue des propriétés cytotoxiques (Zhong *et al.*, 2002). Ceci a été confirmé par Estaquier *et al.*, 2002 qui décrivent des effets opposés des IP sur les lymphocytes CD4⁺, indépendamment de leur action antivirale.

Weichold *et al.* (1999) démontrent sur des cultures de cellules mononucléées du sang périphérique non infectées (PBMC "peripheral blood mononuclear cell") qu'un traitement préalable par le ritonavir réduit la sensibilité de ces cellules à l'apoptose induite

expérimentalement avec une diminution de l'expression des caspases-1 et -3 et une baisse de l'exposition des phosphatidylsérines membranaires observée au cours de l'apoptose tout en augmentant la viabilité cellulaire. Sur ces mêmes cellules, Chavan *et al.* (2001) n'ont mis en évidence avec l'indinavir aucun effet inhibiteur sur l'apoptose c'est à dire qu'il n'inhibe pas l'activité des caspases. Phenix *et al.* (2000) avaient antérieurement publié que les traitements par les IP n'ont aucun effet sur des lymphocytes du sang périphérique (PBLs "peripheral blood lymphocytes") de patients non infectés par le HIV ou sur des cellules T Jurkat ; en revanche, chez des patients infectés par le HIV, ces mêmes auteurs ont montré une réduction significative de l'apoptose des cellules T CD8⁺ et CD4⁺ après 8 jours de traitement. Des résultats analogues ont été mis en évidence avec des cellules CD34⁺ où les IP réduisent l'apoptose de ces cellules lorsqu'elles sont infectées mais n'ont pas d'effet sur les cellules saines ; ainsi les IP bloqueraient la voie caspase-dépendante (Sloand *et al.*, 2000).

En 2001, Phenix *et al.* ont montré que l'indinavir, le ritonavir et le nelfinavir inhibent l'apoptose mais n'ont aucune action sur les caspases. Ces trois molécules inhiberaient l'apoptose par action directe sur la mitochondrie en bloquant l'ouverture des pores mitochondriaux pour empêcher le relargage de molécules pro-apoptotiques. L'apoptose des leucocytes polynucléés (PMNL "polymorphonuclear leukocytes") infectés ou non par le HIV est réduite *in vitro* par le ritonavir ou l'indinavir. Les récents travaux de Pajonk *et al.* (2002) abondent dans le sens que les IP ont des effets très divers sur l'apoptose en fonction du type cellulaire.

Ces données bibliographiques, non exhaustives, nous permettent d'écrire que les avis sont partagés sur l'action des IP et l'apoptose. Le type cellulaire, la molécule, la dose et le mode de traitement sont autant de facteurs qui conditionnent les résultats publiés.

Chez les sidéens, Gougeon (1999a) et Montagnier (1999b) ont observé une diminution de la mort par apoptose de toutes les populations cellulaires lymphocytaires, après l'administration de multithérapies antirétrovirales efficaces incluant des inhibiteurs de la reverse transcriptase et de la protéase.

L'effet antiviral des IP n'a jamais été testé sur le virus Visna-Maedi ; mais les IP n'ont aucune action sur la protéase du FIV (Morailon, 2003).

3.2. Les protéines virales inhibitrices de l'apoptose (figure 24)

La plupart des virus interfèrent sur les voies biochimiques régulant l'apoptose. Certains virus ont développé des stratégies pour provoquer la mort des cellules qu'ils infectent. D'autres virus exploitent la régulation des signaux apoptotiques, soit pour assurer le maintien d'une infection virale latente, soit pour maintenir la cellule hôte viable et ainsi augmenter leur efficacité de réplication avec production de protéines virales qui inhiberaient les caspases. Les protéines virales peuvent également être des homologues de Bcl-2 ou des FLIPs (FLICE-inhibitory proteins)...

3.2.1. Les protéines virales qui contrôlent les voies médiées par p53

De nombreux virus ont développé des mécanismes pour bloquer l'apoptose induite par la protéine p53 suppresseur de tumeur. Parmi ces virus, on peut citer les virus à ADN tels que les adénovirus humains, le virus simien (SV40) ou les papillomavirus humains (HPV), mais aussi les virus à ARN, décrit précédemment, avec le HIV.

La protéine E1A de l'adénovirus augmente l'expression de p53 et induit l'apoptose p53 dépendante, alors que E1B-55K et E4 orf6 se lient directement à p53 pour bloquer l'activité transcriptionnelle de p53 et provoquer sa dégradation (Teodoro & Branton, 1997b; McNees & Gooding, 2002). E1B-55K se lie au domaine d'activation de p53. E4 orf6 empêcherait l'interaction entre p53 et TAF II31, protéine cellulaire requise pour l'activation de p53.

L'antigène T du virus SV40 se lie au domaine de liaison de p53 à l'ADN et bloque ainsi son activité de facteur de transcription. Ceci entraîne une augmentation de p53 dans les cellules infectées et une inhibition de l'apoptose (Teodoro & Branton, 1997a).

L'HPV développe d'autres mécanismes. Sa protéine E6 en se liant à p53 provoque l'ubiquitination puis la dégradation rapide de p53 par le protéasome alors que la protéine E7 stabilise p53.

La protéine pX du HBV (virus de l'hépatite B) interagit avec p53, diminue sa liaison à l'ADN et son activité de transactivation, ce qui bloque l'apoptose dépendante de p53.

Le génome du virus Epstein-Barr (EBV) code pour deux protéines qui se lient à p53. EBNA-5 se lie à p53 et au rétinoblastome (Rb), et perturbe le cycle cellulaire. La protéine transactivatrice BZLF1 ou ZEBRA bloque la fonction de transcription de p53 en se liant à son domaine carboxy-terminal (Teodoro & Branton, 1997b).

Récemment, il a été découvert que HHV8 (human herpes virus 8) code un inhibiteur de p53, nommé LANA (Gougeon, 2001).

3.2.2. Modulation de la voie mitochondriale par les protéines virales

Les virus codent aussi pour des inducteurs ou des répresseurs d'apoptose capables d'agir sur les mitochondries. La protéine E1B-19K des adénovirus inhibe ou retarde l'apoptose induite par le ligand de Fas et le TNF. Cette protéine présente des homologies avec les membres de la famille Bcl-2. Elle possède un domaine BH (Bcl-Homology) qui lui permet de se lier aux protéines mitochondriales Bax, Bak (Lomonosova *et al.*, 2002) et Bik (Teodoro & Branton, 1997a). Après une stimulation par le TNF, E1B-19K qui est présente dans les membranes nucléaires, transloque au niveau de la mitochondrie où elle interagit avec Bax et Bak empêchant l'ouverture des pores mitochondriaux, le relargage des protéines pro-apoptotiques de la mitochondrie et l'activation de la caspase-9. De plus cette protéine serait capable de se lier à APAF-1 pour bloquer l'activation des caspases (McNees & Gooding, 2002).

Trois autres virus possèdent des protéines homologues à la protéine anti-apoptotique Bcl-2. *L'african swine fever virus* code pour une protéine, LMW5-HL munie de séquences homologues à Bcl-2 et inhibe l'apoptose. Les protéines BHRF1 et BALF-1 de l'EBV protègent les cellules de l'apoptose. BHRF1 est une protéine homologue à Bcl-2 alors que BALF-1 est capable d'empêcher les modifications mitochondriales observées au cours de l'apoptose par liaison à Bax et Bak (Everett & Mcfadden, 2001). Par contre, la protéine LMP-1 protège de l'apoptose les cellules infectées par l'EBV par induction de l'expression de la protéine Bcl-2 (Teodoro & Branton, 1997a). L' *herpèsvirus saimiri*, le HHV-8, le virus de l'herpès murin gamma (HV68) possèdent tous une protéine homologue de Bcl-2 appelée respectivement HSV-Bcl-2, Ks-Bcl-2 et M11.

Récemment vMIA (viral mitochondrial inhibitor associated) un inhibiteur viral de l'apoptose a été identifié chez le CMV (*cytomegalovirus*). vMIA est codé par un gène viral précoce *UL37 exon1*. Cette protéine est principalement localisée dans la mitochondrie. Elle supprime l'apoptose en empêchant l'ouverture des pores de la membrane externe mitochondriale et ainsi bloque sa perméabilisation (Goldmacher, 2002).

La protéine M11L du *Myxoma poxvirus* du lapin est présente dans la mitochondrie des leucocytes infectés. Elle inhibe la chute du potentiel mitochondrial membranaire par une modulation directe du pore mitochondrial (Everett & McFadden, 2001).

3.2.3. Les protéines virales inhibitrices des caspases ou de la voie des caspases

CrmA (cytokine response modifier A) codé par le virus de la variole fut le premier inhibiteur de caspase identifié. Le virus de la variole bovine ou « cowpox » code pour un inhibiteur spécifique des caspases-1 et -8. Il fait partie des membres de la famille des inhibiteurs de protéase à sérine (serpins « serine protease inhibitors »). Il initie une inhibition de l'entrée en apoptose de la cellule hôte ainsi qu'une inhibition de la réaction inflammatoire causée par la production d'interleukine-1 β (Zhou *et al.*, 1997). Le virus de la vaccine, un autre poxvirus, possède une protéine analogue à crmA qui inhibe l'apoptose induite par le TNF- α ou FasL (Teodoro & Branton, 1997a).

Les baculovirus (virus infectant les cellules d'insectes) comportent deux gènes ayant la propriété de bloquer l'apoptose des cellules infectées : p35 du *Autographica californica nuclear polyhedrosis virus* (AcMNPV) et IAP (inhibitor of apoptosis). *Cydia pomonella granulosis virus* (CpGP) ou *Orgyia pseudotsugata polyhedrosis virus* codent tous deux pour des protéines IAP-like qui inhibent l'apoptose (Teodoro & Branton, 1997a). Des homologues humains des IAPs ont été identifiés, dévoilant ainsi une nouvelle classe de régulateurs de l'apoptose capables de s'associer aux caspases effectrices -3, -6 et -7, et de les bloquer. Les IAPs sont des métalloprotéines munies de différents domaines dont le domaine BIR responsable de la suppression de l'apoptose (baculovirus IAP repeat) (Teodoro & Branton, 1997a; Gougeon, 2001).

3.2.4. Les protéines virales inhibitrices de la voie des récepteurs de mort

Différents herpèsvirus, l'HHV-8/KSHV, associé au sarcome de kaposi, l'EHV2 équin, le BHV4 bovin, et l'herpèsvirus de saimiri, ainsi qu'un poxvirus, celui du *molluscum contagiosum* (MCV), produisent des homologues des FLIPs, les v-FLIPs (Gougeon, 2001). Les v-FLIPs sont des isoformes de la caspase-8 (ou FLICE) et possèdent deux domaines DED (death effector domain), permettant d'interagir avec les DED de FADD et/ou de la caspase-8 ce qui inhibe le recrutement et l'activation de la caspase-8, ou plus faiblement avec les DED

d'autres caspases. Les v-FLIPs bloquent l'apoptose induite par les récepteurs de mort CD95, TNF-R1, TRAMP/DR3 et TRAIL-R1. Tous les herpèsvirus qui codent des v-FLIPs, codent aussi des protéines homologues de Bcl-2 (Vossen *et al.*, 2002).

Les protéines codées par le gène E3 des adénovirus bloquent l'apoptose par les récepteurs de mort. La protéine E314.7K inhibe l'apoptose induite par le TNF selon un mécanisme à élucider. Elle pourrait se lier à la partie cytoplasmique de la phospholipase A2 (cPLA2) ce qui empêcherait le clivage de l'acide arachidonique et réduirait l'inflammation lors de l'infection virale. Ainsi, E314.7K inhiberait l'apoptose en bloquant l'activité des caspases, car cPLA2 est un substrat des caspases. Deux autres protéines codées par le gène E3 des adénovirus, E3RID, complexe formé des protéines 14.5K et 10.4K, (receptor internalization degradation) et 6.7K inhibent l'apoptose des cellules infectées. RID bloque l'apoptose induite par le TNF par un mécanisme encore inconnu. Ce complexe protège aussi les cellules de l'apoptose via Fas, en provoquant l'internalisation puis la dégradation du récepteur Fas dans les cellules infectées. En combinaison avec une troisième protéine E3 6.7K, RID protège les cellules de l'apoptose via le récepteur TRAIL notamment en sous régulant les récepteurs TRAIL-R1 et 2 à la surface des cellules, peut-être par le même mécanisme que pour le récepteur Fas (McNees & Gooding, 2002).

Le virus de l'hépatite C (VHC) et l'EBV bloquent l'apoptose en interférant avec la voie de signalisation du TNF α . L'EBV code pour une protéine transmembranaire LMP1 dont le domaine cytoplasmique interagit avec les protéines adaptatrices TRAF du récepteur TNFR1 et active la transcription de NF κ B ce qui permet la transcription de molécules anti-apoptotiques. La protéine de capsid du VHC bloque l'effet apoptotique du TNF α en empêchant l'activation de la caspase-8.

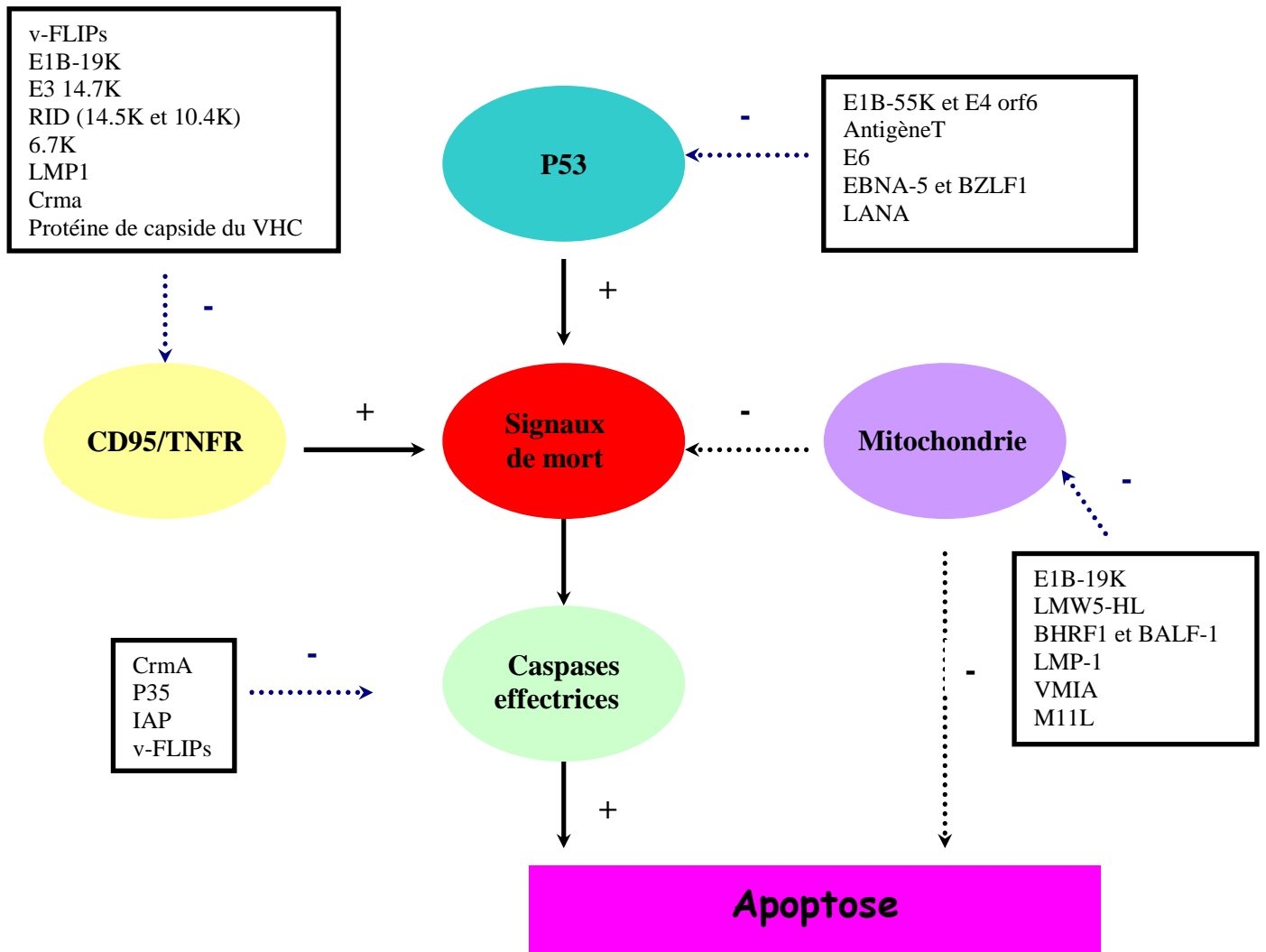


Figure 24 : Niveaux d'action des protéines virales inhibitrices de l'apoptose

3.3. Les cytokines et l'apoptose (David & Théze, 2000)

Aujourd'hui des cytokines immunostimulantes sont parfois utilisées en complément d'une trithérapie, par exemple l'interféron α , l'interleukine (IL) 2 (qui vient d'avoir une ATU) et l'interleukine 12.

- ❖ L'interféron α , interféron de type I, est produit par les leucocytes en réponse à une infection virale. Il agit sur les cellules pour limiter la propagation virale ainsi que la propagation cellulaire. Il est capable d'induire l'apoptose des cellules.
- ❖ L'interleukine 2 est la seule cytokine donnant des résultats probant dans le traitement de patients infectés par le HIV. Les premiers essais d'immunothérapie par IL-2 datent de la première moitié des années 80 bien avant l'introduction des trithérapies. C'est la cytokine majeure des lymphocytes T ; elle agit sur toutes les sous-populations T. Elle est sécrétée par les lymphocytes CD4 activés et joue un rôle dans l'expansion clonale des cellules T activées. C'est un facteur de prolifération et de différenciation des lymphocytes B.
- ❖ Les propriétés de l'interleukine 12 ont suscité de grands espoirs dans son application en thérapeutique. Elle est sécrétée par les cellules présentant l'antigène, principalement les monocytes et les macrophages à la suite d'une stimulation antigénique. *In vitro*, c'est un puissant stimulateur de l'activité NK contre les cellules tumorales et les cellules infectées par un virus. Elle augmente aussi la prolifération et la fonction lytique des lymphocytes CD8.

Aujourd'hui on s'oriente vers **l'interleukine 7** encore jamais utilisée chez l'homme. Cette cytokine est synthétisée par les cellules stromales des organes générant des cellules lymphoïdes. Elle est la seule qui soit absolument nécessaire au développement des cellules B et T en agissant comme un facteur de croissance, comme **agent anti-apoptotique** et comme stimulant de leur différenciation. L'IL-7 protège les cellules matures de l'apoptose. Elle semble avoir de nombreuses propriétés intéressantes, mais les bienfaits sur l'homme restent encore hypothétiques.

3.4. Les inhibiteurs de synthèse des caspases

Les inhibiteurs synthétiques des caspases sont des peptides dont la séquence contient le site de clivage de ces enzymes. Ils sont issus de la découverte et de la connaissance des substrats naturels des caspases. Ce sont des candidats potentiels pour un traitement symptomatique d'affections aiguës traduisant un excès d'apoptose. Des substrats peptidiques de synthèse ont d'abord été construits à partir de séquences consensus présentes dans les substrats naturels des caspases. Ces substrats de synthèse permettent l'étude de l'activité d'une caspase donnée, *in vitro*.

On distingue deux types d'inhibiteurs de synthèse. Les inhibiteurs de synthèse qui contiennent un groupement -CHO (aldéhyde) en position C-terminale qui remplace le groupement rapporteur présent dans le substrat de synthèse ; il réagit avec le site catalytique de la caspase et bloque son activité. En N-terminal se situe un groupement bloquant qui empêche la digestion par les aminopeptidases. Le blocage de la caspase par ce type de composé est réversible. D'autres inhibiteurs possèdent un groupement -FMK (fluorométhylkétone) qui remplace le groupement -CHO. Ces inhibiteurs forment des liaisons covalentes et se lient de façon irréversible aux caspases (Duval, 2003).

Leur administration *in situ* pourrait être une nouvelle arme thérapeutique. Dans un modèle d'hypoxie-ischémie néonatale, l'injection d'un inhibiteur de caspases a permis d'atténuer les dommages tissulaires (Biola & Pallardy, 2001). Malgré ces résultats encourageants, il convient de bien connaître la cible, c'est-à-dire la caspase à inhiber. L'inhibition de l'apoptose comme stratégie de traitement ne pourra être envisagée qu'à la condition de disposer de molécules actives par voie systémique. Enfin, il sera nécessaire de déterminer les effets de l'inhibition chronique des caspases sur les métabolismes cellulaires et sur les pathologies, avant d'envisager des indications thérapeutiques.

L'exploitation des connaissances acquises sur la régulation de l'apoptose a permis et permettra encore d'identifier non seulement les acteurs du processus, mais aussi de définir des cibles pour l'élaboration de thérapeutiques innovantes, plus spécifiques et moins toxiques que celles utilisées actuellement.

OBJECTIFS

Les objectifs de ce travail ont été de démontrer l'existence de différentes voies apoptotiques initiées par le virus Visna dans le modèle cellulaire cible de ce virus (les cellules de plexus choroïde).

- Pour cela nous avons, dans un premier temps, recherché l'implication et le rôle régulateur de la mitochondrie comme plaque tournante de l'apoptose Visna-induite. La voie dépendante de la mitochondrie nous a amené à explorer : la chute du potentiel mitochondrial transmembranaire, le relargage de molécules apoptogènes (cyt-c et AIF) et l'activation de la caspase-9. Notre étude s'est élargie à une analyse de la régulation mitochondriale par des molécules pro- et anti-apoptotiques (Bax et Bcl-2) et par la protéine suppresseur de tumeur p53, comme cela a été décrit dans d'autres systèmes d'infection virale. L'expression de chaque protéine apoptotique a été explorée par différentes approches méthodologiques.

- En utilisant un nouveau modèle cellulaire, cellules de membrane synoviale de chèvre immortalisées et transfectées par un gène rapporteur (GSMt-*lac*), et dans lesquelles le virus Visna induit l'apoptose, nous avons recherché s'il y a une relation directe entre cellules apoptotiques et cellules infectées par le virus. Lorsque le cycle viral est déclenché, ces cellules se colorent en bleu. Il était intéressant de savoir si l'ECP Visna-induit est corrélé à certaines manifestations morphologiques nucléaires caractéristiques de l'apoptose. Comme cela a été décrit dans l'infection par le HIV : est-ce que les cellules non infectées entrent aussi en apoptose ?

- Les objectifs majeurs des traitements antirétroviraux sont d'empêcher la diffusion des virus en stoppant leur réplication. Peu d'auteurs se sont intéressés à l'effet des ces molécules sur l'apoptose. C'est pourquoi nous avons prospecté dans cette voie et testé l'effet de deux molécules antirétrovirales sur l'apoptose Visna-induite : l'une agissant sur la reverse transcriptase virale (l'AZT) et l'autre agissant sur une autre enzyme virale la protéase (le mésylate de nelfinavir ou son métabolite M8). En utilisant des inhibiteurs potentiels de la réplication du rétrovirus, nous avons recherché quelle voie apoptotique est susceptible d'être bloquée, à quel niveau cellulaire, et à quelle dose sans que le produit soit cytotoxique.

MATERIEL ET METHODES

1. SOUCHE VIRALE VISNA K1514

Pour toutes nos expérimentations, nous avons utilisé la souche Visna K1514 fournie par le laboratoire de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) de Niort à partir de laquelle nous avons établi un pool viral.

1.1. Obtention d'un pool viral

A partir de cet échantillon, nous établissons un pool viral. Dans un flacon de culture de 75 cm², les fibroblastes de PC sont cultivés dans du milieu minimum essentiel de Eagle «Minimum Essential Medium Eagle» (MEM) (Sigma) additionné de 4,76 g/L d'HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]) (Sigma), 1g/L de bicarbonate de sodium (Sigma), 10 mL/L d'acides aminés non essentiels (Invitrogen) et 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Invitrogen), jusqu'à environ 80 % de confluence. Ce milieu constitue le milieu d'entretien des cellules de PC. Le milieu est éliminé, puis les cellules sont recouvertes par 1,5 mL d'échantillon viral (c'est à dire un surnageant de culture issu de cellules infectées par la souche Visna K1514). Le flacon de culture est placé dans une étuve à 37°C pendant 1h. Après incubation, les cellules sont rincées puis recouvertes de milieu d'entretien contenant seulement 2,5% de SVF. Dès l'apparition de l'effet cytopathologique (ECP), se traduisant par l'apparition de syncytia (cellules géantes polynucléées), de modifications morphologiques des cellules observées au microscope inversé (Nikon) suivies *in fine* par une lyse cellulaire, le surnageant de culture est récupéré puis centrifugé 10 minutes à 2000g et à 4°C (Jouan CR312), de façon à éliminer les débris cellulaires. Ces étapes se répètent alors toutes les 24h jusqu'à destruction complète du tapis cellulaire. L'ensemble des surnageants de culture ainsi récoltés est congelé à -80°C et constitue le pool viral qui servira pour toutes les expérimentations. Ce pool viral est ensuite titré, puis aliquoté et conservé à -80°C.

1.2. Titrage du pool viral

Nous utilisons un protocole de titrage par microméthode mis au point au sein du laboratoire de Microbiologie (Larroutourou, 1993).

Déterminer le titre infectieux d'une suspension virale signifie dénombrer par unité de volume, les particules capables d'infecter des cellules permissives. Cette technique permet de déterminer la dose virale infectante à 50% sur les cellules de PC en culture.

Le titrage est réalisé dans des plaques 96 puits (Nunc). Les fibroblastes de PC sont ensemencés à une densité cellulaire de 1.10^4 cellules/puit dans du milieu d'entretien contenant seulement 5% de SVF :

- ❖ la colonne témoin négatif est complétée par 50 μ L de milieu d'entretien avec 5% de SVF,
- ❖ la colonne témoin positif est complétée par 50 μ L de surnageant de culture issu du pool viral
- ❖ et enfin toutes les autres colonnes sont successivement complétées par 50 μ L de surnageant viral dilué de 10 en 10 dans du milieu d'entretien contenant 5% de SVF.

Les cellules sont ensuite placées dans l'étuve à 37°C pendant 6 jours. Après 6 jours, le surnageant est éliminé. Les cellules sont incubées avec le May-Grünwald et le Giemsa (MGG) (Prolabo) colorant respectivement le cytoplasme en violet et le noyau des cellules en violet foncé. Les cellules sont colorées 5 minutes avec le May-Grünwald, rincées à l'eau puis incubées avec le colorant de Giemsa dilué au 1/10 pendant 2 heures. Les cellules sont de nouveau rincées à l'eau puis observées au microscope inversé. L'effet cytopathologique (syncytia et lyse) induit par le virus Visna est visible au microscope inversé après coloration.

Le titre du virus est déterminé selon la méthode de Reed et Muench (1938). Pour chaque dilution du virus, le nombre de puits présentant un ECP (+) ainsi que le nombre de puits ne présentant pas d'ECP (-) sont comptabilisés. La gamme de dilution employée est suffisamment large pour inclure la dilution où toutes les réponses seront positives et la dilution où toutes les réponses seront négatives.

Le titre infectieux est exprimé en dose infectante à 50% les cellules en culture (DICC₅₀ ou CCID₅₀) par mL. Le titre est calculé selon une formule statistique, après avoir déterminé les dilutions encadrant le point d'infection 50% :

$$\text{DICC50} = 10^{-(\text{dilution supérieure à 50\%} + X)}$$

où $X = [(\% \text{ dilution supérieure à 50\%} - 50\%) / (\% \text{ dilution supérieure à 50\%} - \% \text{ dilution inférieure à 50\%})]$

A partir de ce calcul, on pourra déterminer **la multiplicité d'infection (MOI)** en fonction du nombre de cellules. Pour toutes les manipulations, **nous utiliserons un MOI de 0,1** soit 1 particule virale infectante pour 10 cellules.

2. CULTURES CELLULAIRES

2.1. Les cellules primaires ovines de Plexus choroïde (PC)

Les cellules primaires utilisées sont obtenues à partir d'explants de plexus choroïde (PC) de mouton. Les plexus choroïdes sont des petites membranes situées à l'intérieur des ventricules intercérébraux. Les ventricules intercérébraux sont les cavités contenues au centre du cerveau et de la moelle épinière. Ils sont remplis de liquide céphalorachidien sécrété par les plexus choroïdes. Les PC sont richement vascularisés, reposent sur les couches optiques et prolongent la toile choroïdienne. Les explants proviennent d'encéphales d'animaux jeunes de moins de deux ans, fraîchement abattus.

La boîte crânienne du mouton est sciée afin de prélever l'encéphale le plus stérilement possible. Il est ensuite disséqué sous une hotte à flux laminaire. Les deux hémisphères cérébraux sont entaillés sur une profondeur de 2 cm environ jusqu'au niveau des deux ventricules latéraux. Les plexus choroïdes sont prélevés et déposés dans une boîte de pétri contenant du milieu d'entretien additionné d'antibiotiques : pénicilline (100 UI/mL) et streptomycine (0,2 mg/mL) (Sigma). Les hématies sont éliminées par plusieurs lavages dans du milieu de culture. Les membranes sont ensuite découpées en petits fragments. Chaque flacon de culture de 25 cm² (NUNC) est recouvert de 150 µL de plasma de poulet (Sigma) réhydraté. Les explants sont déposés à l'aide d'une pipette Pasteur dans les différents flacons de culture. Après une heure d'incubation à 37°C, les explants sont recouverts par 5 mL de milieu d'entretien additionné d'antibiotiques et de 20% de SVF et replacés à l'étuve à 37°C sous 5% de CO₂ pendant une semaine. Après une semaine d'incubation, les explants ainsi que le plasma de poulet sont retirés et les cellules sont recouvertes par du milieu d'entretien contenant des antibiotiques. Les cellules sont incubées dans l'étuve à 37°C pendant une semaine. La prolifération des cellules est contrôlée au microscope optique inversé. A confluence, les cellules sont décollées du support par action d'une solution de trypsine-EDTA (Invitrogen), puis sont divisées dans plusieurs boîtes pour permettre leur prolifération dans du milieu d'entretien. Elles sont congelées dans l'azote liquide (milieu d'entretien et 10% de diméthyl sulfoxyde (DMSO) (Sigma)) après 4 trypsinations, ou passages, au maximum.

2.2. Les cellules caprines de GSMt-lac

Les cellules de GSM (Goat Synovial Membrane) sont des cellules de membrane synoviale d'origine caprine principalement infectées par le CAEV, mais pouvant aussi être infectées *in vitro* par le virus Visna.

Au sein du laboratoire de l'AFSSA de Niort, les cellules de GSM ont été transformées : immortalisées, puis transfectées de façon stable avec une cassette contenant un promoteur constitutif, l'élément de réponse à Rev (RRE), et le gène *lacZ* codant pour la β -galactosidase. Les cellules de GSMt-lac (GSM transfectées par le gène *lac-Z*) obtenues sont des lignées "indicatrices" qui ont intégré dans leur génome un gène rapporteur placé sous la dépendance d'un promoteur viral. Le test de détection réalisé avec ces cellules indicatrices repose sur l'activité post-transcriptionnelle de la protéine régulatrice Rev commune à tous les lentivirus. A ce jour, l'intérêt de cette lignée cellulaire est de permettre une mesure quantitative des titres viraux ainsi que l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans l'infectivité et la réplication des lentivirus des petits ruminants (Valas *et al.*, 2003).

2.2.1. Culture des cellules de GSMt-lac

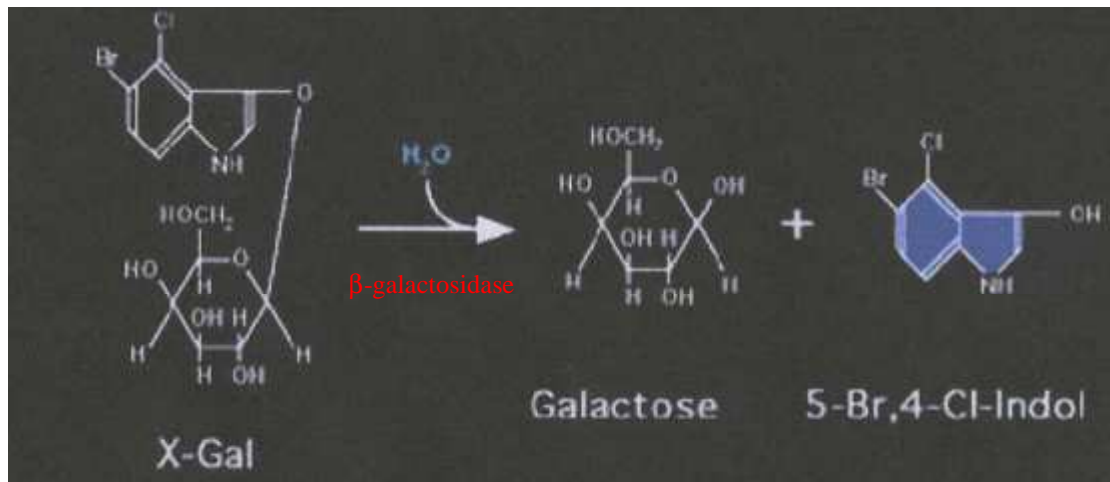
Les cellules de GSMt-lac sont cultivées dans du milieu de Eagle modifié par Dulbecco «Dulbecco's Modified Eagle Medium » additionné de pyruvate de sodium, de glucose 1000 mg/L et de pyridoxine (DMEM) (Sigma). Ce milieu est complété par de la L-glutamine (1X) (Sigma) et de la gentamycine (Sigma) à 10 mg/mL. Les cellules sont cultivées dans ce milieu avec 5% de SVF décomplémenté, 30 min à 56°C, et incubées à l'étuve à 37°C sous 5% de CO₂. Ce milieu constitue le milieu d'entretien des cellules de GSMt-lac.

2.2.2. Révélation de l'activité β -galactosidase dans les cellules de GSMt-lac infectées en présence de 5-Bromo-chloro-3-indolyl-b-D-galactoside (X-gal)

2.2.2.1. Principe de la coloration

Lorsque les cellules de GSMt-lac sont infectées par le virus Visna, il y a intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte, transcription du génome viral en ARNm puis traduction et synthèse des protéines virales : enzymes, protéines de structure, protéines accessoires et protéines régulatrices dont la protéine Rev. Rev peut alors se fixer sur le RRE et

permettre la synthèse de la β -galactosidase. Celle-ci transforme alors un substrat incolore le X-gal (5-bromo-chloro-3-indolyl-b-D-galactoside) en un produit bleu le 5-bromo, 4-chloro indol. Les cellules de GSMt-*lac* infectées, sièges du cycle de réplication virale et produisant de nouvelles particules virales sont nommées «cellules productives» et apparaissent bleues au microscope inversé. Cette étude nous permettra de corrélérer l'infection virale et l'apoptose.



2.2.2.2. Conditions de culture et d'infection

Les cellules de GSMt-*lac* sontensemencées à une concentration de 2.10^5 cellules par plaques de culture SlideFlask (Nunc) dans du milieu d'entretien. 24 h après, les cellules sont infectées par 500 μ L du pool viral Visna K1514 non dilué : le milieu d'entretien est retiré et la suspension virale est déposée 1h30 à 37°C sous 5% de CO_2 puis remplacée par du milieu d'entretien neuf comprenant seulement 2,5% de SVF.

La révélation s'effectue à différents temps post-infection. Les cellules sont rincées 2 fois au PBS (Phosphate buffer saline) puis fixées avec une solution de PBS contenant 1% de formaldéhyde (Sigma) et 0,25% de glutaraldéhyde (Sigma) pendant 2 min. Les cellules sont de nouveau rincées 3 fois au PBS, puis la solution de révélation contenant le X-gal est ajoutée. Elle contient 100 μ L d'une solution de potassium ferricyanide (Sigma) à 0,4 M, 100 μ L de potassium ferrocyanide à 0,4 M, 20 μ L de $MgCl_2$ (Prolabo) 1M et 100 μ L d'une solution de X-gal (Invitrogen) à 0,1 M dilué dans du DMSO. Ce mélange est complété à 10 mL avec du PBS. 1,5 mL de cette solution sont déposés sur les cellules puis incubés une nuit à 37°C. Après coloration les cellules sont rincées au PBS, montées entre lames et lamelles puis observées au microscope (Leica).

2.3. Témoin positif d'apoptose : traitement des cellules par la staurosporine

Afin de valider nos conditions expérimentales d'étude de l'apoptose induite lors de l'infection par le virus Visna, des études antérieures réalisées au Laboratoire de Microbiologie (Duval, 2003) ont mis au point des conditions d'apoptose de référence. Le stimulus capable d'induire l'entrée en apoptose des cellules de PC est le traitement par la staurosporine aux concentrations de 0,5 ou 1 μ M. Le temps de traitement est variable en fonction de l'expérience réalisée.

Le traitement par la staurosporine a été aussi testé sur les cellules de GSMt-*lac* afin de connaître les effets de cette molécule.

3. ACTION D'ANTIRÉTROVIRAUX SUR LE VIRUS

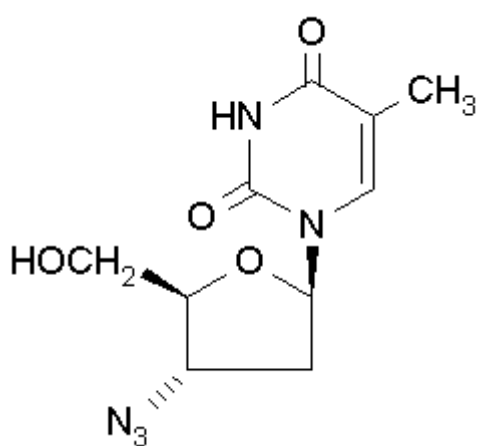
VISNA

3.1. Les différents antiviraux testés

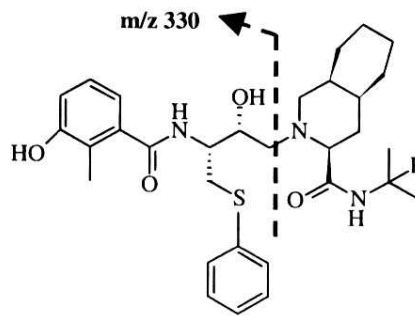
Quatre antirétroviraux ont été testés sur la souche Visna K1514 (figure 25):

- ❖ 3' azido-2',3'-deoxythymidine (AZT) (Sigma)
- ❖ mésylate de nelfinavir (N-tert-Butyl-decahydro-2-[2(R)-hydroxy-3(R)-(3-hydroxy-2-methylbenzamido)-4-(phenylthio)butyl]-(4aS,8aS)-isoquinoline-3(S)-carboxamide methanesulfonate) aimablement fourni par Roche diagnostics GmbH,
- ❖ hydroxy-t-butylamide ou "M8" (métabolite du mésylate de nelfinavir) aimablement fourni par Pfizer,
- ❖ un inhibiteur de protéase virale de synthèse (Ac-leu-val-phe-aldéhyde (BACHEM)). (Sarubbi *et al.*, 1993 ; Richards *et al.*, 1989a, b)

La solution d'AZT est préparée dans de l'eau distillée (25.10^{-4} M), filtrée puis conservée à -20°C . Le mésylate de nelfinavir est dilué dans de l'éthanol, le composé M8 dans du DMSO à 0,1 M. et sont conservés à 4°C . L'inhibiteur de protéase de synthèse est dilué dans du méthanol (0,1M) et conservé à -20°C .



3' azido-2', 3'-deoxythymidine (AZT)



D. R=CH₃ Nelfinavir (Mw 567)

R=CH₂OH M8 (Mw 583)

Mésylate de nelfinavir et M8

(Crommentuyn *et al.*, 2003)

Figure 25 : Formule chimique des composés testés

Les cellules sont incubées 5 jours à 37°C. Après incubation, 20 µL d'une solution filtrée de MTT à 6mg/mL dans du PBS sont introduits dans chaque puit. La plaque est mise à incuber à 37°C dans le noir pendant 3 h. Pendant ce temps, les cellules vivantes réduisent les sels de tétrazolium en formazan insoluble dans le milieu. Le milieu de culture est ensuite retiré puis 100 µL de DMSO sont introduits dans chaque puit, permettant la solubilisation des cristaux formés à l'intérieur des cellules. La plaque est mise sous agitation à température ambiante pendant 20 min dans le noir. Après complète dissolution des cristaux de formazan, la coloration formée est quantifiée au spectrophotomètre ELISA par mesure de l'Abs à 540 nm. L'absorbance lue est proportionnelle à la quantité de formazan produite. Une autre mesure à 690 nm est nécessaire afin de soustraire l'absorbance du bruit de fond.

3.2.2. Calcul du pourcentage de cytotoxicité et du pourcentage de protection

La technique de coloration au MTT nous permet d'une part de déterminer la cytotoxicité des composés testés, d'autre part leur pouvoir antiviral, représenté par le pourcentage de protection, sur la souche Visna K1514, *in vitro*.

Le calcul du pourcentage de cytotoxicité et de protection s'effectue selon le calcul suivant :

$$\text{Pourcentage de cytotoxicité} = \frac{[(\text{Abs}_{540\text{nm}} - \text{Abs}_{690\text{nm}})_{\text{cellules traitées}} / (\text{Abs}_{540\text{nm}} - \text{Abs}_{690\text{nm}})_{\text{cellules témoins}}] \times 100}$$

$$\text{Pourcentage de protection} = \frac{[(\text{Abs}_{540\text{nm}} - \text{Abs}_{690\text{nm}})_{\text{cellules traitées et infectées}} / (\text{Abs}_{540\text{nm}} - \text{Abs}_{690\text{nm}})_{\text{cellules témoins infectées}}] \times 100}$$

4. ANALYSE DES MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES NUCLEAIRES CARACTERISTIQUES DE L' APOPTOSE

4.1. Marquage par le DAPI

Le DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) est un marqueur fluorescent qui s'intercale entre les bases A-T de l'ADN. Son emploi permet notamment la mise en évidence des modifications morphologiques nucléaires liées à l'apoptose par observation des noyaux des cellules.

Dans les cellules normales colorées au DAPI, la taille des noyaux des cellules n'est pas réduite et on observe une fluorescence bleue peu intense. Tandis que la chromatine des noyaux des cellules en apoptose est condensée et l'intensité de fluorescence des noyaux colorés au DAPI est accrue. Dans les phases plus tardives on peut observer la fragmentation du noyau.

Après 20 min de fixation dans une solution de PBS-4% paraformaldéhyde (PAF), les cellules infectées et/ou traitées sont colorées par incubation 5 min à température ambiante avec une solution de DAPI (Sigma) à 0,5 µg/mL dans du PBS. Les cellules sont rincées puis observées au microscope à fluorescence (Leica), filtre BP 340-380 nm.

La technique de marquage par le DAPI est utilisée sur les deux modèles cellulaires (PC et GSMt-lac) suite à l'infection par la souche Visna ou le traitement par la staurosporine, mais également dans le cas des cellules de PC après infection et traitement par l'AZT.

4.2. Analyse de la fragmentation de l'ADN génomique

Les cellules de PC infectées et/ou traitées sont récupérées par trypsination puis solubilisées dans du tampon TE9S (20 µL/10⁶ cellules) (0,5 M EDTA, 10 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH = 9), 1% SDS) contenant 1 mg/mL de protéinase K (Sigma). Les échantillons sont incubés une nuit à 50 °C.

Après une nuit d'incubation, les protéines sont éliminées par extraction dans un mélange phénol-chloroforme 3 : 4 (v/v). Après centrifugation à 15000g pendant 10 min, le culot d'ADN est lavé par de l'éthanol à 70 %, puis séché et repris dans 25µL d'eau distillée stérile.

Les « ladders » sont visualisés par migration sur gel d'agarose (Invitrogen) 1,6% contenant 0,1 µg/mL de BEt (bromure d'éthidium) (Sigma) et observés sous UV.

La mise en évidence des ladders a été uniquement effectuée sur les cellules de PC infectées et/ou traitées (staurosporine ou AZT).

4.3. Mise en évidence de la présence d'une population sub-G1 par cytométrie de flux

Les cellules de PC, cultivées en flacon de culture de 25 cm², sont décollées puis récupérées puis centrifugées à 2000g pendant 10 min. Après deux lavages avec du PBS froid, les cellules sont perméabilisées et fixées par 1 mL d'éthanol à 70%, pendant 12 h à -20°C. Elles peuvent être conservées à -20°C au moins une semaine jusqu'à l'analyse.

Le culot cellulaire est lavé deux fois par du PBS, repris dans 500µL de PBS froid contenant 60 µL (soit 2400 U) de RNaseA (40 U, Roche Diagnostics) et incubé pendant 30 min à température ambiante. La RNaseA est préparée à une concentration de 100 mg/mL dans un tampon contenant (0,1 M Tris-HCl pH 7,6- 0,1 M NaCl), la DNase résiduelle est éliminée par chauffage 20 minutes à 100°C.

Les cellules sont ensuite incubées avec 25 µL d'iodure de propidium (IP) (Molecular probes) à 1mg/mL pendant 5 min à température ambiante et à l'obscurité. Elles sont alors analysées par cytométrie de flux (CMF) à l'aide d'un analyseur-trieur FACS Vantage (Becton Dickinson). Pour chaque échantillon, une analyse conditionnelle a été réalisée à l'aide d'un cytogramme FSC (Forward SCatter) versus SSC (Side SCatter), afin d'exclure les événements correspondants aux débris de petite taille et aux agrégats. 2.10⁴ cellules sont analysées par le logiciel Cell Quest (Becton-Dickinson, USA). L'excitation de l'IP s'effectue à 488 nm par le laser argon; l'émission de fluorescence rouge est recueillie à l'aide d'un filtre passe-haut de 600 nm. L'analyse de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire est réalisée avec le logiciel ModFit LT (Verity Software House, Inc., USA).

Cette expérience a été réalisée avec les cellules de PC infectées ou non, et traitées ou non par la staurosporine.

5. ETUDE DU POTENTIEL TRANSMEMBRANAIRE MITOCHONDRIAL ($\Delta\Psi_m$)

5.1. Analyse du potentiel transmembranaire mitochondrial par double marquage

Pour mettre en évidence la chute du potentiel mitochondrial transmembranaire ($\Delta\Psi_m$) observée au cours de l'apoptose, nous avons effectué un double marquage, avec deux fluorochromes JC-1 et TOTO-3.

Le 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide ou JC-1 permet de visualiser l'état du potentiel mitochondrial transmembranaire. La particularité du JC-1 est le passage de sa longueur d'onde d'émission du vert (525 nm) au rouge (590 nm) en fonction de l'état du potentiel mitochondrial transmembranaire.

Le 1,1-(4,4,8,8-tetraméthyl-4,8-diazaundecaméthylène)-bis-4-(3-méthyl-2,3-dihydro-(benzo-1,3-thiazole)-2-méthylidène)-quinolinium tétraiodide ou TOTO-3 est un fluorochrome intercalant de l'ADN de couleur bleue qui ne traverse pas les membranes cellulaires intactes mais pénètre dans les cellules mortes, dégradées ou abîmées (en nécrose ou apoptose secondaire). Les débris et agrégats (TOTO-3⁺) sont alors éliminés de l'analyse portant sur l'émission de fluorescence du JC-1. Ainsi, l'analyse concerne la population cellulaire TOTO-3⁻.

5.2. Mode opératoire

5.2.1. Analyse du $\Delta\Psi_m$ par CMF

Les deux fluorochromes JC-1 et TOTO-3 (Molecular probes) sont préparés dans du DMSO à une concentration de 1mg/mL et 1mM respectivement et conservés à -20°C.

Les cellules de PC sontensemencées puis cultivées dans des flacons de culture de 25 cm². Après 24 h d'adhésion, les cellules sont infectées, ou traitées par la staurosporine 1μM pendant 2h. Après différents temps d'infection ou de traitement, les cellules sont récupérées par trypsination, comptées puis ajustées à 1.10⁶ cellules/mL dans du milieu d'entretien. Les cellules sont alors incubées avec 1μg/mL de JC-1 pendant 30 min à 37°C puis avec 1 μM de TOTO-3, 5 min à 37°C, à la suite de quoi elles sont analysées par cytométrie de flux (CMF).

Après double marquage JC-1/TOTO-3, 1.10^4 cellules sont analysées, après élimination des débris et agrégats cellulaires, en CMF. La longueur d'onde d'excitation de JC-1 est 488 nm excité par le laser argon. La fluorescence verte du JC-1 est enregistrée en FL1 (530 nm \pm 15), alors que la fluorescence rouge de JC-1 est enregistrée en FL2 (575 nm \pm 13). TOTO-3 est excité à 633 nm par le laser hélium-néon et sa fluorescence est enregistrée en FL4 (650 nm). Les analyses cytofluorimétriques sont effectuées par le logiciel Win MDI 2.8. Les cytogrammes présentés expriment FL1 en fonction de FL2 ou FL4 vs FL2 pour les cellules témoins seulement.

5.2.2. Mise en évidence du potentiel mitochondrial membranaire par simple marquage (JC-1), *in situ*

Les cellules de PC sont ensemencées dans des supports Slideflask (2.10^5 cellules/Slideflask) et infectées ou traitées par 1 μ M de staurosporine pendant 2 heures. Après différents temps d'incubation, le milieu de culture est retiré et remplacé par 1 mL de milieu de culture contenant 1 μ g/mL de JC-1. Les cellules sont alors incubées 30 min à 37°C, rincées 1 fois avec du PBS et observées au microscope à fluorescence pour être photographiées.

L'étude du potentiel mitochondrial transmembranaire a été réalisée sur les cellules de PC infectées et/ou traitées par l'AZT ou le mésylate de nelfinavir, ou par la staurosporine. La technique a aussi été adaptée aux cellules de GSMt-lac infectées ou traitées par la staurosporine.

6. ETUDE DE L'EXPRESSION DES ARNm PAR RÉVERSE TRANSCRIPTION SUIVIE D'UNE RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (RT-PCR)

Cette étude a été réalisée sur les cellules de PC infectées ou non.

Les cellules de PC sont mises en culture dans des boîtes de pétri (Nunc) d'un diamètre de 35 mm à une densité de 5.10^5 cellules / boîte. Elles sont infectées 24 h après leur mise en culture.

6.1. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits des cellules de PC à l'aide du kit "High Pure RNA Isolation Kit" (Roche Diagnostics) qui nécessite 1.10^6 cellules/échantillon. Les cellules sont rincées avec 1 mL de PBS puis lysées avec 200 μ L de tampon de lyse (4,5 M guanidine hydrochloride, 50mM Tris-HCl, 30% Triton X-100; pH=6,6). Ce tampon permet la désorganisation des membranes, la libération des ARN puis leur adsorption spécifique sur une mini colonne constituée de deux couches de fibres de verre. L'ADN contaminant est digéré par 180 U de Dnase I. Les sels, les protéines et les autres impuretés cellulaires sont éliminés par lavages successifs avec deux solutions éthanoliques, la première contenant du guanidine hydrochloride (5M) et du Tris-HCl (20 mM) pH=6,6, la seconde contenant du NaCl (20mM) et du Tris-HCl (2 mM), pH=7,5. L'utilisation de solutions à forte concentration saline provoque la précipitation des protéines. Les ARN restent fixés sur la colonne et sont élués dans 100 μ L de tampon d'éluion. La concentration des ARN est déterminée par mesure de l'Abs à 260 nm et leur pureté par le rapport Abs_{260}/Abs_{280} . Les ARN sont stockés à $-80^{\circ}C$ jusqu'à leur utilisation. Les ARN totaux sont visualisés sur gel d'agarose 0,8% en présence de BEt.

6.2. RT-PCR

6.2.1. La réaction de transcription inverse (RT)

La réaction de transcription inverse est réalisée à l'aide du kit «RETROscript » (Ambion, Inc.). Elle permet la synthèse d'ADNc à partir des ARNm extraits.

1 µg d'ARN totaux est incubé 3 min à 70°C avec 2 µL d'amorces aléatoires (50µM) et 4 µL de dNTP Mix (10 mM de chaque : dATP ; dCTP ; dGTP ; dTTP), puis placé dans la glace. Le mélange suivant est alors ajouté : 2 µL de 10X RT-PCR buffer, 1 µL de RNase inhibitor et 100 U de reverse transcriptase M-MLV. Le mélange est incubé 1h à 42°C. La réaction est arrêtée par incubation 10 min à 92°C. Pour chaque série de réaction, un contrôle positif (0,5 µg d'ARN fournit dans le kit) est réalisé. Le contrôle positif fourni permet de s'assurer du bon déroulement de la réaction de RT.

Les ADNc obtenus sont conservés à -20°C.

6.2.2. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Le mélange réactionnel suivant est ajouté à 1 µL d'ADNc :

❖ 10X Thermophilic DNA polymerase Buffer (Promega)	2,5 µl
❖ MgCl ₂ (25 mM) (Promega)	1,5 µl
❖ dNTP Mix (10 mM) (Promega)	0,5 µl
❖ Amorce Reverse (R) (10 pM/µL) (Eurogentec) (Tableau 11)	1 µl
❖ Amorce Forward (F) (10 pM/µL) (Eurogentec) (Tableau 11)	1 µl
❖ Taq DNA Polymérase (5U/µL)	0,125 µl
❖ Eau distillée et stérile	qsp 25µL

Gènes	Numéro d'accession	Taille (pb)	Amorces
β-actine	OAU39357	2191	F : 5' gaaatcgctcgtgacatcaa 3' R : 5' aaggaaggctggaagagagc 3'
p53	OAP53	2155	F : 5' ctgggattctctctgctc 3' R : 5' cagcaccataaaaaggcact 3'
Caspase-3 (1)	AF068837 partiel	665	F : 5' atccttgaagagagttacaaaatg 3' R : 5' ttcggcttaaggactcaaattc 3'
Caspase-3 (2)	AF068837 partiel	429	F : 5' atccttgaagagagttacaaaatg 3' R : 5' gtctcaatgccacagtcaggctc 3'

Bcl-2*	A partir des gènes humain (M13994) et murin (MUSBCL21)	5086 (mRna) 2914 (Dna)	F : 5' tgtcacagaggggctacgagtggg 3' R : 5' gggtcaggtactcaggtcatccaca 3'
Bcl-2	A partir du gène humain (M13994)	5086 (mRna) 2914 (Dna)	F : 5' tgtcagcagaggggctacgagtggg 3' R : 5' caggtactcaggtcatccacagg 3'
Bcl-2 ''	A partir du gène humain (M13994)		F : 5' cagatggacctagtacccac 3' R : 5' ccatcagcttccagacattc 3'
Bax	AF163774 Partiel	446	F : 5' gcatccaccaagagctgag 3' R : 5' tgggtgtcccaagtaggag 3'
Bcl-xl	AF164517 Complet	766	F : 5' cccagaagggacagaaatcag 3' R : 5' tgtctggctattccgactg 3'
Bak	AF164518 Partiel	490	F : 5' cgctacgacacagagtcca 3' R : 5' acaaactggccaacagaaac 3'
G3PDH	AF030943 Partiel	836	F : 5' catctctgcaccttctgctg3' R : 5' gtcttctgggtggcagtgat3'

Tableau 11: Liste des amorces testées en RT-PCR

* : Shwartz-Cornil *et al.*, 1997, '' : amorces permettant d'amplifier par RT-PCR l'ARNm du gène Bcl-2 humain

L'amplification par PCR est réalisée dans un thermocycleur (Perkin Elmer) : elle débute par une dénaturation de l'ADNc : 10 min à 95°C, suivie des cycles de PCR :

- ❖ dénaturation des brins d'ADNc : 95°C-30 secondes,
- ❖ hybridation des amorces : Tm (°C)-30 secondes,
- ❖ polymérisation de l'ADNc : 72°C, 30 secondes.

35 cycles sont réalisés pour chaque gène mais la température d'hybridation (Tm) varie en fonction de chaque couple d'amorces (tableau 12). La séquence des amorces est déterminée par le programme PRIMER3 (Whitehead Institute for Biomedical research) (tableau 11) et comparée aux séquences stockées dans GENBANK. Les couples d'amorces non spécifiques du gène étudié sont éliminés.

Gènes	Température d'hybridation (°C) (Tm)	Taille amplifiat (pb)
β-actine	50	179
p53	50	404
Caspase-3 (1)	50, 52, 60	665
Caspase-3 (2)	60	429
Bcl-2 *	50, 52, 60	477
Bcl-2	50, 52, 60	476
Bcl-2 ''	58	463
Bax	50, 52	346
Bcl-xl	50	599
Bak	52	350
G3PDH	52	201

Tableau 12: Conditions expérimentales testées en RT-PCR

7. ANALYSE DES PROTÉINES CELLULAIRES PAR WESTERN-BLOT

Les cellules de PC sont ensemencées dans des flacons de culture de 75 cm² (Nunc) à une densité cellulaire de 1.10⁶ cellules/flacons dans du milieu d'entretien. Elles sont infectées par le virus Visna ou traitées par la staurosporine. Après différents temps, les cellules sont décollées du support grâce à la trypsine, récupérées dans du PBS et centrifugées à 2000g pendant 10 min. Les culots cellulaires sont séchés puis soient lysés immédiatement pour récupérer les protéines, soient congelés à -80°C.

7.1. Extraction des protéines

7.1.1. Extraction des protéines totales

Les culots cellulaires sont repris dans 100 µL/10⁶ cellules de tampon de lyse (50mM HEPES pH=7,5, 1% déoxycholate, Nonidet P40, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 20 µg/mL aprotinine). Cette solution est complétée par 200µL/mL d'inhibiteur de protéase [(Protease Cocktail Inhibitor (Sigma)]. La lyse des cellules est obtenue par 10 min d'incubation dans la glace ; après centrifugation à 15000g à 4°C pendant 20 min, le surnageant contenant toutes les protéines cellulaires est récupéré. Il sera ensuite dosé.

7.1.2. Extraction des protéines mitochondriales, cytoplasmiques et nucléaires

Le fractionnement : protéines mitochondriales/cytoplasmiques est réalisé avec un kit "Mitochondria/Cytosol Fractionation Kit" (Biovision). Une mise au point de ce protocole nous a permis de récupérer aussi les protéines nucléaires. Ce kit est composé d'un tampon d'extraction mitochondrial, d'un tampon d'extraction des protéines du cytosol (5X), de DTT (Dithiothreitol) 1M et d'un cocktail d'inhibiteur de protéases.

Pour cette extraction, 10⁷ cellules/échantillon sont nécessaires. Après lavage au PBS du culot cellulaire, celui-ci est resuspendu dans un mélange comprenant 1 mL de tampon d'extraction cytoplasmique, 1M de DTT et des inhibiteurs de protéase. Les cellules sont éclatées par plusieurs passages dans un broyeur électrique à 4°C.

L'homogénat est centrifugé à 700g pendant 10 min à 4°C ; le culot et le surnageant vont permettre l'obtention de la fraction nucléaire et cytoplasmique, respectivement :

❖ le culot est resuspendu dans 200 µL d'un tampon comprenant [500mM KCl, 25mM HEPES pH=7.8, 1mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 100µM DTT, 10% glycerol] et centrifugé à 20000g pendant 10 min. La fraction nucléaire est contenue dans le surnageant. Cette étape correspond à une adaptation du protocole du kit d'après Ye *et al.*, 1996.

❖ Le surnageant est récupéré puis centrifugé à 12000g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant correspond à la fraction cytoplasmique. Le culot issu de cette dernière centrifugation correspond à la fraction mitochondriale et est resuspendu dans un mélange comprenant 1 mL de tampon d'extraction mitochondrial, 1 µM de DTT et 2 µL de cocktail d'inhibiteur de protéases.

Chaque fraction protéique est dosée puis conservée à -20°C.

7.1.3. Dosage protéique de l'extrait cellulaire

La concentration protéique du lysat cellulaire est déterminée par la méthode de Bradford [(Bio-Rad's protein assay (Bio-Rad)]. Ce dosage protéique est basé sur les variations de couleur du colorant bleu de Coomassie G-250 en réponse à différentes concentrations de protéines. Le surnageant issu de l'extraction est mélangé au réactif de Bradford, incubé pendant 5 min dans la glace puis l'absorbance du mélange est lue à 595 nm. Au préalable une gamme étalon est réalisée avec différentes dilutions d'une solution de BSA (Bovine Serum Albumin) (Sigma). Les concentrations protéiques sont obtenues par report de l'Abs sur la droite étalon de BSA.

7.2. Western-blot

7.2.1. Préparation des échantillons

La quantité de protéines déposée sur les gels de polyacrylamide est de 30µg pour les différentes fractions et de 50 µg pour les extraits totaux. Chaque extrait cellulaire est mélangé avec un tampon de charge 2X volume à volume (50mM Tris-HCl pH=6,8, 100 mM β-mercaptoéthanol, 2% SDS, 0,1% bleu de bromophénol, 10% glycérol) (Sigma). Les échantillons sont portés à ébullition pendant 5 min pour dénaturer les protéines.

7.2.2. Electrophorèse des protéines en gel de polyacrylamide

7.2.2.1. Migration

Les protéines sont séparées par migration en SDS-PAGE "Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamide Gel". La concentration du gel en acrylamide/bisacrylamide varie de 10 à 15 % en fonction du poids moléculaire des protéines à analyser. Après le dépôt des échantillons, la migration s'effectue à voltage constant : 100 Volts pendant 3 h dans un tampon de migration (25 mM Tris-HCl, 250 mM glycine pH=8,3, 0,1% SDS) (Sigma).

7.2.2.2. Transfert sur membrane de nitrocellulose

Après électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (cellulose nitrate transfer membrane BioBond-NC (Whatman International Ltd)). Le transfert s'effectue dans une cuve à ampérage constant 20 mA. Le temps de transfert dépend de la taille des protéines à analyser ; plus la taille de la protéine est faible (d'environ 20 kda) plus le temps de transfert est important (3 h) sinon il est d'environ 1h30. Le transfert s'effectue dans un tampon (48 mM Tris-HCl, 39 mM Glycine, 0,037 % SDS 20 % méthanol) (Sigma). Les membranes sont récupérées et colorées au Rouge Ponceau (Sigma) pour s'assurer de la qualité du transfert puis décolorées à l'eau.

7.2.3. Incubation des membranes avec l'anticorps

Les membranes sont incubées pendant 1h à température ambiante sous agitation dans une solution de blocage composée de PBS-lait ou BSA (4%) en fonction de l'anticorps primaire utilisé (tableau 13) pour saturer les sites non spécifiques.

Les membranes sont rincées puis incubées une nuit à 4°C sous agitation avec l'anticorps primaire préalablement dilué (tableau 13).

Après une nuit, les membranes sont rincées 6 fois avec une solution de PBS-0,1% Tween 20 puis incubées avec l'anticorps secondaire dilué au 1/1000 dans la solution de blocage pendant 1h30 sous agitation et à température ambiante. Deux anticorps secondaires sont utilisés : Anti-IgG (H+L) de lapin, couplé à la HRP "horseradish peroxidase" et un Anti-IgG de souris, couplé à la HRP (DAKO) (tableau 14). Ensuite, les membranes sont à nouveau lavées avant révélation.

7.2.4. Révélation par réaction de chimiluminescence

Les membranes sont incubées pendant 1 min dans un mélange volume à volume des solutions 1 et 2 du réactif de chimiluminescence "ECL Western Blotting Detection Reagents" (Amersham Biosciences). Elles sont ensuite égouttées et mises au contact d'un film autoradiographique "Hyperfilm ECL" (Amersham Biosciences). Le temps de contact entre les membranes et le film varie en fonction de l'anticorps : de 5 sec à 5 min, afin d'obtenir un signal d'une intensité optimale. Les films sont alors révélés par un développeur automatique (Kodak Diagnostic Imaging, RP X-OMAT processor modèle M6B) et l'intensité de chaque signal présent sur le film est déterminée par le logiciel Kodak 1D.

Anticorps primaires dirigés contre	Produit chez	Fournisseur	Dilution de l'anticorps/solution de blocage
ANTI-APOPTOSIS-INDUCING FACTOR (AIF), humain	Lapin	SIGMA	1/1000 dans PBS-4% BSA
Anti-p53, Phospho-Specific, humain	Souris	CALBIOCHEM	Différentes conditions expérimentales testées
Anti-p53 (DO-1), humain	Souris	SANTA-CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.	Différentes conditions expérimentales testées
Polyclonal anti P53 protéine, humain	Lapin	EURO-DIAGNOSTICA	Différentes conditions expérimentales testées
Monoclonal antibody anti-human p53	Souris	BD PHARMINGEN	Différentes conditions expérimentales testées
Monoclonal Antibody to cytochrome c, mouton	Souris	ALEXIS BIOCHEMICALS	Différentes conditions expérimentales testées
Monoclonal antibody anti-cytochrome c	Souris	BD PHARMINGEN	1/1000 dans PBS-4% lait
Polyclonal Anti-Bax, humain	Lapin	DAKO	Différentes conditions expérimentales testées
Anti-Bax (B-9)	Souris	SANTA-CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.	Différentes conditions expérimentales testées
Monoclonal IgG anti-bcl-2	Souris	SANTA-CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.	1/100 dans PBS-4% lait
Monoclonal IgG anti-p21	Souris	SANTA-CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.	1/100 dans PBS-4% lait
Anti-actine	Lapin	SIGMA	1/5000 dans PBS-4% lait

Tableau 13: Conditions d'utilisation des anticorps primaires en western-blot

Dans le tableau 13, les différentes conditions expérimentales testées correspondent à :

- ❖ des solutions de blocage composées soit de PBS et BSA, soit de PBS et lait avec plusieurs pourcentages de lait ou BSA (1%, 2%, ou 5%),
- ❖ incubation de l'anticorps primaire pendant 2 h à température ambiante après une incubation des membranes de nitrocellulose d'une nuit dans la solution de blocage,
- ❖ différentes concentrations d'anticorps primaires (1/100, 1/200, 1/500 et 1/2000) ont été aussi testées.

Anticorps secondaires	Produit chez	Fournisseurs	Dilution/temps d'incubation
Anti- lapin IgG (H+L) couplé HRP	Chèvre	PROMEGA	WB : 1/1000 dans PBS
Anti-Souris couplé HRP	Lapin	DAKO	WB : 1/1000 dans PBS-lait 4%

Tableau 14: Conditions d'utilisation des anticorps secondaires

La technique d'analyse des protéines par western-blot a été appliquée aux cellules de PC infectées ou traitées par la staurosporine.

8. EXPRESSION DES PROTÉINES CELLULAIRES PAR IMMUNOCYTOCHIMIE

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 8 puits (Nunc) (2.10^4 cellules/puits) puis infectées par le virus Visna. Après différents temps d'incubation, les cellules sont fixées dans une solution de PBS-4% PAF pendant 20 min à température ambiante et rincées 3 fois 5 min au PBS.

Le protocole d'immunocytochimie varie suivant l'anticorps utilisé. Les conditions d'utilisation des anticorps primaires et secondaires sont dressées dans les deux tableaux 15 et 16. Les étapes suivantes sont identiques pour tous les anticorps :

Une fois fixées, les cellules de PC sont perméabilisées avec une solution de PBS contenant 0,1 % sodium-citrate-0,1% triton X100 (Sigma) dans du PBS pendant 20 min à température ambiante. Après lavages au PBS, elles sont incubées avec une solution de blocage PBS-0,1 % BSA pendant 45 min à température ambiante. Puis, les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire dilué (tableau 15) dans une solution de PBS-0,1 % BSA, toute une nuit à 4 °C. Après trois rinçages au PBS sous agitation, l'anticorps secondaire généralement couplé au FITC, dilué dans du PBS (tableau 16), est mis en présence des cellules 1h30 à 37 °C et à l'obscurité. Après trois rinçages au PBS, les cellules sont observées au microscope à fluorescence (filtre FITC, BP 450-490nm).

Anticorps primaires dirigés contre	Produit chez	Fournisseur	Dilution/temps d'incubation
ANTI-APOPTOSIS-INDUCING FACTOR (AIF), humain	Lapin	SIGMA	1/500, 1 nuit à 4°C dans PBS-0,1% BSA
Anti-p53, Phospho-Specific, humain	Souris	CALBIOCHEM	1/100, 1 nuit à 4° dans Tris buffer saline (TBS)-0,1% BSA
Anti-p53 (DO-1), humain	Souris	SANTA-CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.	1/500, 1 nuit à 4°C dans PBS-0,1% BSA
Polyclonal anti P53 protéine, humain	Lapin	EURO-DIAGNOSTICA	1/200, 1 nuit à 4°C dans PBS-0,1% BSA
Monoclonal antibody anti-cytochrome c	Souris	BD PHARMINGEN	1/200, 1 nuit à 4°C dans PBS-0,1% BSA
Polyclonal Anti-Bax, humain	Lapin	DAKO	Différentes conditions expérimentales testées
Anti-Bax (B-9)	Souris	SANTA-CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.	Différentes conditions expérimentales testées
Monoclonal IgG anti-bcl-2	Souris	SANTA-CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.	1/100, 1 nuit à 4°C dans PBS-0,1% BSA

Tableau 15: Conditions d'utilisation des anticorps primaires en immunocytochimie

Les différentes conditions expérimentales testées correspondent à des essais de dilutions de l'anticorps primaires allant de 1/100 à 1/1000 et dilués dans la solution de blocage.

Anticorps secondaires	Produit chez	Fournisseurs	Dilution/temps d'incubation
Anti-souris couplé à la fluoresceine	Lapin	Valbiotech	1/500 dans PBS
Anti- lapin couplé à la fluoresceine	Souris	Valbiotech	1/500 dans PBS

Tableau 16 : Conditions d'utilisation des anticorps secondaires en immunocytochimie

Comme pour la technique d'analyse des protéines par Western-blot, l'immunocytochimie a été utilisée sur les cellules de PC infectées ou traitées par la staurosporine.

9. ACTIVITÉS CASPASES

9.1. Dosage des activités caspases

Les cellules sont ensemencées dans des flacons de culture de 75 cm² (Nunc). Elles sont infectées et/ou traitées par la staurosporine ou par l'AZT. Après différents temps de traitement, les cellules sont trypsinées, centrifugées à 2000 g pendant 10 min à 4°C. Les culots cellulaires sont congelés à -80°C jusqu'au dosage.

Les cellules sont lysées par un tampon contenant 10 % Triton X-100/0,1 % citrate de sodium. Le dosage des protéines s'effectue selon la méthode de Bradford décrite dans le chapitre 7.1.3.

Pour réaliser le dosage des activités caspases à l'aide du kit (CaspACE Assay Sytem, Fluorometric, Promega), la quantité de protéines totales doit être comprise entre 7,5 µg/µL et 10 µg/µL. Ce kit permet la mise en évidence des activités caspase-3 et caspase-1. Ce principe de dosage a ensuite été adapté à la recherche des activités caspases -8 et -9.

	Substrats	Inhibiteurs	Fournisseurs
Caspase-3	Ac-DEVD-AMC	Ac-DEVD-CHO	Promega
Caspase-1	Ac-YVAD-AMC	Ac-YVAD-CHO	Promega
Caspase-8	Ac-IETD-AMC	Z-DEVD-FMK	Bachem Biochimie
Caspase-9	Ac-LEHD-AMC	Z-DEVD-FMK	Bachem Biochimie

Tableau 17 : Les différents substrats et inhibiteurs de caspases utilisés

Les substrats et inhibiteurs choisis sont spécifiques de chaque caspase étudiée. Les conditions expérimentales réalisées par le laboratoire de Microbiologie ont été publiées (Duval *et al.*, 2002).

Les substrats et inhibiteurs utilisés sont solubilisés dans du DMSO puis dilués dans de l'eau à une concentration de 2,5 mM et conservés à -20°C. Ils sont utilisés à une concentration finale de 5.10⁻⁵ M.

Un standard d'AMC (7-amino-4-méthyl coumarine) est fourni dans le kit. Il nous permet d'étalonner le lecteur de plaque à fluorescence. Les longueurs d'onde d'excitation de l'AMC sont respectivement 360-380 nm et 460-480 nm. Nous avons utilisé un filtre d'excitation de 365 nm (± 25) et un filtre d'émission 510 nm (± 30).

Une fois le dosage protéique réalisé, les différents échantillons à tester sont disposés dans une plaque 96 puits blanches à fond plat (Nunc), selon le tableau suivant :

	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 98 µL	qsp 54 µL
Incubation 30 min à 37°C			
H2O	-	-	2 µL
Substrat Caspase (2,5mM)	2 µL	2 µL	-
Incubation 2h à 37°C			

Tableau 18 : Distribution des réactifs pour le dosage des activités caspases (Duval, 2003).

* : le volume de chaque échantillon est toujours ajusté pour avoir une quantité de protéines égale à 75 µg.

Après 2 h 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 correspondante.

L'activité des caspases a été recherchée sur les cellules de PC infectées et traitées par l'AZT, ainsi que sur les cellules traitées par la staurosporine et/ou traitées par l'AZT.

Seule l'activité de la caspase-3 a été recherchée sur les cellules de GSMt-lac infectées ou traitées par la staurosporine.

9.2. Marquage *in situ* par le FITC-VAD-FMK

Le FITC-VAD-FMK ("CaspACE FITC-VAD-FMK In Situ Marker" (Promega)) est synthétisé sur la même base que le z-VAD-FMK, inhibiteur de caspases. Le FITC-VAD-FMK fonctionne donc comme un inhibiteur de caspases à large spectre. Il pénètre naturellement les membranes cellulaires sans qu'il y ait une perméabilisation préalable des cellules. Ce composé permet un marquage *in situ* sur cellules vivantes.

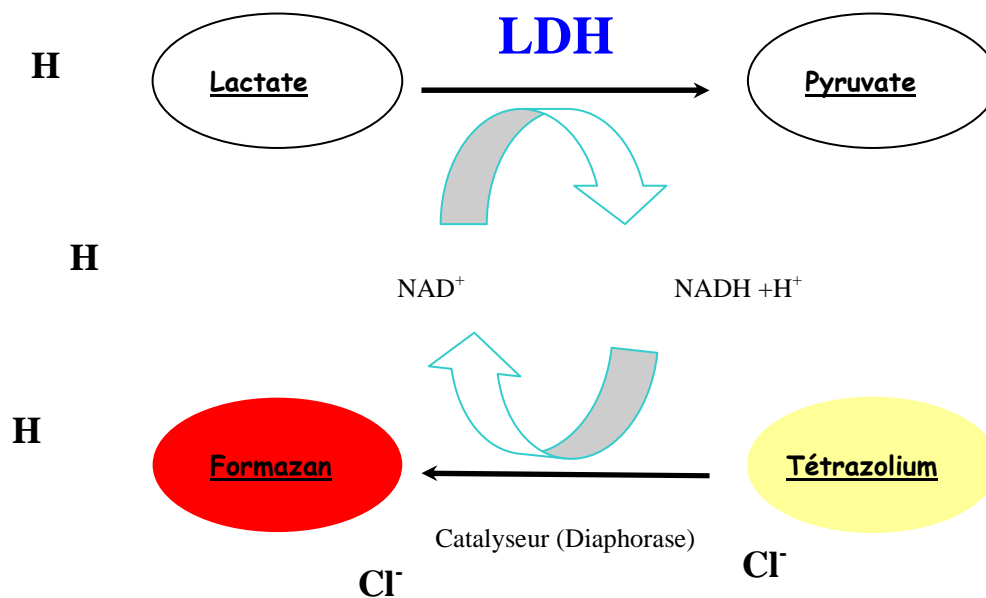
Les cellules sontensemencées sur des supports "chambre 8 puits" (Lab Tek I, Nunc), infectées ou traitées. Après différents temps de traitement, le milieu de culture est remplacé par du milieu d'entretien contenant le marqueur *in situ* à une concentration finale de 10^{-4} M. Après 8 h d'incubation à 37°C et à l'obscurité, les cellules sont fixées comme décrit précédemment, rincées et montées. L'observation s'effectue au microscope à fluorescence (Filtre FITC).

Le marquage in situ par le FITC-VAD-FMK a été réalisé sur les cellules de PC infectées et/ou traitées par l'AZT.

10. DOSAGE DE L'ACTIVITÉ LDH (LACTATE DÉSHYDROGÉNASE)

10.1. Principe

Cette technique permet la mesure de la libération de LDH dans le milieu de culture et la mise en évidence de la perte de l'intégrité membranaire. Le principe du kit " Cytotoxicity Detection kit" est basé sur une réaction enzymatique entre la LDH et son substrat le lactate, qui une fois métabolisé, libère des protons H^+ qui réduisent le colorant et modifient sa coloration. La réaction est colorimétrique. Plus la libération de LDH dans le milieu extracellulaire est importante, plus la coloration marron formée s'intensifie.



10.2. Mode opératoire

Les cellules sontensemencées dans des plaques 96 puits et infectées comme décrit précédemment. Différents contrôles sont réalisés :

- ❖ deux contrôles négatifs : des cellules sont cultivées en absence de virus et en présence (C^{-a}) ou non d'AZT (C^-)
- ❖ deux contrôles positifs correspondant à 100% de cytotoxicité : les cellules sont incubées en présence (C^{+a}) ou non d'AZT (C^+) puis lysées par une solution de Triton X-100 10% dans du PBS pendant 15 min à $37^\circ C$.

La plaque est divisée en deux, d'une part les cellules infectées par le virus Visna, d'autre part les cellules infectées et traitées par 25 µM d'AZT. A différents temps post-infection, les surnageants de culture sont récupérés. Après centrifugation à 1000g pendant 10 min et à 4°C, 100 µL de surnageant de culture sont introduits dans une nouvelle plaque 96 puits. Le mélange réactionnel, contenant le lactate, un indicateur coloré et le catalyseur, est ajouté aux surnageants (100 µL/ puit). Après 10 min d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'Abs est mesurée à 490 nm à l'aide d'un lecteur ELISA.

10.3. Calcul du pourcentage de cytotoxicité

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

$$\% \text{ de cytotoxicité} = (\text{Abs essai} - \text{Abs C}^-) / (\text{Abs C}^+ - \text{Abs C}^-)$$

$$\% \text{ de cytotoxicité (en présence d'AZT)} = (\text{Abs essai} - \text{Abs C}^{-a}) / (\text{Abs C}^{+a} - \text{Abs C}^{-a})$$

où :

- ❖ Abs essai : absorbance de l'échantillon testé
- ❖ Abs C⁻ : absorbance du contrôle négatif en absence d'AZT
- ❖ Abs C⁺ : absorbance du contrôle positif en absence d'AZT
- ❖ Abs C^{-a} : absorbance du contrôle négatif en présence d'AZT
- ❖ Abs C^{+a} : absorbance du contrôle positif en présence d'AZT

Le relargage de la LDH a été recherché sur les deux types cellulaires infectées et/ou traitées par l'AZT.

RESULTATS

1. MISE EN ÉVIDENCE DE L'ECP INDUIT PAR LE VIRUS VISNA, *IN VITRO*

Lorsque le virus Visna infecte les cellules de PC *in vitro*, les **syncytia** sont mis en évidence très facilement dans la culture par simple coloration par le May-Grünwald et le Giemsa.

La figure 26 présente des cellules de PC en culture (A). Les fibroblastes de PC sont des cellules fusiformes qui forment un tapis cellulaire très organisé. La photo B montre l'ECP caractéristique des cellules de PC infectées par le virus à savoir des syncytia (flèche) et une lyse cellulaire. Les syncytia sont la conséquence de la fusion d'un nombre variable de cellules, avec 3 à 60 noyaux par syncytium. **Ils sont visibles dès trois jours post-infection.**

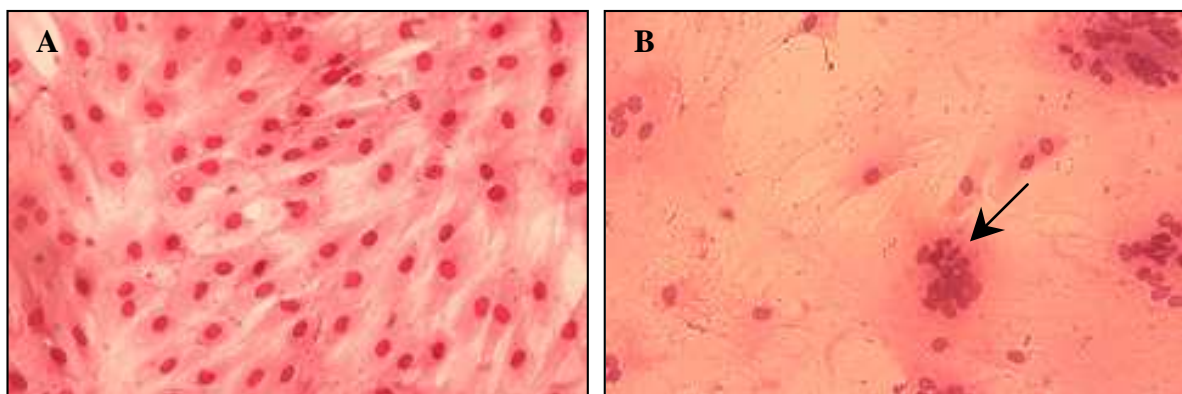


Figure 26 : Coloration des cellules de PC au MGG

A : cellules de PC témoins (grossissement x200)

B : cellules de PC infectées par le virus Visna (MOI=0,1) après 4 jours pi (x200)

2. LES VOIES IMPLIQUÉES DANS L'APOPTOSE VISNA-INDUITE

2.1. Mise en évidence de l'expression de l'ARNm de gènes pro- ou anti-apoptotiques

Dans le but de mettre en évidence l'expression de l'ARNm des gènes impliqués dans l'apoptose puis d'étudier leur variation dans les cellules de PC infectées ou non, nous avons recherché des couples d'amorces spécifiques de chaque gène à identifier. Certains gènes d'intérêt impliqués dans l'apoptose sont séquencés entièrement chez le mouton, comme *Bcl-X_L* ; ou partiellement, c'est le cas des gènes *p53*, *caspase-3*, *Bak* et *Bax*, pour lesquels seul un fragment de gène est disponible dans les banques de données. Les résultats de RT-PCR obtenus avec les différents couples d'amorces testés sont répertoriés dans le tableau 19 :

Gènes	Taille amplifiat (pb)	Résultats
β -actine	179	+
p53	404	+
Caspase-3	665	-
Caspase-3	429	+
Bcl-2*	477	-
Bcl-2	476	-
Bcl-2''	463	-
Bax	346	-
Bcl-xl	599	+
Bak	350	+
G3PDH	201	+

Tableau 19 : Résultats obtenus par la technique de RT-PCR avec les couples d'amorces testés

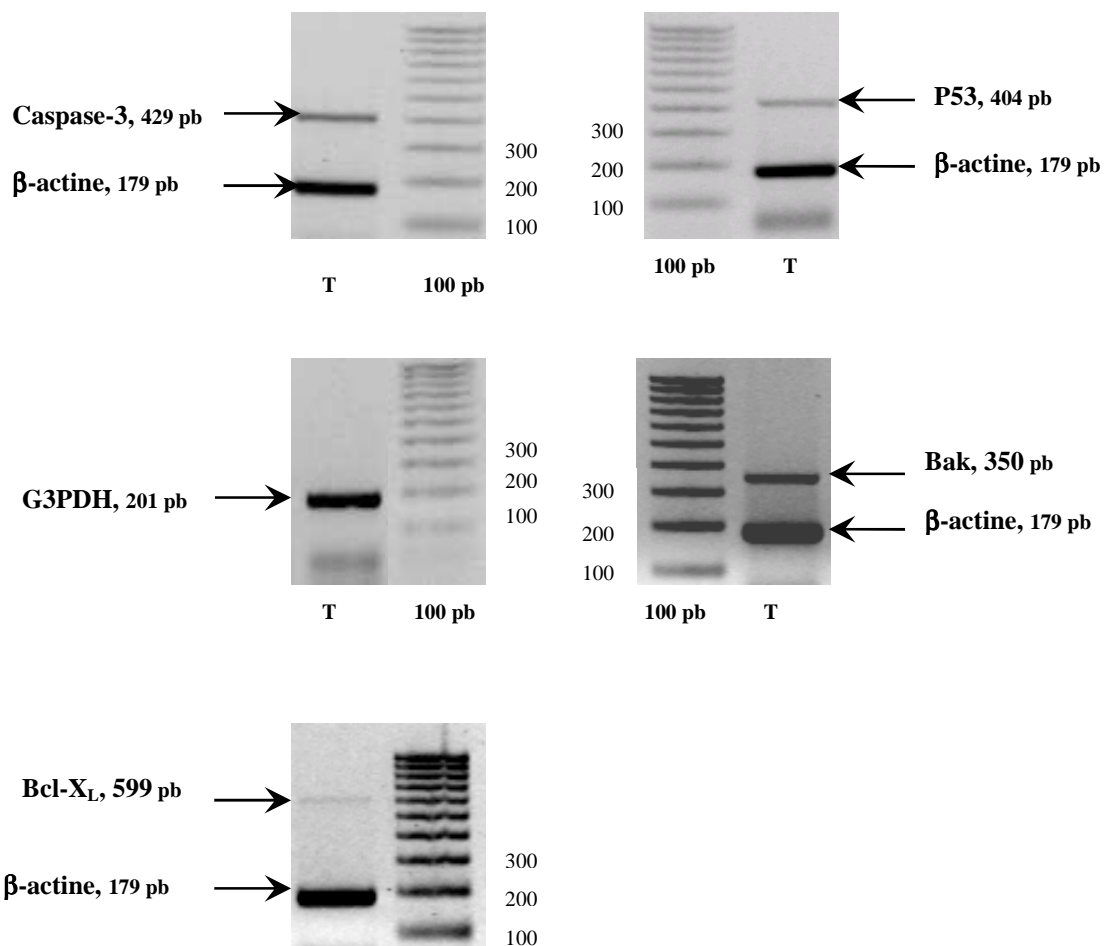
Comme le montre le tableau 19 et la figure 27, seuls les ARNm des gènes *p53*, *caspase-3*, *Bak* et *Bcl-X_L* ont été mis en évidence dans notre modèle cellulaire. Les gènes *β -actine* et *G3PDH* (glycéraldéhyde-3-phosphodéshydrogénase) appelés « gènes témoins » servent de contrôle pour la RT-PCR. Normalement leur expression ne varie pas au cours de

l'apoptose et dans les différentes conditions expérimentales testées. Nous n'avons pas réussi à mettre en évidence l'expression de l'ARNm de Bcl-2 ou Bax dans les cellules de PC après avoir testé plusieurs couples d'amorces différents.

Le manque de reproductibilité des expériences de RT-PCR ne nous a pas permis de semi-quantifier l'expression de ces gènes. En revanche, nous avons montré que les ARNm exprimés dans les cellules de PC témoins le sont aussi dans les cellules de PC infectées par le virus Visna (figure 28). Notre modèle est restreint à la mise en évidence d'un petit nombre de gènes dans les cellules infectées : *caspase-3*, *p53*, *Bak* et *Bcl-X_L*.

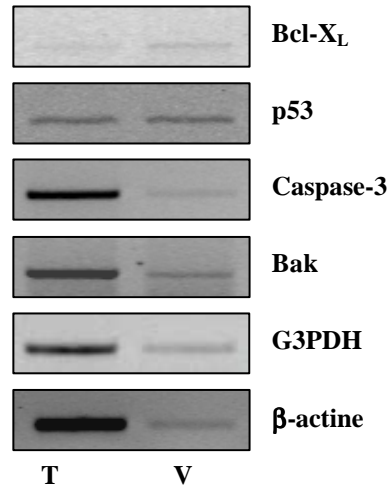
Figure 27: Mise en évidence de l'expression des ARNm dans les cellules de PC témoins

T : cellules de PC témoins ; 100 pb : marqueur de poids moléculaires



**Figure 28 : Mise en évidence de l'expression des ARNm dans les cellules de PC infectées
par le virus Visna à 3 jours pi**

T : cellules de PC témoins ; V : cellules de PC après 3 jours d'infection



2.2. La voie intrinsèque mitochondriale est activée au cours de l'apoptose Visna-induite

2.2.1. Mise en évidence de la chute du $\Delta\Psi_m$

2.2.1.1. Analyse par CMF

La chute du $\Delta\Psi_m$ est un évènement apoptotique précoce qui apparaît avant les modifications morphologiques nucléaires et précède le relargage des molécules apoptogènes mitochondriales. Pour étudier cette chute, lors de l'apoptose Visna-induite, nous avons effectué un **double marquage avec deux fluorochromes JC-1 et TOTO-3** suivi d'une analyse par CMF sur cellules en suspension.

Lorsque les membranes mitochondriales des cellules sont intègres et possèdent un **potentiel élevé**, les molécules de JC-1 pénètrent dans la mitochondrie en grand nombre et forment des agrégats qui émettent **une fluorescence rouge-orange**. Lors d'une **chute du potentiel mitochondrial membranaire**, les molécules de JC-1 entrent dans les mitochondries en quantité moindre et restent sous forme de monomères qui **fluorescent dans le vert**.

La figure 29 présente les cytogrammes FL-1 vs FL-2 obtenus pour chaque condition expérimentale testée. **La fluorescence verte du JC-1 est recueillie en FL-1 tandis que la fluorescence rouge-orange est en FL2**. Le cytogramme n°1 présente la fluorescence du TOTO-3 (FL4) en fonction de la fluorescence rouge du JC-1 (FL2), pour les cellules témoins. Ce cytogramme montre que TOTO-3 permet de séparer les deux populations cellulaires présentes dans les témoins c'est à dire la population «**TOTO-3⁺**» correspondant **aux cellules mortes ou abîmées** et la population «**TOTO-3⁻**», **cellules intactes et saines** qui sont imperméables à TOTO-3. L'analyse des variations de fluorescence du JC-1 sera effectuée sur la population « TOTO-3⁻ », après élimination des cellules mortes.

A partir des cytogrammes, il est possible de déterminer le pourcentage de cellules possédant un $\Delta\Psi_m$ élevé (tableau 20).

Le cytogramme n°3 présente l'analyse des cellules après traitement par 1 μ M de staurosporine pendant 2h ; 46,8% des cellules ont un $\Delta\Psi_m$ élevé contre 88,8% pour les témoins (cytogramme n°2).

Les cytogrammes 4 à 10 présentent la cinétique d'infection par le virus Visna. On observe une chute de $\Delta\Psi_m$ après le premier jour d'infection avec 71,4% des cellules avec un haut $\Delta\Psi_m$

(cytogramme n°4). Le pourcentage de cellules avec un $\Delta\Psi_m$ élevé reste relativement constant jusqu'à 5 jours pi. A partir de 6 jours pi, le pourcentage de cellules avec un $\Delta\Psi_m$ élevé commence à chuter pour atteindre 19,8% à 7 jours pi. Ainsi, le potentiel mitochondrial transmembranaire ne chute pas progressivement au cours de l'infection. Nous observons une chute de $\Delta\Psi_m$ immédiatement après l'infection, suivie d'un plateau jusqu'à 5 jours pi avec sans changement significatif ; après 5 jours d'infection, le $\Delta\Psi_m$ chute brutalement.

L'infection des cellules de PC par le virus Visna provoque une chute importante du $\Delta\Psi_m$ à partir de 5 jours pi.

2.2.1.2. Révélation de la chute du $\Delta\Psi_m$ par marquage *in situ* avec le fluorochrome JC-1

Afin de visualiser et de confirmer les résultats obtenus en CMF sur cellules en suspension, nous avons réalisé **un marquage *in situ* avec le fluorochrome JC-1 sur cellules adhérentes**, infectées ou traitées par la staurosporine. Les cellules sont observées et photographiées au microscope à fluorescence.

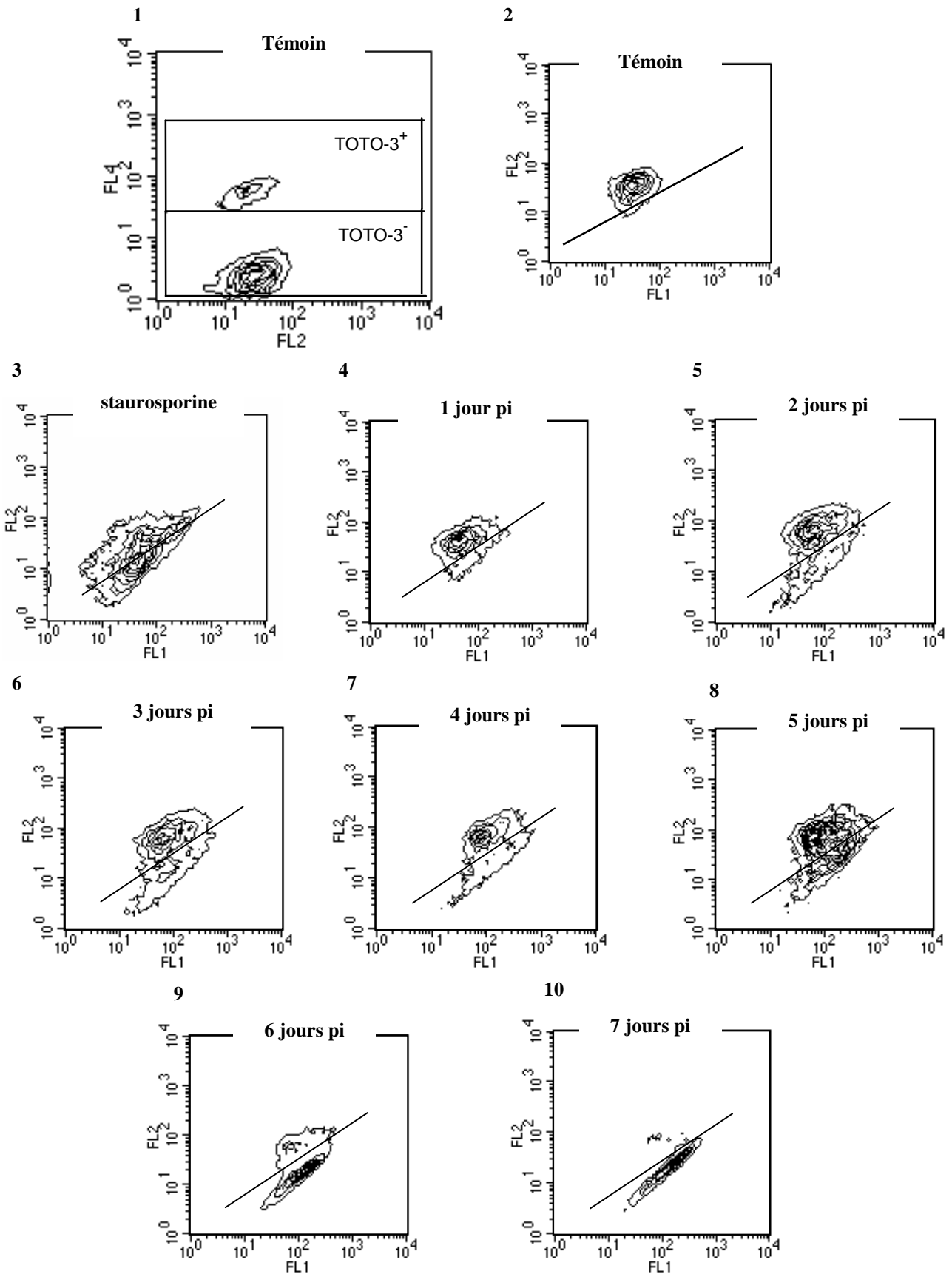
Sur la figure 30, la photo A nous montre le marquage JC-1 **dans les cellules témoins. Ces cellules ont une fluorescence rouge** due aux agrégats de JC-1 présents dans les mitochondries, caractéristiques d'un $\Delta\Psi_m$ élevé. La photo B représente le marquage JC-1 obtenu dans des **cellules traitées par 1 μ M de staurosporine pendant 2h**. Après traitement par l'inducteur chimique, 2h uniquement, puisque nous observons un événement apoptotique précoce : **un grand nombre de cellules présentent une importante fluorescence verte**. De plus, on distingue deux sortes de mitochondries : à la périphérie du noyau, les mitochondries sont vertes, alors que dans les prolongements formés par le rétrécissement cellulaire, les mitochondries sont rouges donc intactes ; dans les cellules témoins, les mitochondries de toute la cellule sont rouges.

Les photos C et D, E et F présentent les cellules de PC marquées par JC-1 et infectées pendant 3 jours et 5 jours, respectivement. Elles nous permettent de confirmer les résultats obtenus lors de l'analyse par CMF. Après trois jours pi, on observe des cellules isolées ayant des mitochondries rouges et vertes (photos C) c'est à dire avec ou sans chute de $\Delta\Psi_m$. La photo D nous montrent que dès trois jours pi, les mitochondries des syncytia sont vertes : une chute de $\Delta\Psi_m$ s'observe donc aussi dans les syncytia. Après 5 jours pi, le nombre de cellules présentant une chute de potentiel mitochondrial est comparable à celui à 3 jours pi. **En**

revanche, à 7 jours pi, un grand nombre de syncytia présentent une fluorescence verte (photos G et H).

Ces résultats se corrélaient aux résultats obtenus lors de l'analyse par CMF, nous confirmons une légère chute de $\Delta\Psi_m$ à 3 et 5 jours pi, constante entre 3 et 5 jours, puis très marquée à 7 jours pi.

Figure 29 : Analyse par CMF de la chute du $\Delta\Psi_m$ suite à l'infection par le virus Visna



FL1 : fluorescence verte; FL2 : fluorescence rouge ; FL4 : fluorescence de TOTO-3
Ces résultats sont représentatifs de trois expériences différentes.

Conditions expérimentales	Pourcentage de cellules avec un $\Delta\Psi_m$ élevé
Témoin	88,8
staurosporine	46,8
1 jour pi	71,4
2 jours pi	74,4
3 jours pi	67,5
4 jours pi	66,1
5 jours pi	67,9
6 jours pi	36,2
7 jours pi	19,8

Tableau 20 : Résultats de l'analyse des cytogrammes FL2 versus FL1

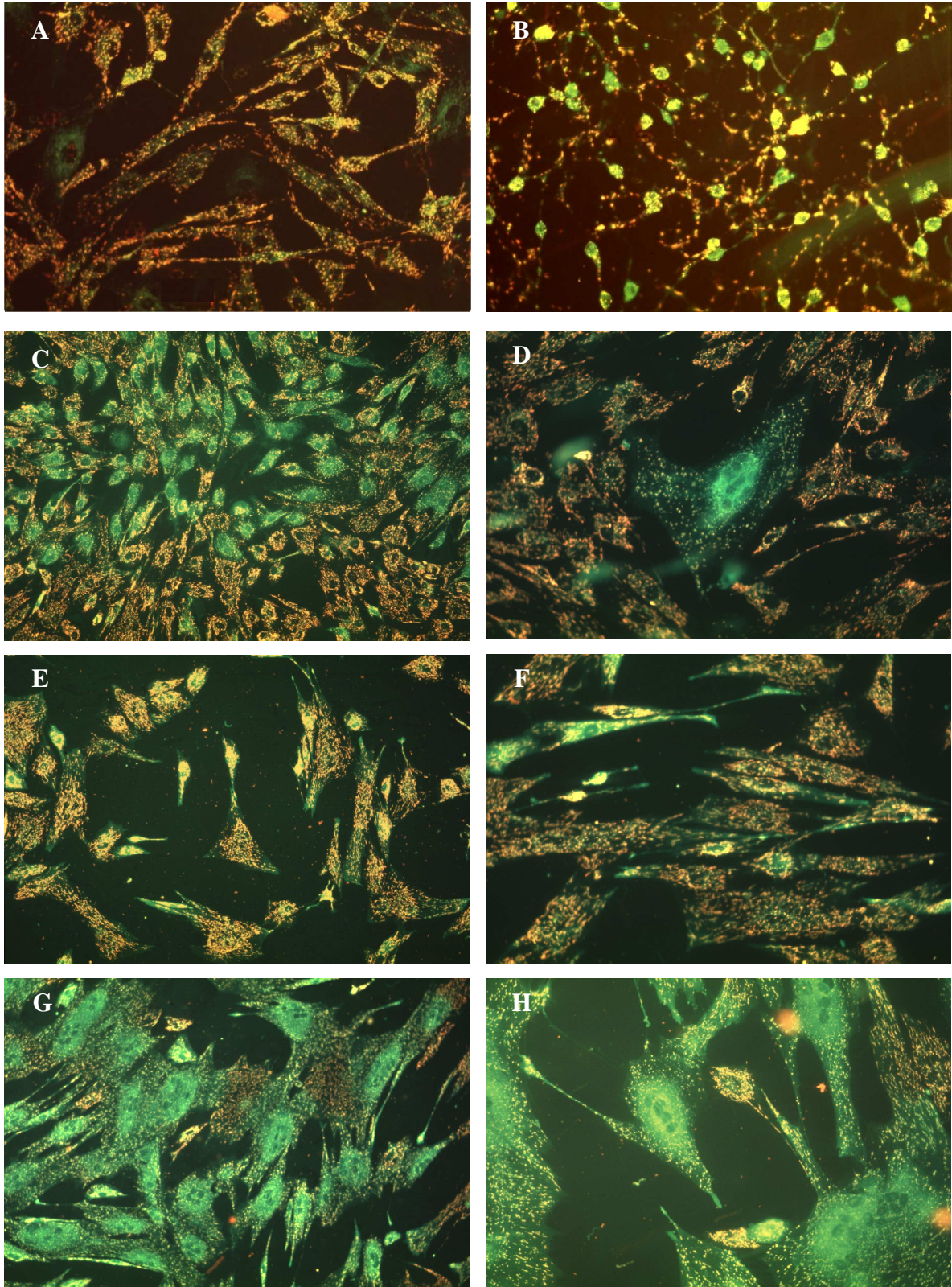


Figure 30 : Marquage *in situ* des cellules de PC par le JC-1

A : cellules de PC témoins ; B : Cellules de PC traitées par la staurosporine (1 μ M, 2h).
 B et C : cellules de PC après 3 jours d'infection par le virus Visna ; E et F : 5 jours pi ;
 G et H : 7 jours pi. Pour les photos C, E, G : grossissement x200 ; A, B, D, F, H : x100

2.2.2. Le choix des anticorps

Par les techniques de western-blot et immunocytochimiques, nous avons analysé les différentes voies apoptotiques induites par le virus Visna. Pour aboutir aux résultats présentés dans les paragraphes suivants, nous avons testé un grand nombre d'anticorps. Les anticorps utilisés et les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux 21 et 22.

Anticorps primaires dirigés contre	Résultats obtenus sur PC	Fournisseurs
AIF, humain	+	SIGMA
Anti-p53, phospho-specific, humain	+	CALBIOCHEM
Anti-p53 (DO-1), humain	+	SANTA-CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.
Polyclonal anti P53, humain	+	EURO-DIAGNOSTICA
Monoclonal antibody anti-cyt-c, humain	+	BD PHARMINGEN
Polyclonal Anti-Bax, humain	-	DAKO
Anti-Bax (B-9)	-	SANTA-CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.
Monoclonal IgG anti-bcl-2	+	SANTA-CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.

Tableau 21 : Résultats obtenus en immunocytochimie

Anticorps primaires dirigés contre	Résultats obtenus sur PC	Fournisseurs
AIF, humain	+	SIGMA
Anti-p53, phospho-specific, humain	-	CALBIOCHEM
Anti-p53 (DO-1), humain	-	SANTA-CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.
Polyclonal anti P53, humain	-	EURO-DIAGNOSTICA
Monoclonal antibody anti-human p53	-	BD PHARMINGEN
Monoclonal Antibody to cyt-c, mouton	-	ALEXIS BIOCHEMICALS
Monoclonal antibody anti-cyt-c, humain	+	BD PHARMINGEN
Polyclonal Anti-Bax, humain	-	DAKO
Anti-Bax (B-9)	-	SANTA-CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.
Monoclonal IgG anti-bcl-2	+	SANTA-CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.
Monoclonal IgG anti-p21	+	SANTA-CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.
Anti-actine	+	SIGMA

Tableau 22 : Résultats obtenus en western-blot

2.2.3. Le virus Visna provoque la libération de l'AIF et du cytochrome c

La libération des molécules apoptogènes se produit après la chute du $\Delta\Psi_m$. Au cours de l'apoptose, le cytochrome c et l'AIF sont libérés par la mitochondrie.

2.2.3.1. Mise en évidence de l'expression du cyt-c

Lors de l'apoptose, le cytochrome c est libéré de la mitochondrie, migre dans le cytoplasme de la cellule où il se lie à APAF-1 pour former l'apoptosome et activer la caspase-9.

La figure 31-A présente l'expression du cyt-c dans les cellules de PC témoins ou infectées par le virus Visna, après **extraction des protéines totales** de la cellule. La figure 31-B présente les blots obtenus après traitement des cellules de PC par la staurosporine. L'expression de l'actine sert de contrôle pour vérifier si la quantité de protéines analysées ne varie pas d'un échantillon à l'autre. **L'expression du cyt-c augmente en fonction du temps d'infection** et la quantification des blots nous permet de démontrer que son expression augmente de 2 fois à 3 jours pi, de 3 fois à 5 jours pi et de 4,5 fois à 7 jours pi, par rapport aux cellules témoins. L'expression du cytochrome c double dans les cellules traitées par la staurosporine, par rapport au témoin.

La figure 32 nous montre l'expression des protéines AIF et cyt-c **dans les différents compartiments cellulaires** en fonction du stimulus apoptotique : infection par le virus Visna (32-A) ou traitement par la staurosporine (32-B). Nous avons vérifié la qualité de nos extractions grâce à l'actine, protéine présente uniquement dans la fraction cytosolique (FC). Notre technique d'extraction nous permet d'enrichir les différentes fractions en protéines issues du cytosol, de la mitochondrie ou du noyau. Quelques légères contaminations existent néanmoins.

Sur la figure 32-B, on observe le relargage du cyt-c dans le cytoplasme des cellules traitées par la staurosporine : il est présent en grande quantité dans la fraction FC, mais n'est pas détecté dans la fraction FC des témoins. La quantité de cyt-c est élevée dans la fraction mitochondriale (FM) des cellules traitées par la staurosporine, comparativement au témoin, confirmant une augmentation de l'expression du cyt-c lors du traitement par la staurosporine.

Dans les cellules infectées par le virus, la figure 32-A nous **montre un relargage du cyt-c à 3 jours pi**. Une augmentation du cyt-c dans la fraction FM à 3 jours pi est aussi

détectée dans le témoin. A 5 et 7 jours pi, le cyt-c disparaît aussi bien de la fraction FC que de la fraction FM.

Le relargage du cyt-c de la mitochondrie dans le cytoplasme s'effectue après trois jours d'infection par le virus Visna.

2.2.3.2. Mise en évidence du relargage de l'AIF

L'AIF migre de la mitochondrie vers le noyau de la cellule apoptotique où il provoque des cassures de l'ADN ; il active la voie indépendante des caspases.

Contrairement au cyt-c, **la quantité d'AIF ne varie pas dans les cellules infectées par le virus Visna** comparativement au témoin (figure 31-A), son expression ne varie pas non plus après traitement par la staurosporine (figure 31-B).

La staurosporine provoque le relargage de l'AIF de la mitochondrie (FM) et sa migration dans le noyau (FN) (figure 32-B) : une bande correspondant à l'AIF est détectée dans le noyau des cellules traitées, mais pas dans ceux du témoin.

Dans la fraction FM (figure 32-A), l'expression de l'AIF augmente à 3 jours pi de 3 fois par rapport au témoin mais aucune variation de l'expression de l'AIF n'est observée au cours de l'infection : entre 3 jours pi, 5 jours pi et 7 jours pi. **Nous mettons en évidence la translocation de l'AIF dans le noyau des cellules de PC infectées par le virus.** L'AIF est absent des noyaux (FN) des témoins. En revanche, il est présent dans les noyaux des cellules infectées à 3 jours pi et son expression augmente de 2,5 fois à 5 jours pi par rapport à 3 jours pi. A 7 jours pi son expression diminue : elle est en effet plus basse qu'à 3 jours pi (0,5 fois).

Ainsi, l'infection par le virus Visna provoque la libération de l'AIF et du cyt-c. L'AIF migre dans le noyau des cellules infectées apoptotiques et le cyt-c dans le cytoplasme. Le traitement par la staurosporine provoque le même effet sur les cellules de PC. **L'infection par le virus Visna et le traitement par la staurosporine activent donc la voie intrinsèque mitochondriale et la voie indépendante des caspases.**

2.2.3.3. Expression de l'AIF et du cyt-c par immunocytochimie

Sur la figure 33, les cellules non infectées et marquées par l'anticorps fluorescent anti-cyt-c (BD Pharmingen) présentent une très légère fluorescence verte (A). Dans le cas du traitement par la staurosporine (B), l'intensité de fluorescence est forte dans toute la cellule.

Le rétrécissement cellulaire provoqué par ce traitement chimique nous empêche de localiser le marquage. **Dans le cas des cellules infectées (C, D et E), aux différents temps d'infection présentés, la libération du cyt-c est mise en évidence dans les cellules individuelles (C et D) et dans les syncytia (E),** caractérisant une libération du cyt-c de la mitochondrie vers le cytoplasme des cellules infectées. A deux jours pi, une augmentation de fluorescence n'est observée que dans quelques cellules (C). A 3 jours pi, toutes les cellules individuelles sont fortement marquées (D). A fort grossissement, la photo E nous permet d'observer que des syncytia sont fortement marqués autour des noyaux, à 3 jours pi.

Après utilisation d'un anticorps anti-AIF, on observe sur la figure 34, un très léger marquage vert diffus dans les cellules témoins (A). Après 2 jours d'infection par le virus Visna, le marquage vert très intense se localise dans les noyaux des cellules infectées (C). Après 3 jours pi (D), les noyaux des syncytia sont aussi très fortement marqués par le FITC. **Le relargage de l'AIF dans le noyau des cellules infectées est observé dans les cellules individuelles mais aussi dans les syncytia.**

La libération de l'AIF de la mitochondrie et sa translocation dans le noyau des cellules sont aussi observées après traitement par la staurosporine (B) avec une intensité exacerbée dans les noyaux.

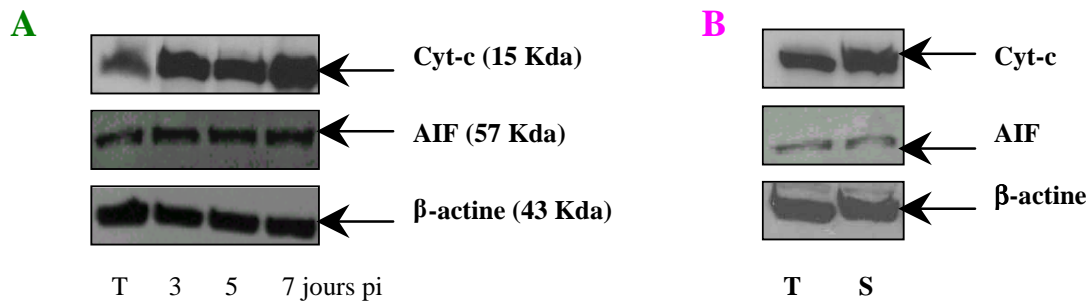


Figure 31 : Expression des protéines AIF et cyt-c par western-blot à partir d'extraits protéiques totaux

T : témoin ; S : traitement par la staurosporine (0,5 μ M ; 5h)

A : résultats obtenus après différents temps d'infection par le virus Visna

B : résultats obtenus après traitement par la staurosporine

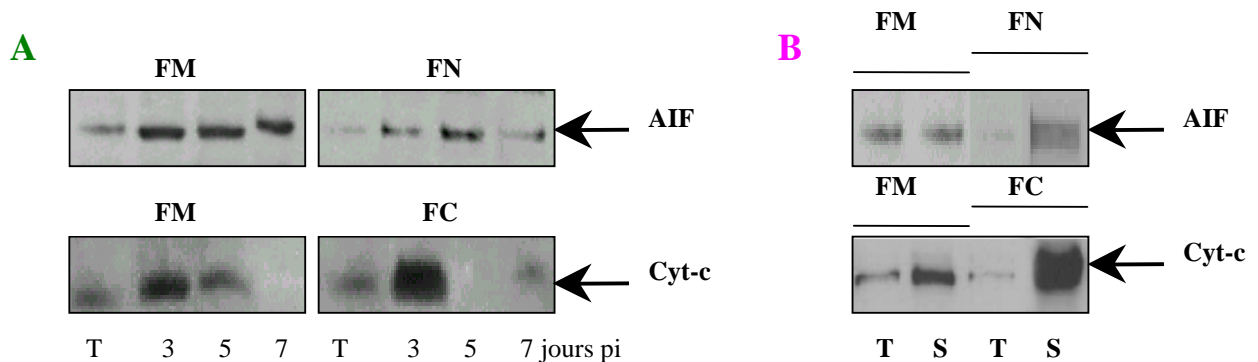


Figure 32 : Expression des protéines AIF et cyt-c dans les différents compartiments cellulaires des PC par western-blot

FM : Fraction mitochondriale

FC : Fraction cytosolique

FN : Fraction nucléaire

T : témoin ; S : traitement par la staurosporine (0,5 μ M ; 5h)

A : résultats obtenus après différents temps d'infection par le virus Visna

B : résultats obtenus après traitement par la staurosporine

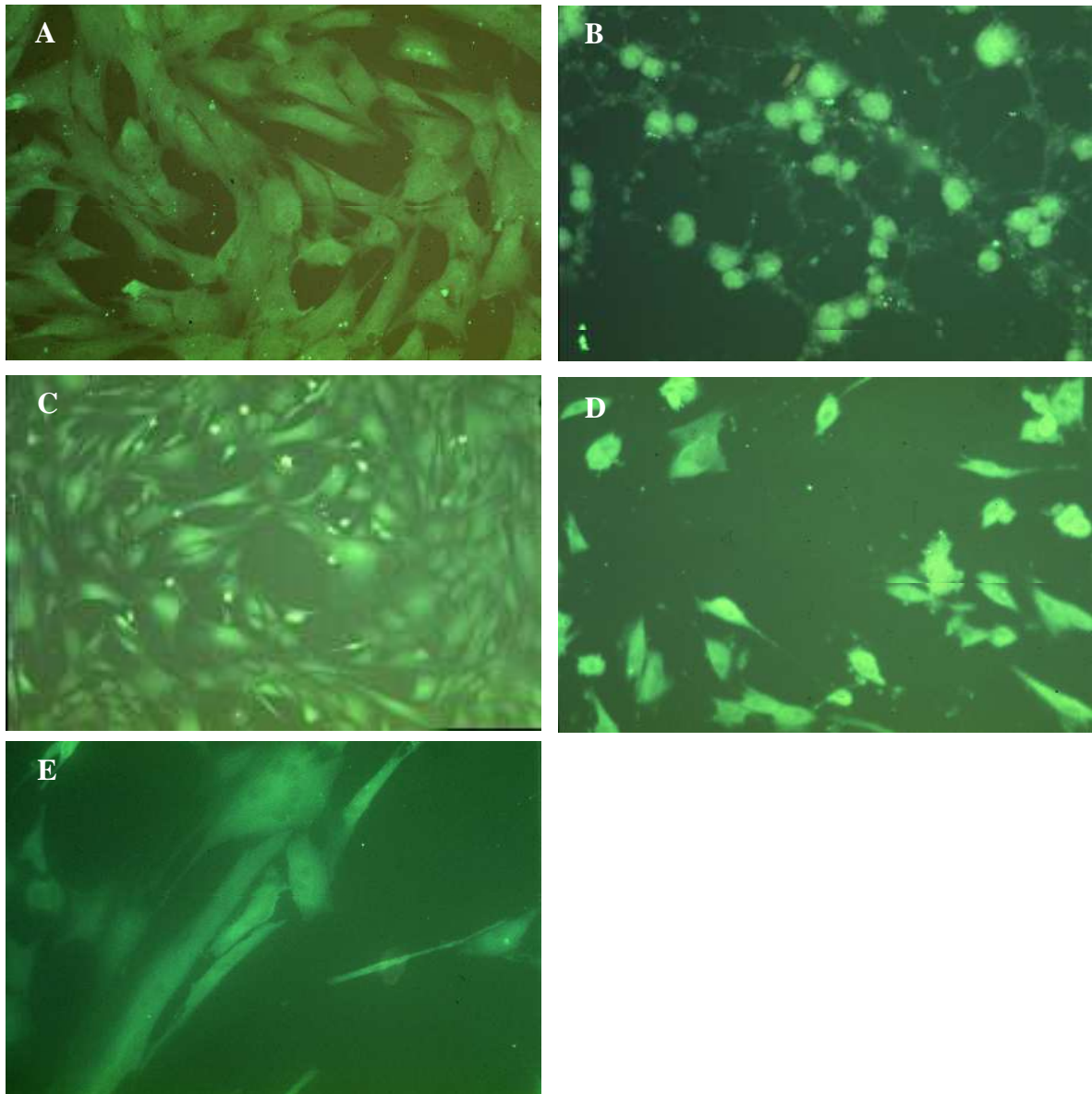


Figure 33 : Etude de la libération du cytochrome c par immunocytochimie

A : cellules de PC témoins (x200) ; B : cellules de PC traitées par 0,5 μ M de staurosporine pendant 5h (x200)

C, D : cellules infectées par le virus Visna à 2 jours et 3 jours pi, respectivement (x200)

E : cellules infectées par le Visna à 3 jours pi (x400)

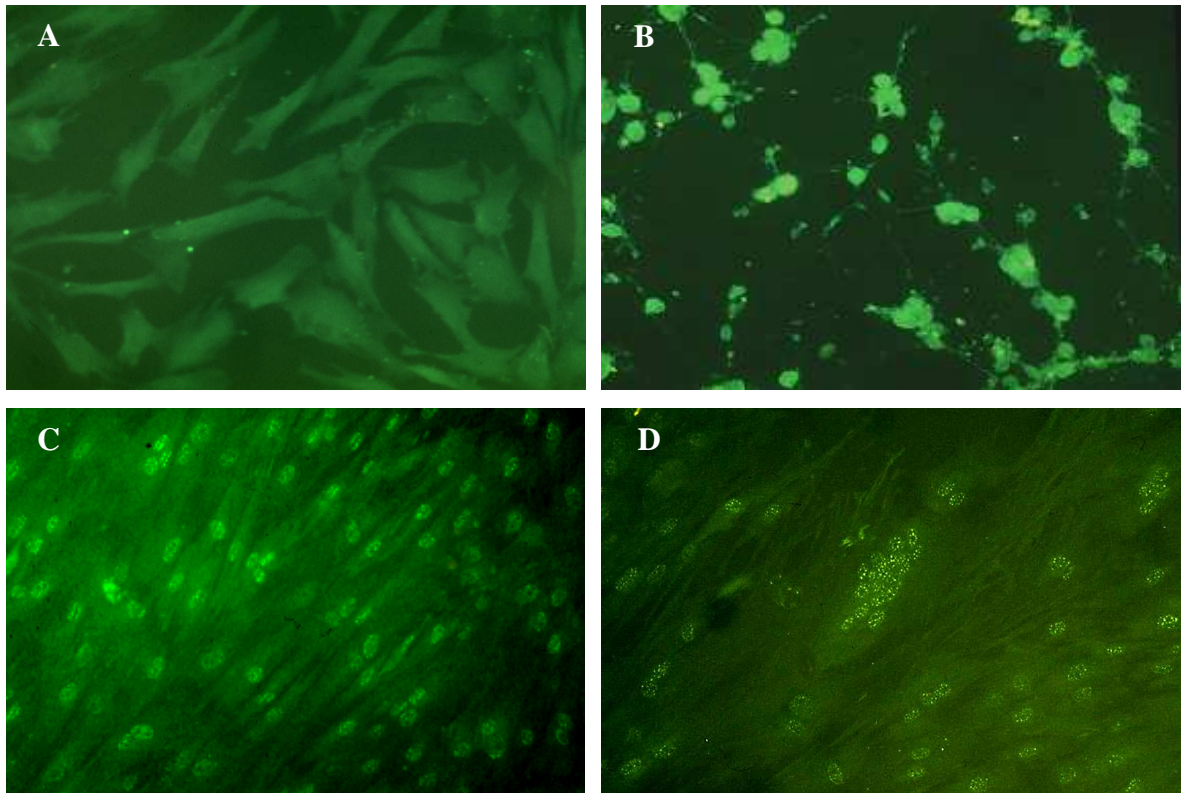


Figure 34 : Etude de la libération de l'AIF par immunocytochimie

A : cellules de PC témoins

B : cellules de PC traitées par 0,5 μ M de staurosporine pendant 5 h

C et D : cellules de PC infectées à 2 et 3 jours pi, respectivement

2.2.4. L'infection par le virus Visna provoque une baisse de l'expression de la protéine Bcl-2

Nous avons recherché si le virus Visna modifie l'expression des protéines pro- ou anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Nous nous sommes intéressés aux **protéines Bcl-2 et Bax, molécules anti- et pro-apoptotiques**, respectivement. Les membres de cette famille influencent la balance entre la vie et la mort cellulaire. **Bax et Bcl-2** ont notamment pour **rôle de réguler la formation des pores mitochondriaux** qui permettent la libération des molécules apoptogènes.

En ce qui concerne l'expression de la protéine Bcl-2 dans les cellules de PC infectées ou non par le virus, la figure 35 montre que son expression est basse dans les cellules de PC non infectées (T) comparativement à celle de l'actine. **L'expression de Bcl-2 diminue à 3 jours pi ; après 5 jours et 7 jours pi, la protéine n'est plus exprimée dans les cellules de PC infectées.**

Par marquage *in situ* à l'aide de l'anticorps anti-Bcl2 (figure 36), les cellules non infectées (A) présentent une fluorescence verte très diffuse et peu intense. Les cellules traitées par la staurosporine fluorescent avec une intensité caractéristique (B). **Seulement quelques cellules de PC infectées après 3 jours pi (C) émettent un signal de fluorescence visible**, comparativement aux cellules témoins. A partir de 5 jours pi, le marquage fluorescent est identique aux témoins.

Les résultats du western-blot sont en accord avec les marquages immunocytochimiques : la protéine Bcl-2 est très peu exprimée dans les cellules de PC et l'infection par le virus inhibe totalement son expression.

Concernant la molécule pro-apoptotique Bax, nous avons testé deux anticorps anti-Bax différents aussi bien en western-blot qu'en marquage immunocytochimique. Aucun des deux anticorps utilisés ne nous a permis de mettre en évidence l'expression de la protéine Bax dans notre modèle cellulaire ovin, comme cela a aussi été le cas pour l'ARNm.

Figure 35 : Expression de la protéine Bcl-2 par western-blot

T : cellules de PC témoins

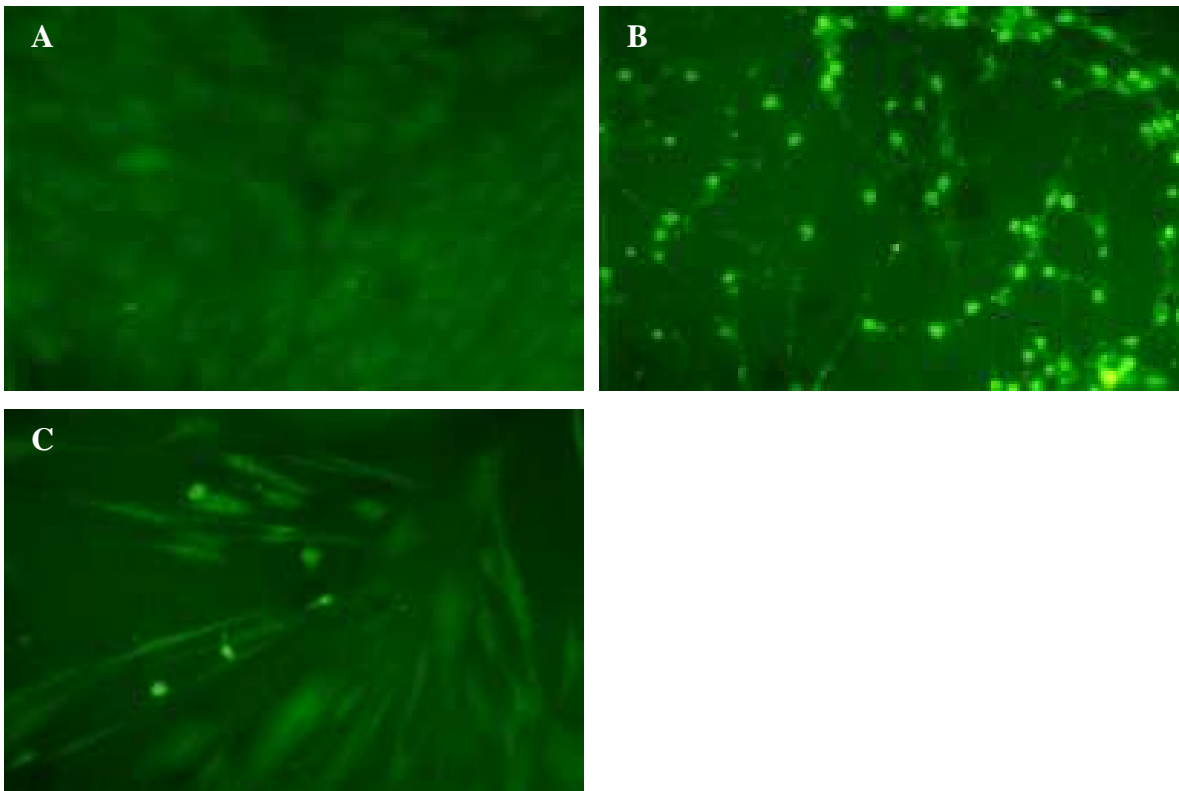
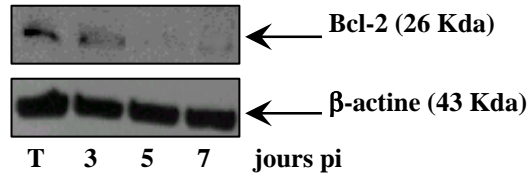


Figure 36 : Expression de la protéine Bcl-2 par immunocytochimie

A : cellules de PC témoins (x200)

B : cellules de PC traitées par 0,5 μM de staurosporine pendant 5 h (x200)

C : cellules de PC infectées par le virus Visna à 3 jours pi (x200)

2.2.5. p53 et p21 régulent l'apoptose Visna-induite

2.2.5.1. Expression de la protéine p53

De nombreuses perturbations cellulaires conduisent à l'activation de la protéine p53. Cette protéine provoque soit l'arrêt du cycle cellulaire soit l'apoptose. Pour être active, p53 subit des modifications post-traductionnelles en particulier des phosphorylations. Nous nous sommes intéressés à la phosphorylation de p53 sur une sérine spécifique : la sérine 392. Nous avons effectué deux types de marquage : soit par un anti-p53 soit par un anti-p53 phosphorylée. Les anticorps ont été testés respectivement en western-blot et en immunomarquage.

Par western-blot, nous n'avons pas pu mettre en évidence la protéine p53 : aucun des quatre anticorps anti-p53 humain n'a permis de révéler la présence de la protéine p53 ovine.

Par immunocytochimie, nous avons obtenu des réponses par immunomarquage identiques avec les 3 anticorps différents : la figure 37 en est un exemple avec l'anticorps EURODIAGNOSTICA. Les cellules témoins (A) présentent une fluorescence faible et diffuse, traduisant une faible expression basale de p53 dans les cellules de PC non infectées. Le traitement chimique par la staurosporine induit une fluorescence plus nette (B). **Après 4 et 7 jours d'infection par le virus Visna (C et D), une augmentation de l'expression de la protéine p53** est visible comparativement aux cellules témoins.

L'expression de la protéine p53 phosphorylée sur la sérine 392, démontrant que celle-ci est active, a été recherchée. Un double marquage FITC/DAPI a permis de visualiser le même champ optique (figure 38). Dans les cellules de PC non infectées (A), le marquage FITC montre que l'expression de p53 phosphorylée est diffus : le cytoplasme comme le noyau des cellules fluorescent en vert. La photo B nous permet de confirmer, par marquage DAPI, l'absence de condensation et de fragmentation nucléaire caractéristique de l'apoptose dans les cellules de PC non infectées avec une fluorescence bleue faible au niveau des noyaux. Dans le cas des cellules infectées (C, D, E et F), la fluorescence verte est augmentée. Le double marquage FITC (C) et DAPI (D) avec observation du même champ, montre que la fluorescence verte est augmentée et localisée dans les noyaux des cellules infectées. Elle est plus intense à 7 jours (E) qu'à 4 jours pi (C). La fluorescence verte FITC des noyaux correspond aux noyaux condensés en DAPI.

Ainsi, l'infection des cellules de PC par le virus Visna augmente l'expression de la protéine p53 et induit son activation par phosphorylation sur la sérine 392.

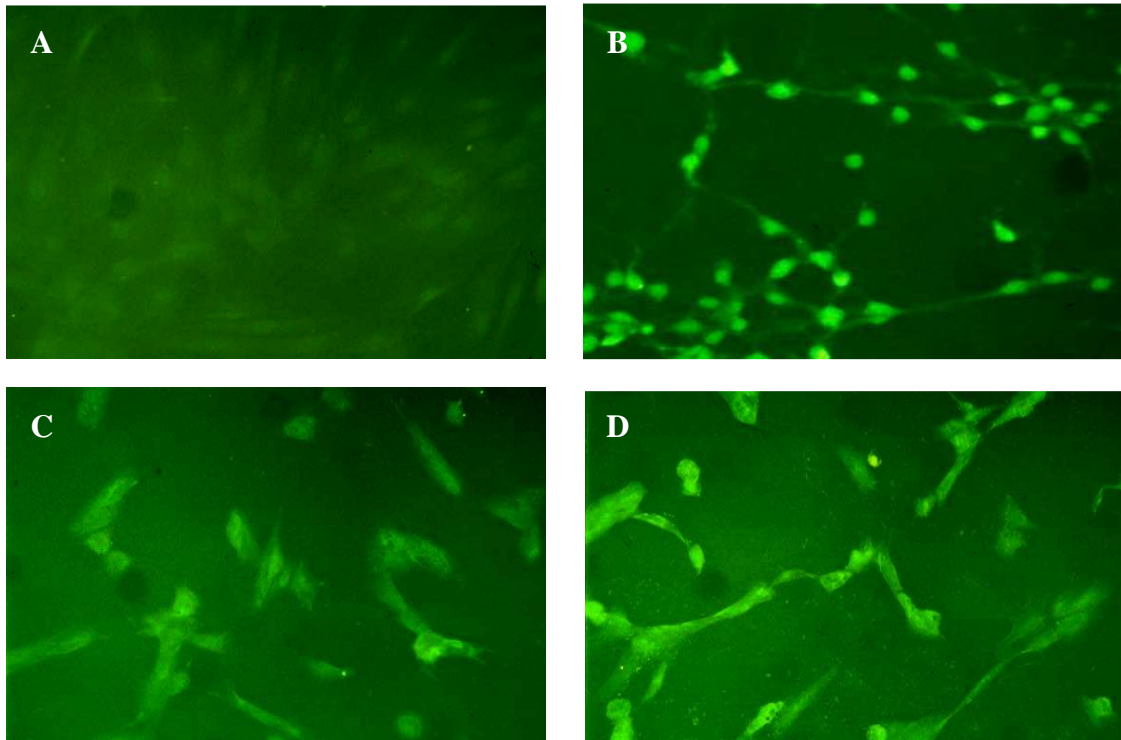


Figure 37 : Expression de la protéine p53 par immunocytochimie

A : cellules de PC témoins (x200)

B : cellules de PC traitées par 0,5 μ M de staurosporine pendant 5 h (x200)

C et D : cellules de PC infectées par le Visna, 4 jours pi et 7 jours pi, respectivement (x200)

Ces résultats sont obtenus avec l'anticorps EURODIAGNOSTICA.

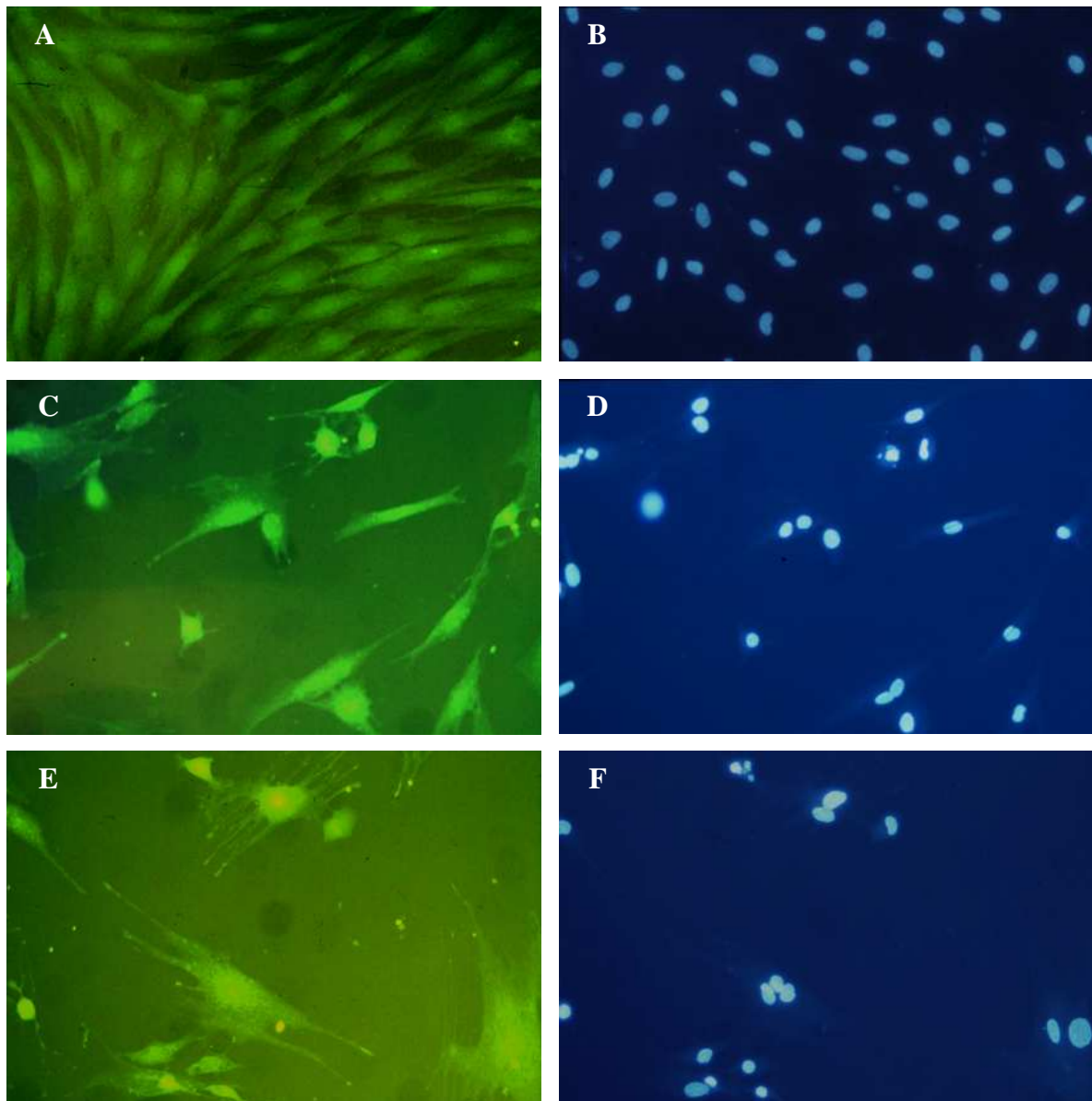


Figure 38 : Double marquage p53 phosphorylée/DAPI

A et B : expression de p53 phosphorylée et marquage DAPI dans les cellules témoins (x200)

C et D : Double marquage anti-p53 phosphorylée/DAPI dans les cellules de PC infectées par le virus, à 4 jours pi.

E et F : Double marquage anti-p53 phosphorylée/DAPI dans les cellules de PC infectées par le virus, à 7 jours pi.

Pour les cellules infectées, le double marquage DAPI/FITC est présenté sur le même champ.

2.2.5.2. Etude de l'expression par western-blot d'une des cibles transcriptionnelles de p53 : la protéine p21

Après avoir démontré que l'infection par le virus Visna augmente l'expression de la protéine p53 avec une localisation nucléaire de la protéine active, il a été intéressant de rechercher si ce facteur de transcription active l'expression du gène p21.

Par western blot, on observe sur la figure 39 que l'expression de la protéine p21 reste constante à 3 et 5 jours pi comparativement aux cellules de PC non infectées. Elle est toujours augmentée à 7 jours pi, 3 fois plus que dans les cellules témoins. L'analyse du cycle cellulaire présentée plus loin (figure 42) nous démontrera qu'il n'y a pas d'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules infectées, bien que l'expression de p21 augmente.

Ainsi, l'infection des cellules de PC par le virus Visna augmente l'expression de la protéine p21.

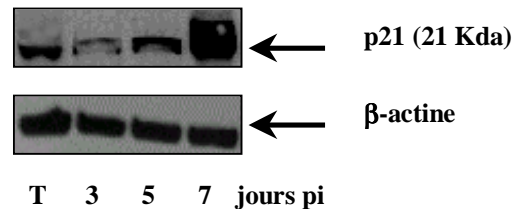


Figure 39 : Expression de la protéine p21 par western-blot

T : cellules de PC témoins

2.3. Implication des caspases dans l'apoptose Visna-induite

Après avoir mis en évidence l'activation de la voie intrinsèque mitochondriale (cyt-c) et de la voie indépendante des caspases (AIF), nous allons montrer que le virus Visna induit l'activation des caspases. Pour cela, nous avons recherché, dans les cellules de PC infectées ou non :

- ❖ **l'activité de la caspase-3** : caspase effectrice majeure responsable par exemple du clivage internucléosomal de l'ADN
- ❖ **l'activation de la caspase-9** par formation de l'apoptosome suite à la libération du cyt-c
- ❖ et enfin celle de **la caspase-8**, caspase initiatrice impliquée dans la voie des récepteurs de mort.

L'activité de chaque caspase est mise en évidence grâce à l'utilisation de couples substrat/inhibiteur spécifiques de chacune des caspases (figure 40).

Dans le cas de cellules infectées et en présence du substrat correspondant, **la caspase-3 est activée** avec une augmentation significative **dès 5 jours pi**, soit 214,25 URF contre 184 pour le témoin. Cette activité augmente progressivement pour atteindre une valeur élevée à 7 jours pi (543,5 URF). En présence du couple substrat/inhibiteur spécifique de la caspase-3, aucune variation d'activité caspase-3 n'est mise en évidence au cours des différents temps d'infection.

En ce qui concerne la caspase-8, son activité augmente significativement à partir de 6 jours pi avec un taux de seulement 167,5 URF contre 145,75 pour le témoin. En revanche, son activité est constante entre 6 et 7 jours pi. En présence du couple substrat/inhibiteur spécifique de la caspase-8, aucune variation d'activité caspase-8 n'est mise en évidence au cours des différents temps d'infection.

Dans le cas des cellules infectées, l'activité caspase-9 augmente en fonction du temps d'infection. Comme pour la caspase-8, son activité ne devient significative qu'à 6 jours pi (185,75 URF). Elle augmente encore à 7 jours pi (192,5 URF).

La caspase-1, une caspase inflammatoire, n'est pas activée dans les cellules infectées par le virus Visna avec des valeurs d'URF très proches de celles du témoin.

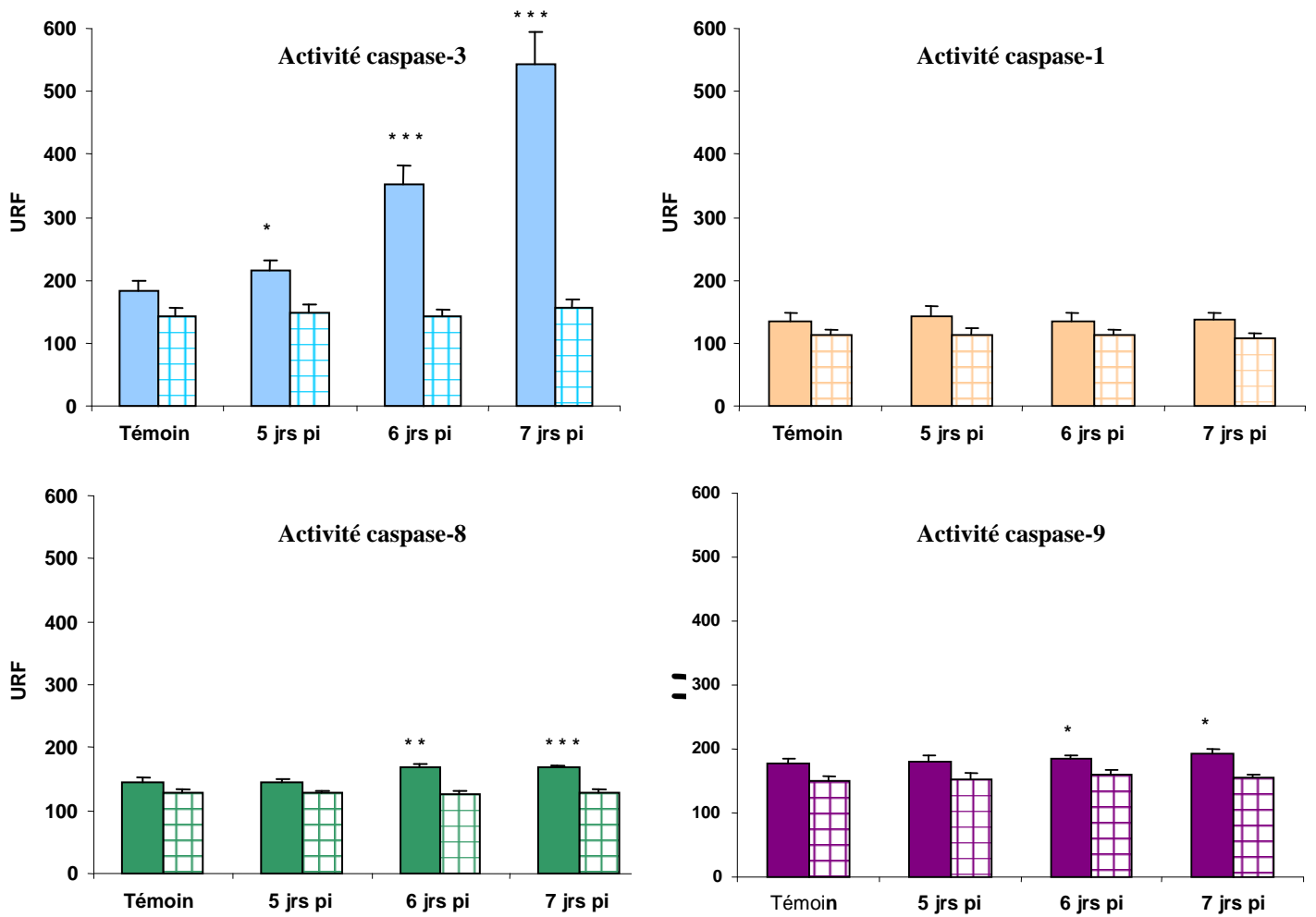


Figure 40 : Les activités caspases-3, -1, -8 et -9 dans les cellules de PC

Cellules de PC en présence du substrat spécifique de chaque caspase

■ Ac-DEVD-AMC ■ Ac-YVAD-AMC
■ Ac-IETD-AMC ■ Ac-LEHD-AMC

Cellules de PC en présence du couple substrat/inhibiteur spécifique de chaque caspase

Ac-DEVD-AMC/ Ac-DEVD-CHO Ac-YVAD-AMC/ Ac-YVAD-CHO
 Ac-IETD-AMC/ z-DEVD-FMK Ac-LEHD-AMC/ Z-DEVD-FMK

Témoin : cellules non infectées avec ou sans inhibiteur

Les valeurs d'intensité sont exprimées en unité relative de fluorescence (URF) avec $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) et $p < 0.001$ (***) par rapport au témoin, sans virus.

2.4. Etude de la fragmentation de la chromatine

2.4.1. Mise en évidence du clivage de l'ADN

Afin de confirmer l'apparition des modifications morphologiques nucléaires observées au cours de l'apoptose Visna-induite, nous avons recherché la présence d'une échelle d'ADN ou « ladders » caractéristique de la fragmentation chromatinienne dans les cellules de PC infectées.

La figure 41 nous montre **une fragmentation de l'ADN cellulaire avec un profil en échelle dans les cellules de PC traitées par la staurosporine** (puit n° 3). Les ladders obtenus correspondent à des fragments d'ADN de petits poids moléculaires : 300, 600, 700 et 800 pb. Lorsque **les cellules sont infectées par le virus Visna, le profil d'ADN est morcellé, mais pas en échelle** (puit n°4) ; les fragments d'ADN ont une taille plus importante que ceux obtenus après traitement par la staurosporine, avec des poids moléculaires proches de 700, 1000 pb et au delà. **Le virus Visna provoque le clivage de l'ADN cellulaire mais pas entre les nucléosomes.**

2.4.2. Mise en évidence d'une population sub-G1 par analyse du cycle cellulaire par CMF

Pour justifier le clivage de l'ADN des cellules de PC après infection par le virus Visna, **nous avons analysé la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire.**

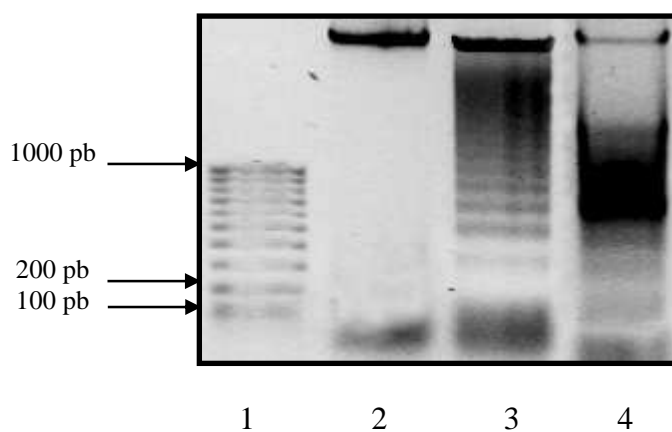
Les cellules de PC non infectées (figure 42) présentent un cycle cellulaire qui évolue normalement au cours du temps. **En revanche, les cellules infectées, à 4 ou 7 jours pi, montrent un pic sub-G1 caractéristique des cellules apoptotiques** ; le pic est absent dans la population cellulaire non infectée. En effet, lors du marquage à l'iodure de propidium, nous avons réalisé une fixation suivie d'une perméabilisation qui créent des micropores dans la membrane plasmique des cellules. Ces derniers libèrent, au cours des différents lavages, des petits fragments d'ADN des cellules apoptotiques dans le milieu extracellulaire. Les cellules apoptotiques ont un contenu en ADN fortement diminué correspondant aux pics sub-G1 obtenus après 4 jours et 7 jours d'infection. Les pics sub-G1 correspondent à des cellules ayant perdu leur contenu en ADN et donc à la population cellulaire apoptotique. La figure 42

nous permet de montrer que le pourcentage de cellules en sub-G1 augmente de 4 à 7 jours pi, respectivement avec 15,6% et 29,57 % de cellules apoptotiques.

Sur la figure 43, on observe également **la présence d'un pic sub-G1 lorsque les cellules sont traitées par la staurosporine**. La forme du pic sub-G1 obtenu avec les cellules infectées est plus large que celle des cellules traitées par la staurosporine. On peut dire que la taille des fragments d'ADN libérés par les cellules infectées en état d'apoptose est plus hétérogène que celle des fragments d'ADN libérés par les cellules traitées.

Figure 41: Electrophorèse de l'ADN cellulaire sur gel d'agarose

- 1 : « ladder 100 pb », marqueur de poids moléculaires
- 2 : ADN de cellules de PC non infectées
- 3 : ADN de cellules de PC traitées par 0,5 μ M de staurosporine pendant 8 h
- 4 : ADN de cellules de PC infectées à 5 jours pi



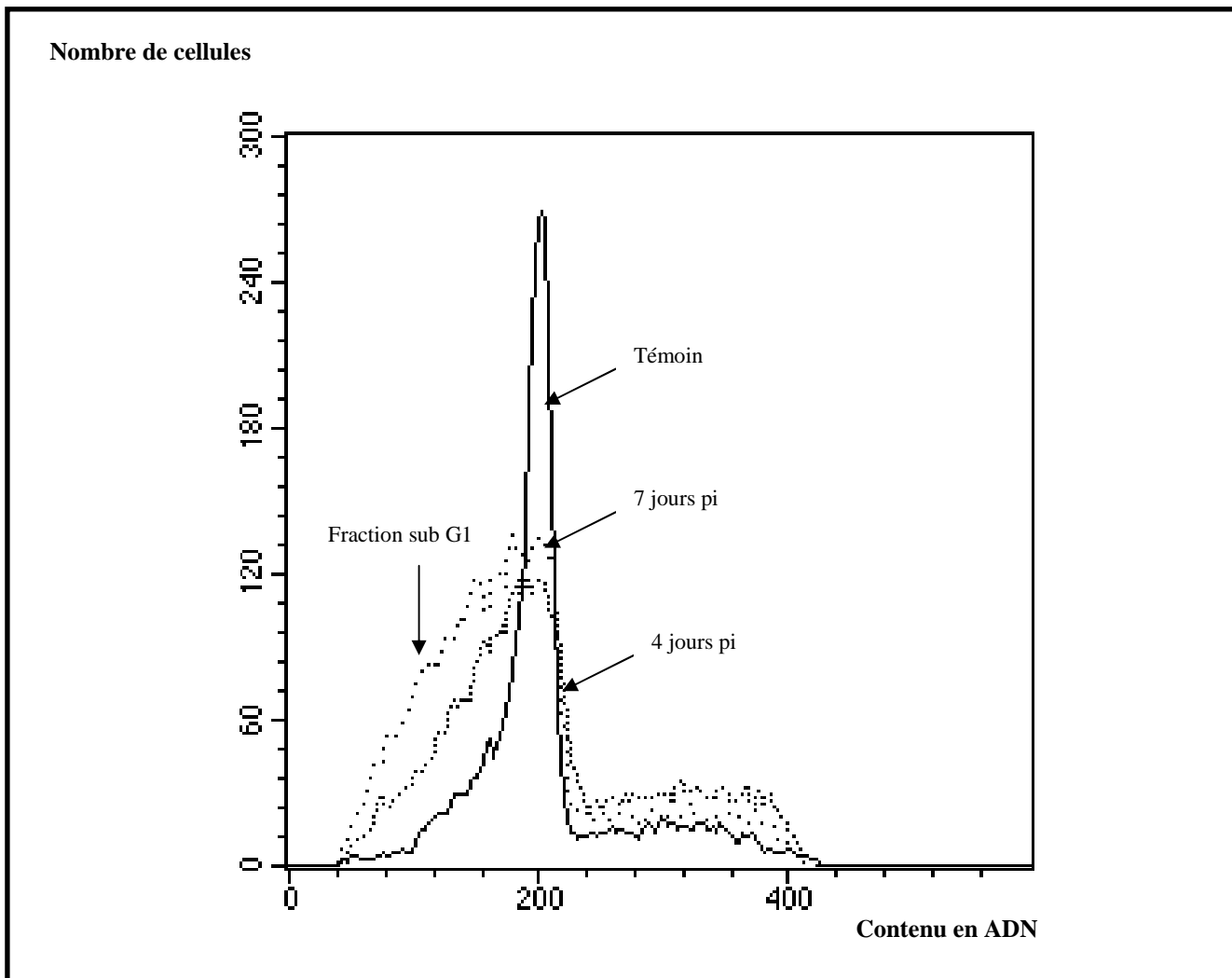


Figure 42 : Détection par CMF d'un pic sub-G1 dans les cellules infectées

T:
représentation
du cycle
cellulaire dans
les cellules de
PC témoins

S:
Cellules
traitées par 0,5
 μM de
staurosporine
pendant 8h

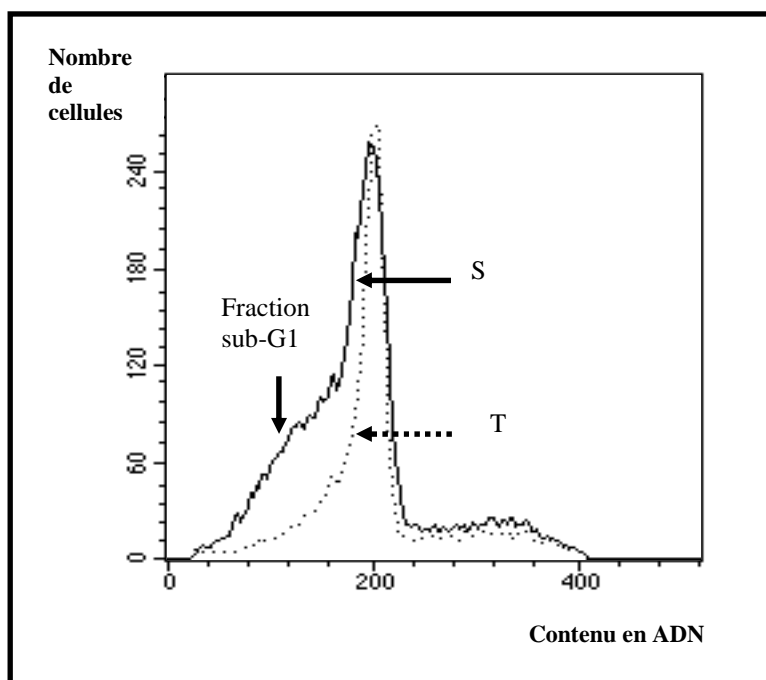


Figure 43 : Mise en évidence d'un pic sub-G1 suite au traitement par la staurosporine

3. EFFET D'ANTIRÉTROVIRAUX SUR L'APOPTOSE VISNA-INDUITE

3.1. Effet d'un INTI : l'AZT

3.1.1. Cytotoxicité et effet antiviral de l'AZT

La recherche des effets de l'AZT sur l'apoptose Visna-induite a été abordée par adaptation de la technique de coloration au MTT ; deux paramètres ont été mesurés *in vitro* : d'une part **le pourcentage de viabilité qui correspond à l'effet cytotoxique de l'AZT** sur les cellules de PC en culture et d'autre part **le pourcentage de protection de l'AZT qui correspond à l'effet antiviral**, en fonction de concentrations croissantes d'AZT (figure 44; tableau 23). Le pourcentage de viabilité est déterminé après culture des cellules en présence des différentes concentrations d'AZT alors que le pourcentage de protection des cellules est déterminé en présence d'AZT et du virus Visna.

La figure 44 montre que l'AZT n'est pas cytotoxique sur les cellules de PC pour des concentrations allant de 0,2 μM à 25 μM ($96\% \pm 0,5$). Le pourcentage de viabilité oscille entre 90% et 100%. En revanche au delà de 25 μM , celui-ci diminue et atteint $76\% \pm 0,2$ à 100 μM . L'effet de l'AZT sur la réplication du virus Visna, *in vitro*, nous a permis de déterminer son pouvoir antiviral. Sur cette même figure, on observe que le pourcentage de protection de l'AZT augmente en fonction de sa concentration. Il est très bas à la plus faible concentration (0,2 μM ; $13,3\% \pm 0,9$) et atteint son maximum à 25 μM d'AZT ($75,6\% \pm 0,9$).

L'étude du pourcentage de protection et du pourcentage de viabilité par la technique de coloration par le MTT, nous a permis de déterminer la concentration d'AZT la moins cytotoxique tout en étant efficace *in vitro* sur le virus Visna. Ainsi, dans notre système cellulaire **nous avons retenu, pour toutes les expériences ultérieures, une concentration finale de 25 μM d'AZT.**

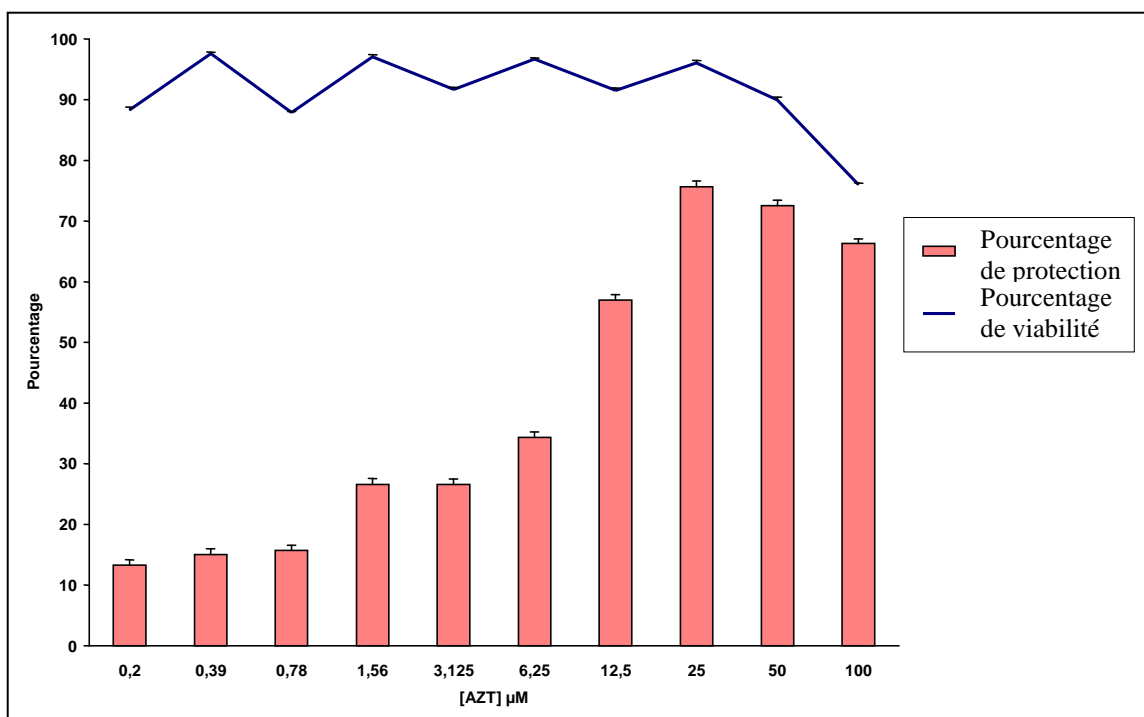


Figure 44: Pourcentage de protection et de viabilité cellulaire en présence d’AZT par la technique du MTT

[AZT] µM	Pourcentage de protection ± Ecart-type	Pourcentage de viabilité ± Ecart-type
0,2	13,3 ± 0,88	88,31 ± 0,28
0,39	15,03 ± 0,98	97,58 ± 0,17
0,78	15,72 ± 0,88	87,91 ± 0,38
1,56	26,6 ± 0,97	97,06 ± 0,35
3,125	26,6 ± 0,92	91,71 ± 0,17
6,25	34,3 ± 0,97	96,72 ± 0,38
12,5	56,99 ± 0,92	91,54 ± 0,47
25	75,65 ± 0,96	96,03 ± 0,46
50	72,54 ± 0,9	89,98 ± 0,28
100	66,32 ± 0,76	75,99 ± 0,23

Tableau 23 : Pourcentage de protection et de viabilité en présence d’AZT

3.1.2. Effet de l'AZT sur l'apoptose Visna-induite

Dans le but d'étudier l'effet de l'AZT sur l'apoptose Visna-induite, nous avons utilisé la même démarche expérimentale que dans les paragraphes 1 et 2, précédemment.

3.1.2.1. Inhibition par l'AZT des modifications morphologiques nucléaires observées au cours de l'apoptose

Deux approches ont été utilisées : la technique de coloration par le DAPI et l'électrophorèse de l'ADN des cellules de PC.

Sur la figure 45, les noyaux des cellules de PC non infectées présentent, après coloration au DAPI, une faible fluorescence bleue et une forme allongée (A). La photo B nous démontre que l'aspect des noyaux des cellules traitées par l'AZT est identique à celui des noyaux des cellules témoins. L'AZT n'a donc pas d'effet inducteur d'apoptose sur les cellules de PC. Les photos C, D, E et F représentent les noyaux des cellules infectées et colorés par le DAPI. En C et E, on observe les modifications morphologiques nucléaires caractéristiques de l'apoptose ; à 5 jours pi (C), un début de condensation de la chromatine (indiqué par une flèche) se manifeste par la fluorescence accrue des noyaux ; la morphologie des noyaux change, ils s'arrondissent et se rétrécissent. A 7 jours d'infection (E) on observe l'étape ultime de l'apoptose avec la fragmentation de la chromatine des noyaux (flèche). Les photos D et F correspondent aux noyaux de cellules infectées et traitées par l'AZT : à 5 jours pi (D) comme à 7 jrs pi (F), les noyaux des cellules ont un aspect normal et présentent une fluorescence peu intense semblable à celle des témoins. Ainsi, **en présence d'AZT, les cellules infectées par le virus Visna ne présentent pas de caractéristiques morphologiques nucléaires liées à l'apoptose.**

Le pourcentage d'apoptose dans les cellules infectées et traitées par différentes concentrations d'AZT est déterminé par comptage des noyaux apoptotiques colorés par le DAPI, avec une fluorescence bleue intense et un aspect condensé ou fragmenté (figure 46). Sur ce graphique, on remarque que les cellules témoins non traitées et non infectées ne présentent pas d'apoptose spontanée comme les cellules traitées uniquement par 25 μ M d'AZT. Le contrôle positif d'apoptose c'est à dire le traitement par 0,5 μ M de staurosporine montre 100% d'apoptose après 8 heures de traitement. Dans les cellules infectées par le virus (0) on observe 50% d'apoptose. A faibles concentrations d'AZT, c'est à dire entre 3,125 et

12,5 μM d'AZT, le pourcentage de cellules apoptotiques reste voisin de 50%. **Le traitement par 25 μM d'AZT entraîne une réduction du pourcentage d'apoptose** dans les cellules de plus de la moitié et atteint 20 %. Il baisse jusqu'à 5 % à la dose de 50 μM d'AZT.

Sur la figure 47, le profil de migration électrophorétique de l'ADN des cellules infectées et traitées par l'AZT (5) est identique à celui des cellules témoins (2). On peut dire que **l'AZT inhibe la fragmentation chromatinienne induite par le virus, confirmant l'inhibition des modifications morphologiques.**

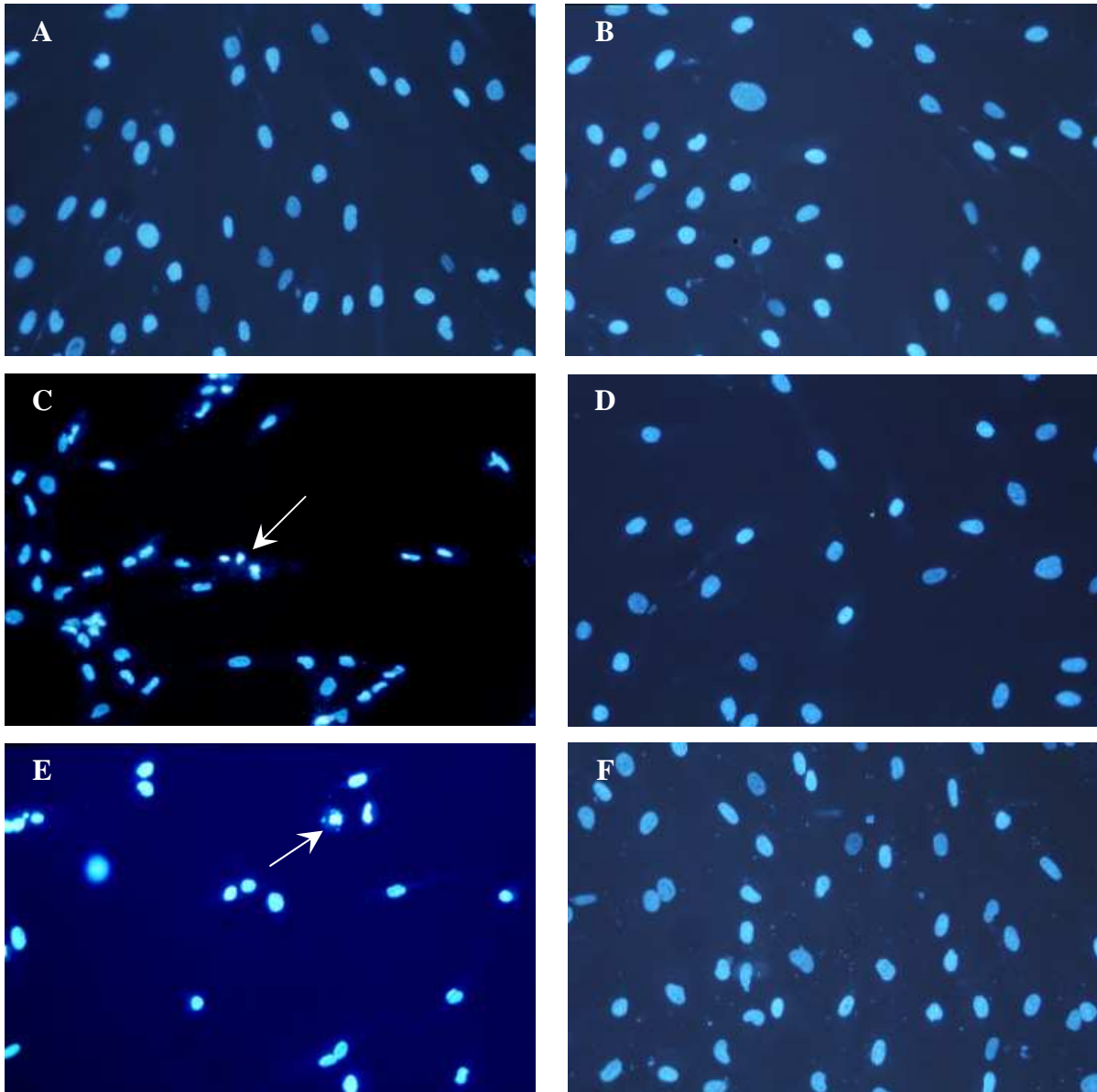


Figure 45 : Marquage nucléaire des cellules de PC après coloration DAPI

A : cellules de PC non infectées

B : cellules de PC non infectées et traitées par 25µM d'AZT

C et E : cellules de PC infectées pendant 5 jours et 7 jours respectivement

D et F : cellules de PC infectées en présence de 25µM d'AZT, à 5 et 7 jours pi

Grossissement x200

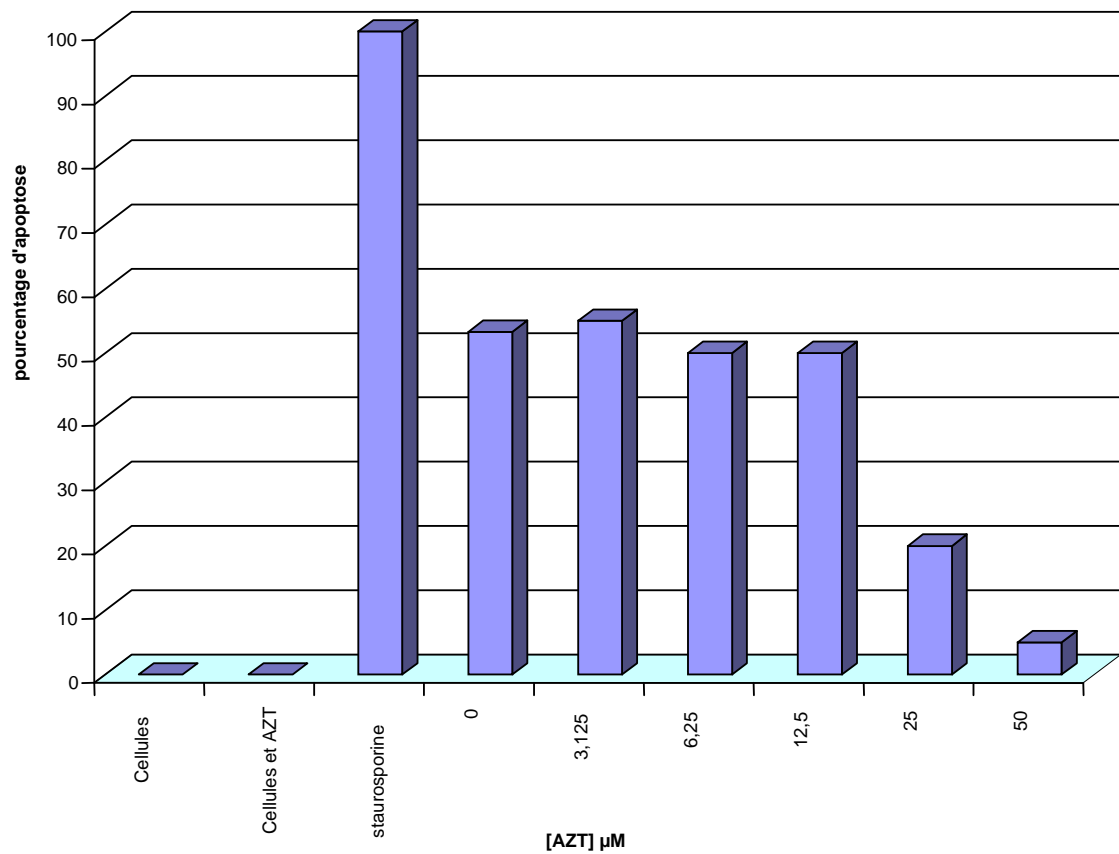


Figure 46: Représentation du pourcentage d'apoptose dans les cellules de PC

Cellules : cellules de PC témoins non infectées, non traitées

Cellules et AZT : cellules de PC traitées par 25 μM d'AZT pendant 7 jours

Staurosporine : cellules de PC traitées par 0,5 μM de staurosporine pendant 8 h

Les cellules de PC, infectées par le virus Visna pendant 7 jours, ont été traitées par différentes concentrations d'AZT : 0 ; 3,125 ; 6,25 ; 12,5 ; 25 ; 50 μM.

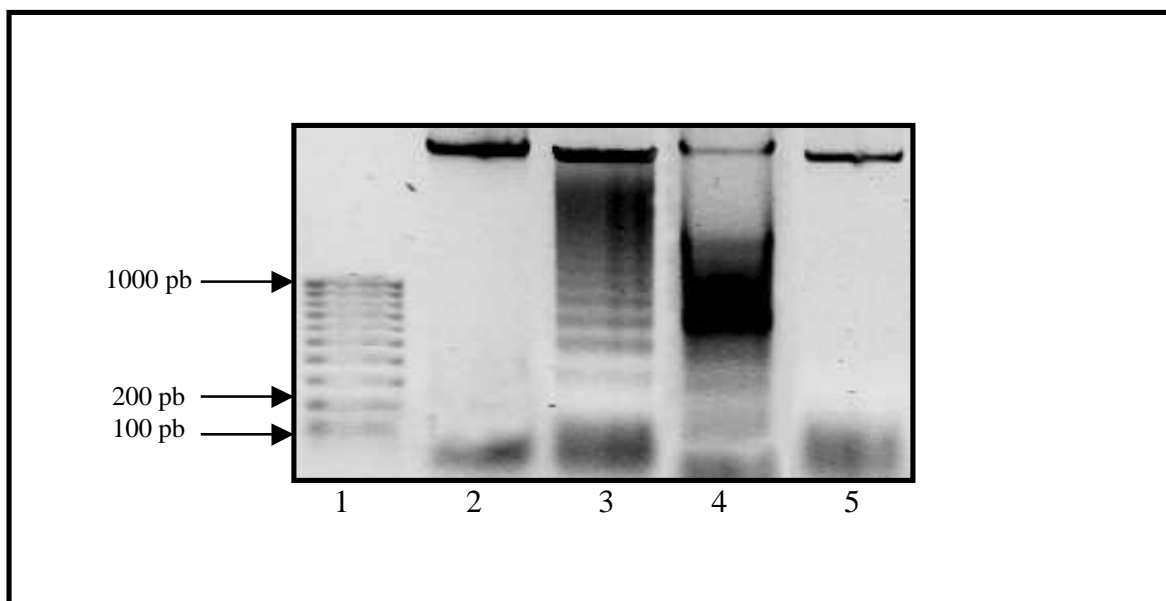


Figure 47: Electrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN cellulaire

- 1 : « ladder 100 pb », marqueur de poids moléculaires
- 2 : ADN de cellules de PC non infectées
- 3 : ADN de cellules de PC traitées par 0,5 μ M de staurosporine pendant 8 heures
- 4 : ADN de cellules de PC infectées à 5 jours pi
- 5 : ADN de cellules de PC infectées en présence de 25 μ M d'AZT après 5 jours d'infection

3.1.2.2. Conservation de l'intégrité membranaire des cellules de PC infectées et traitées par l'AZT

Nous avons suivi, l'évolution de l'intégrité membranaire des cellules infectées et/ou traitées par l'AZT, par dosage de la LDH dans le surnageant des cellules en culture.

Deux approches ont été abordées :

- dans un premier temps, nous avons mesuré la libération de LDH sur les cellules infectées et traitées ou non par l'AZT pendant 7 jours. Les résultats sont présentés sur la figure 48. Les cellules témoins présentent un faible relargage de LDH comme les cellules infectées pendant 3 jours. Après 5 jours d'infection, la libération de LDH augmente légèrement pour devenir élevée à 7 jours. L'augmentation de LDH à 7 jours pi correspond à l'ECP du au virus qui se traduit par la lyse cellulaire. En présence d'AZT et lorsque les cellules sont infectées, le relargage de LDH est comparable à celui des cellules témoins non infectées.

- dans un deuxième temps, le surnageant qui a servi à mesurer l'activité LDH à 3 ou 5 jours après infection, est remplacé par du milieu d'entretien sans virus et sans AZT, et un nouveau dosage de LDH est réalisé le 7^{ème} jour après infection (A et B, respectivement, figure 49). La figure 49 montre que la LDH continue d'être libérée dans le surnageant des cellules infectées qui n'avaient pas reçus d'AZT. En revanche, dans les cellules infectées et traitées par l'AZT, on constate que le relargage de LDH est plus important que dans les cellules non infectées mais plus faible que dans les cellules infectées et non traitées.

L'AZT limite la libération de LDH en empêchant la lyse des cellules de PC.

Les pourcentages de cytotoxicité calculés et obtenus à partir des figures 48 et 49 donnent les résultats suivants : 5% et 44,7 % à 5 jours et 7 jours pi sans AZT respectivement, contre 0% et 6% en présence d'AZT. Pour la seconde expérience, les pourcentages de cytotoxicité sont respectivement 42,7% (A) et 39,5 % (B) en absence d'AZT contre 15,52% (A) et 28,16% (B) en présence d'AZT.

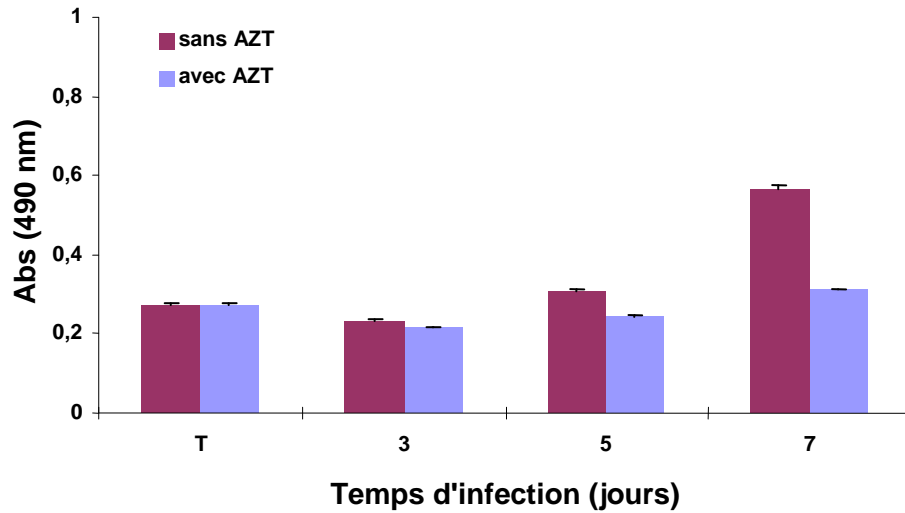


Figure 48 : Cinétique de libération de la LDH dans les cellules de PC

cellules de PC infectées par le virus Visna sans traitement par l'AZT
 cellules de PC infectées par le virus Visna en présence de 25 μ M d'AZT

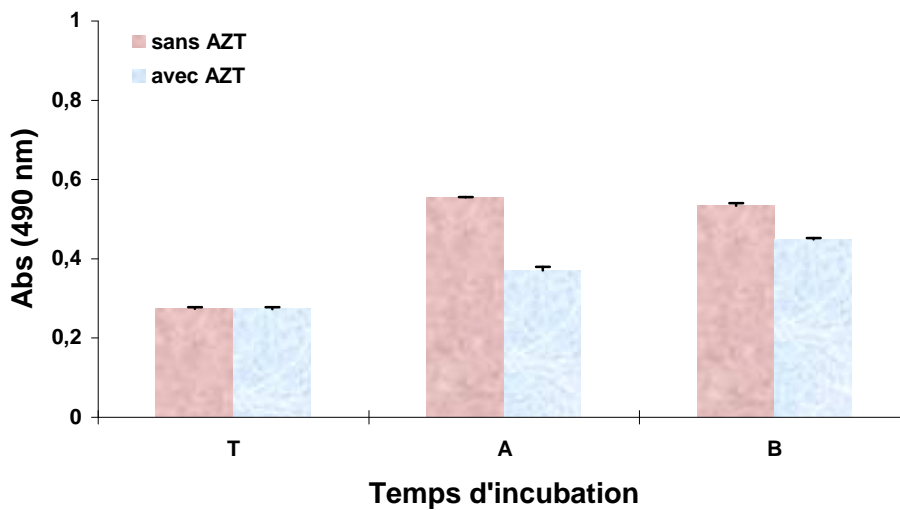


Figure 49 : Cinétique de libération secondaire de la LDH

A : relargage secondaire de LDH après 4 jours d'incubation avec le milieu d'entretien

B : relargage secondaire de LDH après 2 jours d'incubation avec le milieu d'entretien

3.1.2.3. L'AZT inhibe l'activation de la voie intrinsèque mitochondriale induite par le virus Visna

Comme précédemment, l'exploration de la voie intrinsèque mitochondriale s'effectue par deux approches expérimentales.

Dans un premier temps, les cellules de PC ont été mises en culture, infectées par le virus Visna et traitées simultanément par 25 μM d'AZT. Après 7 jours, les cellules sont marquées à l'aide des fluorochromes : JC-1 et TOTO-3.

La figure 50-1 et le tableau 24 montrent que 88,8% des cellules de PC témoins analysées présentent une fluorescence rouge, c'est à dire que le potentiel mitochondrial transmembranaire des cellules est élevé. Après 7 jours d'infection par le virus Visna (figure 50-2), seulement 19,9% des cellules présentent un $\Delta\Psi_m$ élevé. Un grand nombre de cellules infectées présente une chute de $\Delta\Psi_m$. Lorsque les cellules de PC sont infectées et traitées par l'AZT, pendant 7 jours (figure 50-3), 48,5% des cellules fluorescent dans le rouge après marquage au JC-1. Le pourcentage de cellules possédant un haut $\Delta\Psi_m$ (soit 48,5%), est compris entre celui obtenu après 5 jours pi (67,93%) et 6 jours pi (36,20%), sans AZT (tableau 20). **L'AZT diminue le nombre de cellules avec un faible $\Delta\Psi_m$.**

Dans un deuxième temps, nous avons analysé la libération de l'AIF dans les cellules infectées et traitées, par marquage immunocytochimique.

Sur la figure 51, les cellules témoins (A), comme les cellules traitées par 25 μM d'AZT (B) présentent un très léger marquage fluorescent vert diffus. L'incubation des cellules de PC avec 25 μM d'AZT n'a aucun effet sur la localisation cellulaire de l'AIF. Après 3 jours d'infection (C), l'AIF transloque dans les noyaux des cellules infectées (cellules individuelles et syncytia). Lorsque les cellules de PC sont infectées en présence d'AZT (D), aucun syncytium n'est observé à 3 jours pi et le marquage FITC est diffus comparable à celui de la culture de PC témoin (A).

Le traitement par l'AZT empêche le relargage de l'AIF de la mitochondrie dans le noyau des cellules infectées.

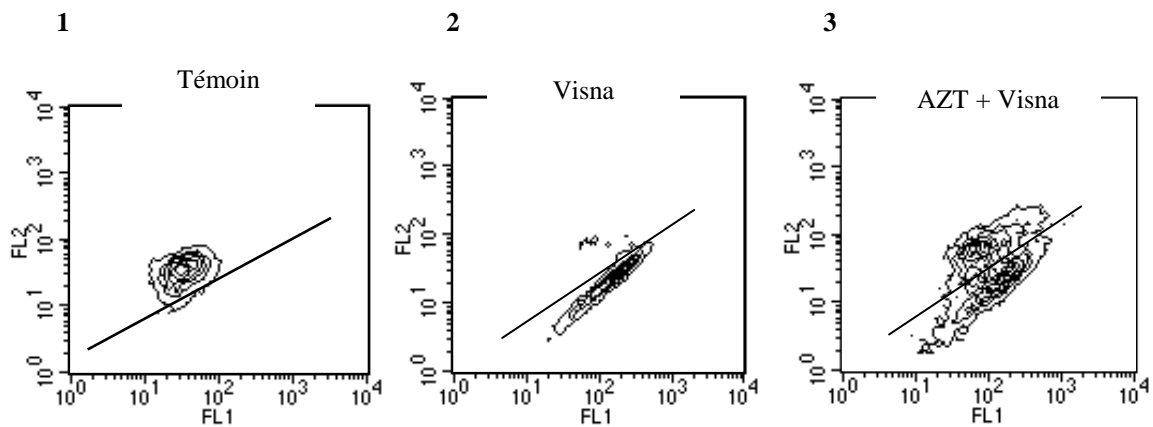


Figure 50: Cytogrammes FL1 vs FL2 et analyse du potentiel mitochondrial transmembranaire ($\Delta\Psi_m$)

Marquage réalisé avec les fluorochromes JC-1 et TOTO-3.

FL2 : fluorescence rouge ; FL1 : fluorescence verte.

1 : cellules témoins après 7 jours de culture

2 : cellules après 7 jours d'infection

3 : cellules infectées et traitées par 25 μ M d'AZT pendant 7 jours.

Conditions expérimentales	Pourcentage de cellules avec un haut $\Delta\Psi_m$
Témoins	88,8
Visna, 7 jours pi	19,9
Visna + AZT (25 μ M)	48,5

Tableau 24: Analyse des cytogrammes 1, 2 et 3

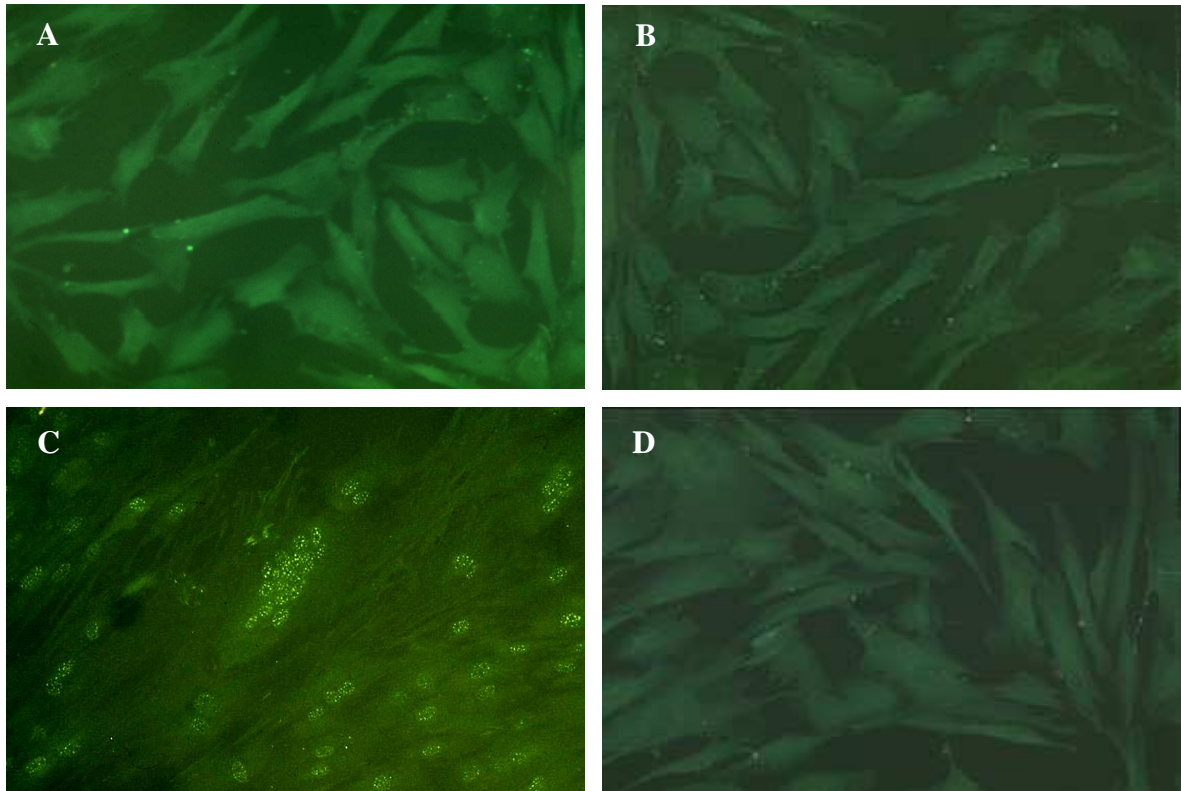


Figure 51 : Inhibition du relargage de l'AIF par l'AZT

A : cellules témoins

B : cellules traitées par 25μM d'AZT pendant trois jours

C : cellules infectées, 3 jrs pi

D : cellules infectées 3 jrs pi en présence d'AZT

Grossissement x200

2.1.2.4. L'AZT inhibe l'activation des caspases

❖ *l'AZT inhibe l'activation des caspases-3, -8 et -9 (figure 52).*

Tout d'abord nous avons testé l'effet de l'AZT sur les activités caspases des cellules de PC intactes. Le traitement des cellules par l'AZT seul ne modifie l'activité d'aucune des 4 caspases. En effet, les valeurs d'URF des cellules témoins avec ou sans AZT ne varient pas quel que soit la caspase.

Comme nous l'avons décrit précédemment, nous savons que les caspases-3, -8 et -9 sont activées par le virus Visna. C'est l'effet de l'AZT sur cette activation que nous allons rechercher.

La caspase-1 n'est pas activée dans les cellules infectées par le virus et le traitement par l'AZT **ne modifie pas l'activité de la caspase-1**, les valeurs d'URF des cellules infectées en présence d'AZT sont égales ou très voisines des valeurs du témoin.

Quelque soient les trois autres caspases étudiées -3, -8 ou -9, l'activation constatée dans les cellules infectées disparaît lorsque ces mêmes cellules sont traitées par l'AZT. Si l'on prend l'exemple de la caspase-3, son activité diminue dès 5 jours pi avec 190 URF contre 214,25 URF sans AZT ; cette valeur est proche de celle des cellules témoins avec 184 URF. L'activité caspase-3 est toujours plus basse à 6 jours pi en présence d'AZT (258,75 URF) contre 353,75 URF pour les cellules de PC infectées, sans AZT. L'inhibition de l'activité caspase-3 par l'AZT est maintenue à 7 jours pi (210 URF).

En ce qui concerne la caspase-8, les valeurs d'URF sont constantes en présence d'AZT (141 URF à 5 jours pi ; 145,5 à 6 jours pi et 146,5 à 7 jours pi) et proches des valeurs d'URF du témoin non infectées (145,75 URF).

L'activité de la caspase-9 est diminuée dans les cellules infectées et traitées par l'AZT, avec 178,75 URF à 6 jours pi et 171,75 URF à 7 jours pi. Ces valeurs sont identiques à celles du témoin cellules non infectées (177,75 URF).

Nous nous sommes ensuite assurés du rôle de l'AZT sur l'apoptose. En effet, l'AZT bloque l'apoptose Visna-induite, mais bloque-t-il l'apoptose induite par un traitement non viral tel que le traitement par la staurosporine ? La figure 53 nous montre que le traitement par la staurosporine provoque l'activation des caspase-3, -8 et -9 (4002 URF ; 602,5 et 436,25 respectivement). Ces valeurs sont beaucoup plus élevées comparativement à celles obtenues lors de l'infection par le virus Visna. En présence des traitements par la staurosporine et par

l'AZT, les valeurs d'activité de chaque caspase sont identiques à celles obtenues en absence d'AZT (3905,50 URF pour la caspase-3 ; 604,25 pour la caspase-8 et 447,25 pour la caspase-9).

L'AZT bloque l'activation des caspases induites lors de l'infection par le virus Visna mais pas lors du traitement chimique par la staurosporine.

❖ *L'AZT inhibe l'activation de toutes les caspases*

Grâce à un inhibiteur de caspases à large spectre couplé à un fluorochrome comme le FITC-VAD-FMK, nous avons réalisé un marquage *in situ* des cellules infectées possédant des caspases actives. La fixation de cet inhibiteur sur les caspases actives entrainera le clivage puis la libération du groupement fluorescent.

Dans les cellules témoins (figure 54, A), comme dans les cellules de PC traitées par l'AZT (B), aucun marquage fluorescent n'est observé donc aucune caspase n'est active. Lorsque les cellules sont infectées par le virus Visna pendant 5 jours (C) ou 6 jours (E), de nombreuses cellules développent une fluorescence verte, traduisant la présence de caspases actives dans les cellules infectées. En présence d'AZT et d'infection par le virus Visna (D et F), à 5 jours pi comme à 6 jours pi, aucune fluorescence verte n'est détectée.

Par marquage avec le FITC-VAD-FMK, inhibiteur à large spectre, nous ne détectons aucune activité caspase en présence d'AZT. On peut en conclure qu'en présence de **traitement par l'AZT, les cellules ne possèdent aucune caspase active et que l'AZT inhibe l'activation, par le virus Visna, de toutes caspases.**

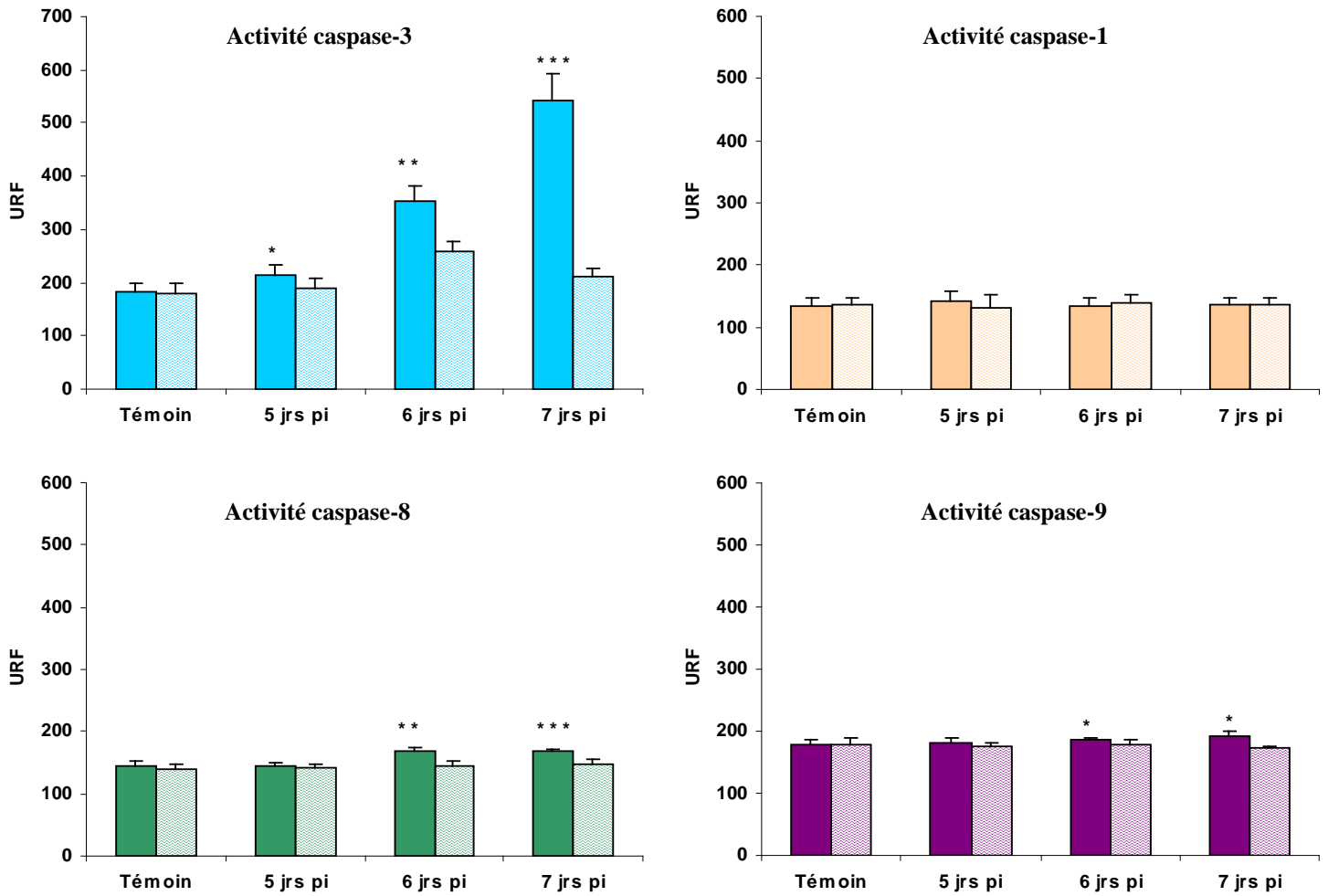


Figure 52 : Activités caspases-3, -1, -8 et -9 dans les cellules infectées et/ou traitées par l'AZT

Témoin : cellules non infectées avec ou sans AZT

Substrat
 Substrat/AZT

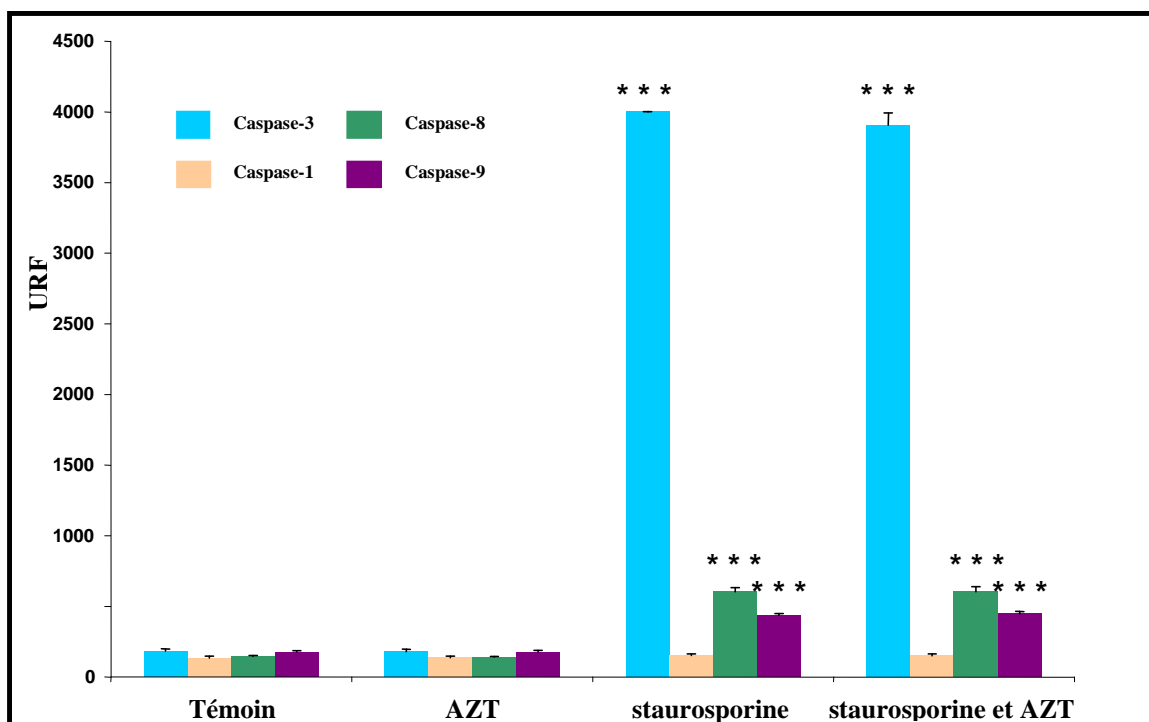


Figure 53 : Activités des caspases dans les cellules de PC traitées par la staurosporine et/ou l'AZT

Témoin : cellules non traitées

AZT : cellules cultivées en présence d'AZT

Staurosporine : cellules traitées par 0,5 μ M de staurosporine pendant 8h

Staurosporine et AZT : cellules cultivées en présence de staurosporine (0,5 μ M ; 8h) et 25 μ M d'AZT.

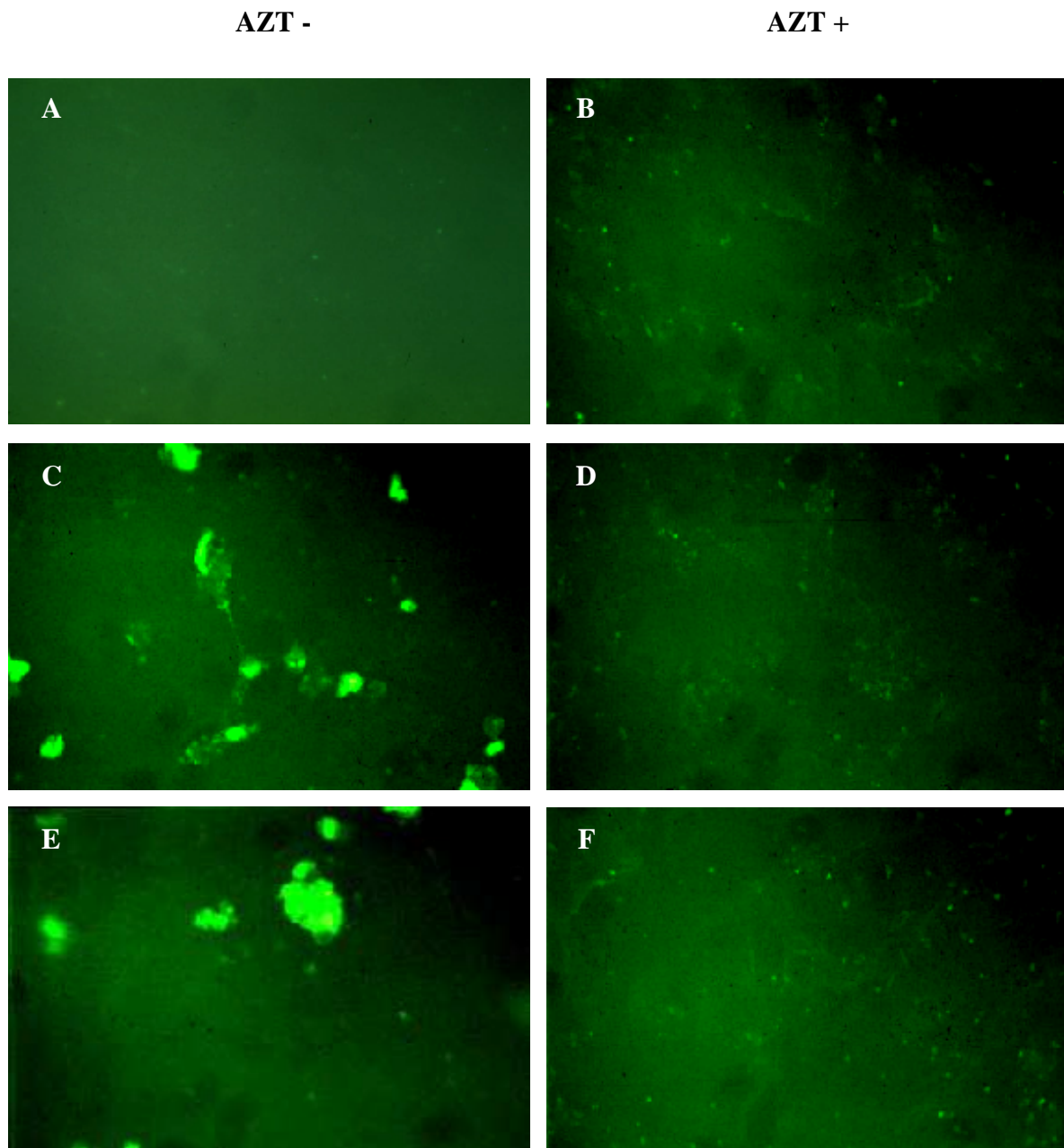


Figure 54: Marquage par le FITC-VAD-FMK

A : cellules témoins après 6 jours de culture

B : cellules traitées par 25µM d'AZT pendant 6 jours

C : cellules infectées pendant 5 jours

D : cellules infectées pendant 5 jours et traitées par l'AZT

E : cellules infectées pendant 6 jours

F : cellules infectées pendant 6 jours en présence d'AZT

Grossissement x200

3.2. Effet des autres antirétroviraux

Comme nous l'avons indiqué dans les matériels et méthodes, nous avons testé d'autres antirétroviraux. D'une part, nous souhaitons savoir si d'autres antirétroviraux ont un effet sur la réplication du virus Visna, *in vitro*, et d'autre part s'ils ont un effet sur l'apoptose Visna-induite.

Nous avons tout d'abord déterminé, par la technique au MTT, la cytotoxicité du **mésylate de nelfinavir, du M8 et de l'inhibiteur de synthèse**. Nous avons testé une échelle de concentrations allant 10 μ M à 1nM, concentrations beaucoup plus faibles que pour l'AZT, comparativement aux échelles de concentrations, *in vivo*. Quels que soient les concentrations testées, les pourcentages de viabilité sont proches de 100%. Ces trois molécules n'ont pas d'effet cytotoxique sur les cellules de PC quelle que soit leur concentration. En présence d'infection et de traitement, les absorbances mesurées sont identiques à celles des cellules infectées et les pourcentages de viabilité cellulaire voisins de 0. **Ces trois molécules n'ont aucun effet inhibiteur sur la réplication du virus Visna, *in vitro*.**

Dans le cas du mésylate de nelfinavir, nous avons recherché son effet sur la chute du potentiel mitochondrial transmembranaire après double marquage JC-1/TOTO-3 (figure 55) et 26,3 % de cellules ont un $\Delta\Psi_m$ élevé après traitement des cellules de PC infectées par 100nM de mésylate de nelfinavir pendant 7 jours, contre 88,8% pour les cellules de PC témoin et 19,8% dans le cas des cellules infectées par le virus Visna pendant 7 jours (tableau 25). En présence d'AZT, 48,5% des cellules de PC infectées et traitées par 25 μ M d'AZT ont un $\Delta\Psi_m$ élevé.

Les inhibiteurs de protéase testés, actifs sur la protéase du HIV, n'ont aucun effet sur la protéase du virus Visna.

Au vu de ces résultats nous n'avons pas approfondi nos recherches.

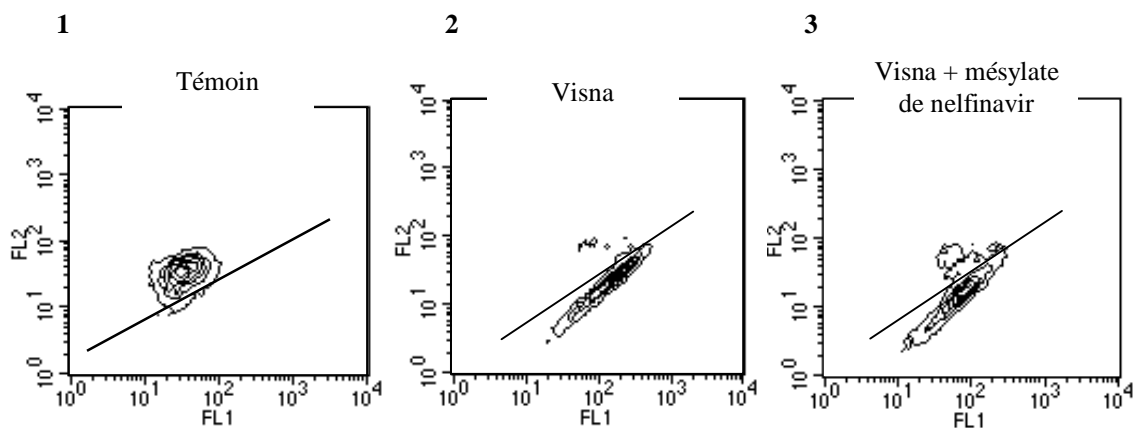


Figure 55: Analyse du potentiel mitochondrial transmembranaire ($\Delta\Psi_m$)

1 : cellules témoins après 7 jours de culture ; 2 : cellules de PC après 7 jours d'infection ; 3 : Infection par le virus Visna et traitement par 100nM de mésylate de nelfinavir pendant 7 jours.

Conditions expérimentales	Pourcentage de cellules avec un haut $\Delta\Psi_m$
Témoins	88,8
Visna, 7 jours pi	19,9
Visna + mésylate de nelfinavir (100nM)	26,3

Tableau 25: Analyse des cytogrammes 1, 2 et 3

4. UTILISATION D'UN NOUVEAU MODÈLE CELLULAIRE : LES CELLULES DE GSMt-*lac*

4.1. Infection des cellules de GSMt-*lac* par le virus Visna

Les cellules de membranes synoviales de chèvre (GSM) sont les cellules cibles utilisées pour cultiver le virus de l'arthrite et de l'encéphalite caprine, très proche phylogénétiquement du virus Visna. Il a été déjà démontré que le virus Visna infecte aussi *in vitro* les cellules de GSM (Chebloune *et al.*, 1996) en développant des syncytia. Nous avons recherché si le virus Visna infecte les cellules de GSM transfectées par le gène *lac-Z* par simple coloration au MGG.

A la différence des cellules de PC, les cellules de GSMt-*lac* (A et C) ont un aspect très hétérogène et une forme plus étoilée (figure 56). Les photos B et D nous montrent la présence de syncytia lorsque les cellules de GSMt-*lac* sont infectées par le virus Visna. Ces cellules ne sont pas infectées avec une MOI de 0,1 ; il faut une infection massive par un pool viral pour obtenir ce résultat. Les syncytia apparaissent en culture à partir de 6 jours d'infection alors que dans les cellules de PC, ils apparaissent dès 3 jours avec une MOI de 0,1. Ce sont des syncytia de petite taille d'une dizaine à une quinzaine de noyaux contre 4 à 60 noyaux pour les syncytia des PC infectées par le virus Visna.

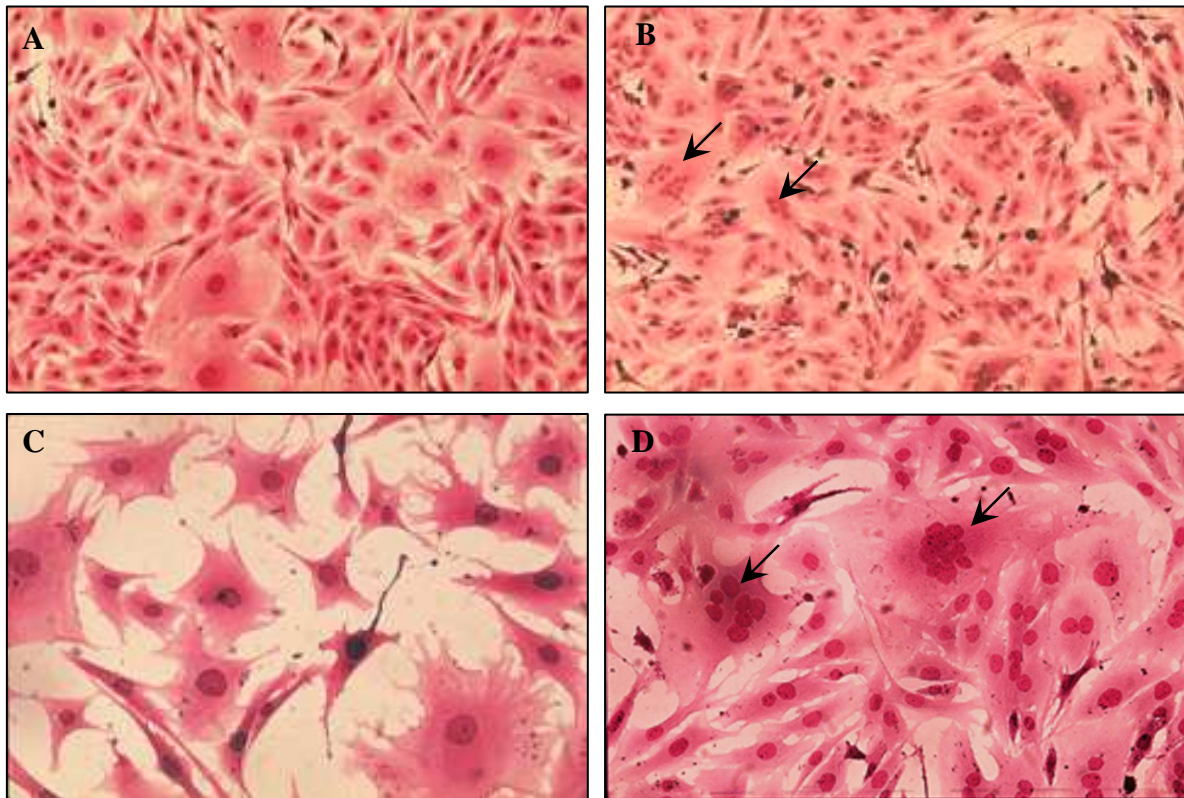


Figure 56 : Coloration des cellules de GSMt-*lac* au May-Grünwald Giemsa

A et C : cellules de GSMt-*lac* témoins (grossissement x100 et x200)

B et D : cellules de GSMt-*lac* infectées par le virus Visna à 6 jours pi (x100 et x200)

Les flèches indiquent la présence de syncytia.

4.2. Mise en évidence des principales caractéristiques apoptotiques

4.2.1. Effet du traitement par la staurosporine

Nous avons testé le même inducteur chimique d'apoptose, la staurosporine, comme contrôle positif. Après coloration par le DAPI, nous avons observé la morphologie des noyaux des cellules de GSMt-*lac* témoins (figure 57, A) et celle des noyaux des cellules de GSMt-*lac* incubées avec 0,5 μ M de staurosporine pendant 2 heures seulement (B). Les noyaux des cellules témoins (A) ont un aspect allongé et une fluorescence bleue peu intense. Les noyaux des cellules traitées par la staurosporine ont tous un aspect fragmenté. On distingue très clairement la présence de corps apoptotiques et 100% des cellules sont en apoptose. Ces cellules ont atteint les stades ultimes de l'apoptose puisque tous les noyaux sont fragmentés. Les cellules de GSMt-*lac* sont plus sensibles au traitement par la staurosporine que les cellules de PC.

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

Par marquage au DAPI, les cellules de GSMt-*lac* non infectées présentent quelques noyaux condensés voir fragmentés (figure 58, A) ce qui suggère une apoptose spontanée contrairement aux cellules de PC. Les cellules de GSMt-*lac* infectées par le virus Visna (B, C et D), ont de nombreux noyaux avec une fluorescence bleue intense. La condensation de la chromatine apparaît dès 5 jours pi. Le virus Visna induit l'apoptose des cellules de GSMt-*lac*, comme dans les cellules de PC.

4.2.3. Modifications de l'intégrité membranaire

La figure 59 nous présente la cinétique de relargage de la LDH dans le surnageant des cellules de GSMt-*lac* en fonction du temps d'infection. Le relargage de la LDH est significatif mais faible dans le surnageant des cellules après 7 jours d'infection (Abs 0,36). Après 9 jours d'infection, il augmente fortement avec une Abs égale à 0,76 contre 0,27 pour le témoin. Comme pour les cellules de PC la libération de LDH correspond à l'ECP qui se manifeste

dans les cellules infectées par le virus Visna. **Dans le cas des GSMt-lac, l'apparition du relargage de LDH est plus tardif que dans le cas des cellules de PC infectées.**

Nous présentons, dans le tableau 26, les pourcentages de cytotoxicité dus à l'infection. Ce pourcentage augmente légèrement entre 3 et 8 jours, puis brutalement à 9 jours d'infection avec 60,4% contre 0,8 % de cytotoxicité à 3 jours pi. Après 9 jours, il continue d'augmenter pour atteindre 81,8% à 11 jours d'infection. **L'augmentation du pourcentage de cytotoxicité correspond à une augmentation du relargage de LDH et à l'apparition d'une lyse cellulaire due à l'infection par le virus Visna.**

La figure 60 représente la cinétique de relargage de la LDH dans les cellules de GSMt-lac infectées en présence ou non d'AZT. La courbe « sans AZT » correspond à l'histogramme de la figure 59. Entre 3 et 8 jours, la présence d'AZT ne modifie pas le relargage de LDH par les cellules infectées. En revanche, à partir de 8 jours d'infection, le relargage de LDH en présence d'AZT est diminué. La présence de l'AZT dans la culture de GSMt-lac infectées influence le relargage de LDH, comme c'est le cas dans les cellules de PC infectées. Ainsi le traitement par l'AZT ralentit le relargage de LDH, donc l'apparition de la lyse cellulaire provoquée par le virus Visna.

Nous avons voulu savoir si l'AZT maintient son activité protectrice sur les cellules infectées lorsqu'il n'est plus présent dans le surnageant. Comme nous l'avons réalisé avec les cellules de PC, nous avons remplacé le surnageant des cultures préalablement infectées et traitées ou non par du milieu de culture vierge, sur une durée de 11 jours au total. Sur la figure 61, la durée d'incubation en abscisse correspond au délais d'incubation des cellules avec le milieu neuf. La courbe « sans AZT » correspond aux cellules infectées et montre qu'en présence de milieu neuf, les cellules infectées relarguent la LDH. Sans AZT, la libération de LDH dans les cellules de GSMt-lac infectées par le virus Visna commencerait à 5 jours pi puisque les 2 valeurs les plus élevées en 6 et 4 de la figure 61 correspondent à l'introduction du milieu vierge à 5 et 7 jours d'infection. La courbe « avec AZT » nous montre que l'AZT retarde le relargage de la LDH, même lorsqu'il n'est plus dans le milieu. L'AZT continue d'exercer son activité protectrice sans être présent dans le milieu à condition qu'il soit introduit dans la culture en même temps que le virus Visna.

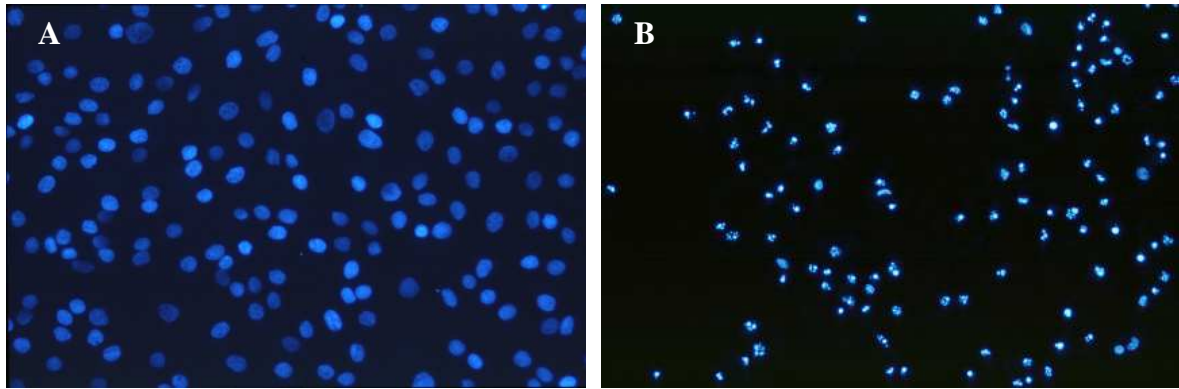


Figure 57: Marquage nucléaire par coloration DAPI dans les cellules de GSMt-lac traitées par la staurosporine

A : cellules de GSMt-lac témoins

B : cellules de GSMt-lac après traitement par 0,5 μ M de staurosporine pendant 2h

Grossissement x200

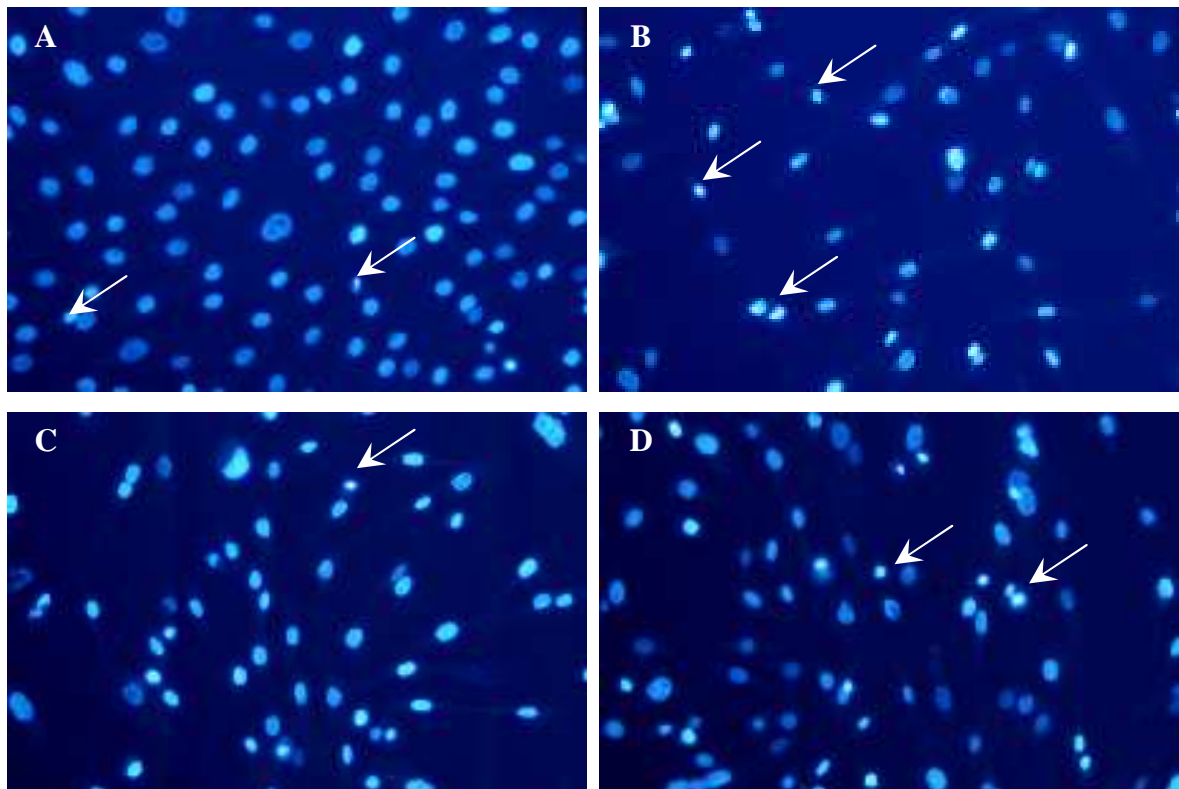


Figure 58 : Marquage nucléaire des cellules de GSMt-lac par le DAPI

A : cellules de GSMt-lac témoins

B, C et D : cellules de GSMt-lac infectées par le virus Visna pendant 5 jours (A), 7 jours (C) et 9 jours (D)

Les flèches indiquent la présence de noyaux condensés ou fragmentés.

Grossissement x200

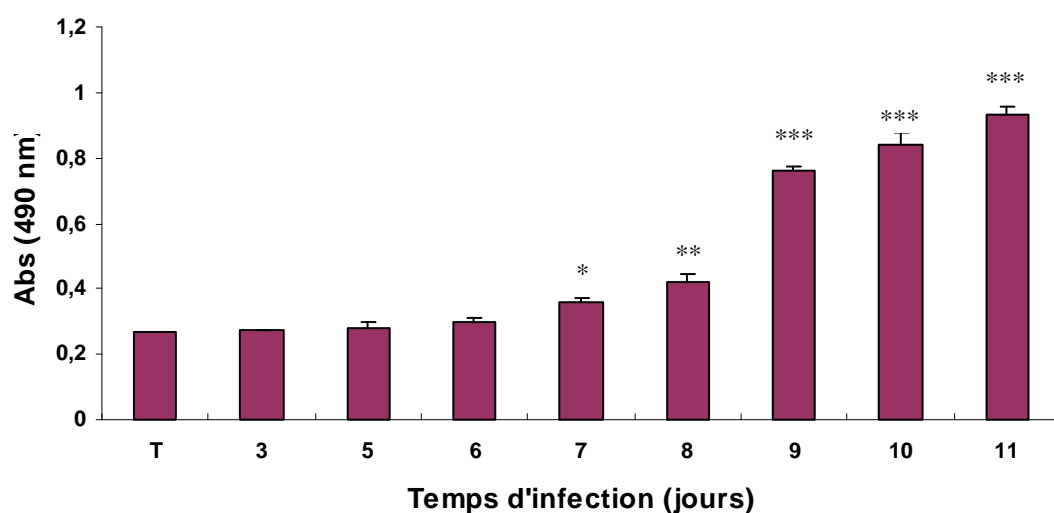


Figure 59 : Cinétique de libération de la LDH dans les GSMt-lac infectées par le virus

Visna

T : cellule de PC en culture (Témoin)

Temps d'infection (jours pi)	Pourcentage de cytotoxicité (%)
3	0,8
5	1,6
6	4,1
7	11,1
8	18,7
9	60,4
10	70
11	81,2

Tableau 26 : Evaluation du pourcentage de cytotoxicité par dosage du relargage de la LDH dans les cellules de GSMt-lac infectées

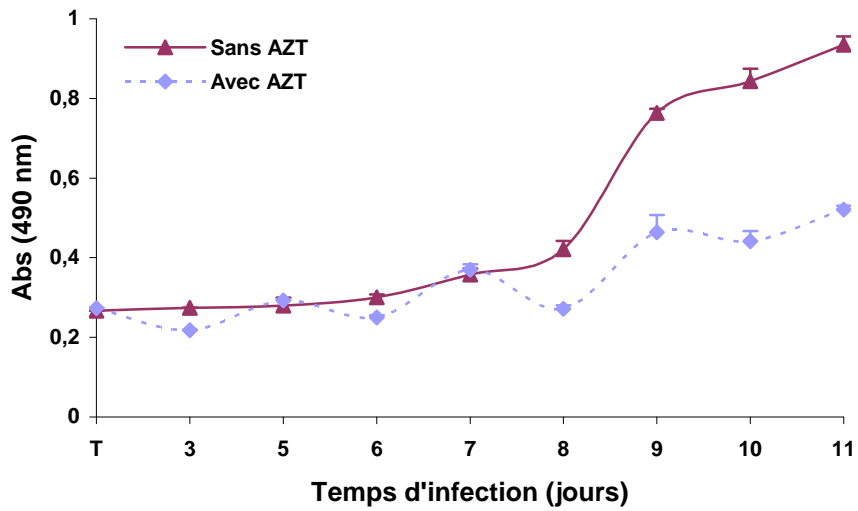


Figure 60 : Cinétique de libération de la LDH dans les cellules de GSMt-lac infectées avec ou sans traitement par l'AZT

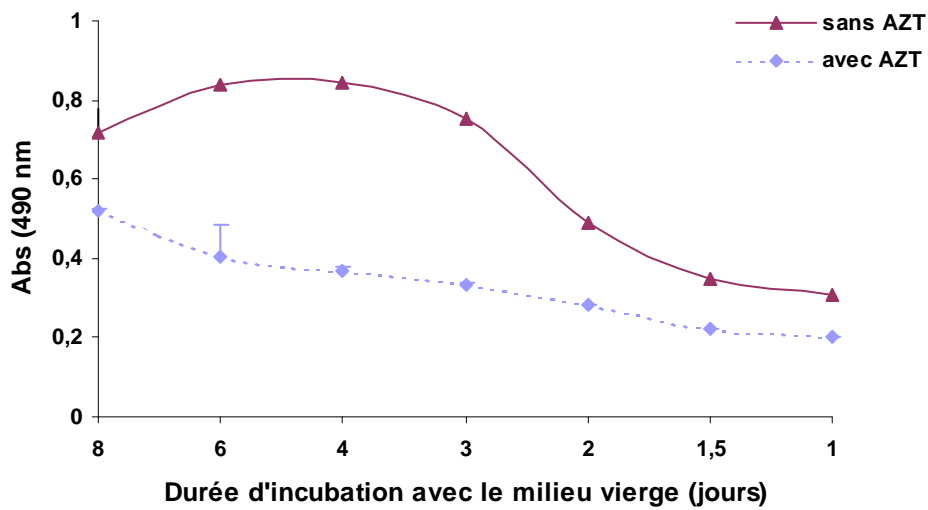


Figure 61 : Evolution de la cinétique de libération secondaire de LDH dans les cellules de GSMt-lac infectées

6 jours : 5 jours d'infection et traitement ou non + 6 jours d'incubation avec le milieu vierge

4 jours : 7 jours d'infection et traitement ou non + 4 jours d'incubation avec le milieu vierge...

4.2.4. Mise en évidence de l'activité caspase-3

La figure 62 montre l'activité caspase-3 dans les cellules de GSMt-*lac* témoins, traitées par la staurosporine ou infectées pendant 3, 6, 8, 9 et 12 jours.

On note que les cellules témoins présentent une légère activité caspase-3, contrairement aux cellules de PC ce qui explique une légère apoptose spontanée. Dans le cas du traitement par la staurosporine (0,5 μ M, 2h), l'activité caspase-3 augmente (810,67 URF) par rapport au témoin (496 URF). Dans les cellules infectées, aucune augmentation n'apparaît après 3 jours d'infection. En revanche, la caspase-3 est activée dès 6 jours pi avec 758 URF contre 496 URF pour le témoin, continue d'augmenter jusqu'à atteindre un maximum à 8 jours pi (1122 URF), puis diminue après 9 jours pi mais en restant toujours plus élevée que dans les cellules témoins. Parallèlement le niveau de fluorescence du couple substrat/inhibiteur est constant ce qui nous permet de confirmer la spécificité du couple substrat/inhibiteur de la caspase-3, comme cela a été démontré dans le cas des cellules de PC, puisque nous avons utilisé ici le même couple (Ac-DEVD-AMC/Ac-DEVD-CHO).

Si l'on compare ces résultats avec ceux obtenus dans le cas des cellules de PC infectées par le Visna, on s'aperçoit que l'activité caspase-3 est plus élevée dans les cellules de GSMt-*lac* infectées par le Visna que dans les PC infectées, mais l'activité caspase-3 résiduelle des témoins est plus élevée que dans le cas des PC. **Nous démontrons que le virus Visna induit l'apoptose dans les cellules de GSMt-*lac* avec une activation de la caspase-3.**

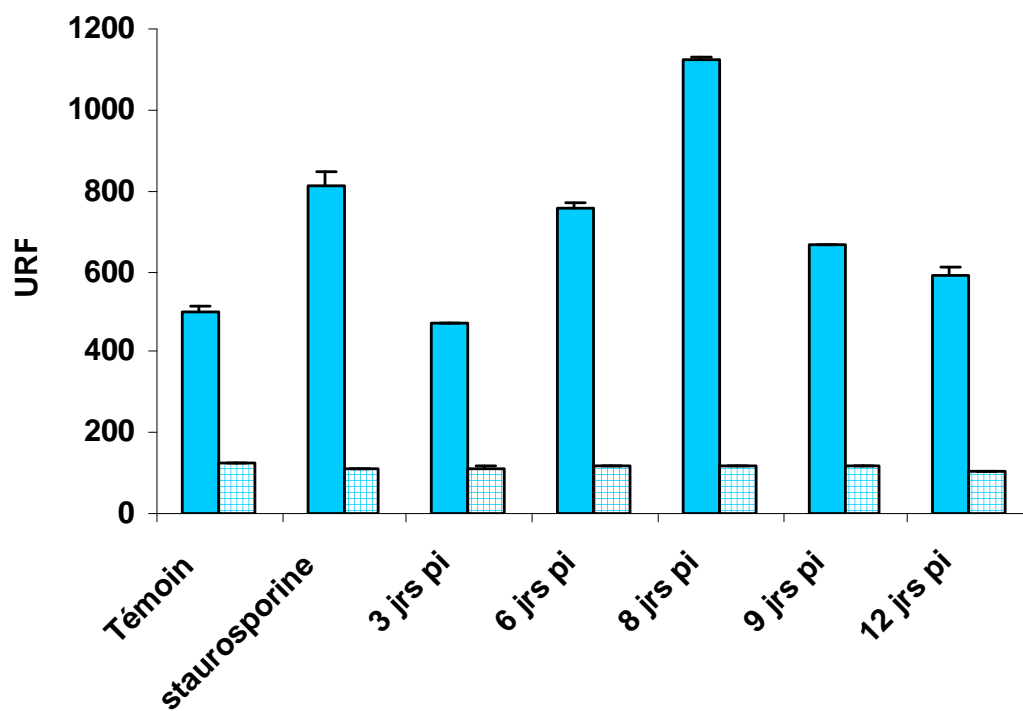


Figure 62: Activité caspase-3 dans les cellules de GSMt-lac infectées par le virus Visna

Substrat
 Substrat/inhibiteur

4.2.6. Etude de la chute du $\Delta\Psi_m$

Il n'a pas été possible d'analyser le potentiel mitochondrial transmembranaire des cellules de GSMt-*lac* par CMF, comme nous l'avons mis au point avec les cellules de PC.

En effet, ces cellules sont sensibles au DMSO dans lequel les fluorochromes JC-1 et TOTO-3 sont dilués, ce qui fausse les résultats d'analyse du $\Delta\Psi_m$. De plus, nous avons observé une auto-fluorescence des cellules de GSMt-*lac* qui gêne l'analyse de ces cellules par CMF.

4.3. Relation entre apoptose et infection

Nous savons déjà par la présence de syncytia après coloration au MGG dans la culture de GSMt-*lac* infectées que le virus Visna est capable d'infecter ces cellules, *in vitro*. Ces cellules possèdent un gène rapporteur, le gène *lac-Z* codant pour une enzyme la β -galactosidase sous la dépendance de l'élément de réponse RRE commun aux virus Visna et CAEV. Lorsque ces cellules sont infectées par le virus Visna et que le cycle de réplication virale va débiter, la protéine rev va être synthétisée précocement puisque les ARNm codant pour cette protéine sont synthétisés dès le début de la transcription. La protéine rev vient se fixer sur l'élément RRE en amont du gène de la β -galactosidase et permet la synthèse de cette dernière. L'enzyme transforme son substrat X-gal en un composé bleu.

Dans un premier temps, nous avons utilisé les cellules de GSM transfectées pour rechercher le pourcentage de cellules infectées par le Visna, *in vitro*. Dans un deuxième temps, nous avons déterminé la relation directe entre infection et apoptose dans ces cellules.

4.3.1. Mise en évidence de l'activité β -galactosidase dans les cellules infectées en présence de X-gal

La figure 63 nous présente les cellules de GSMt-*lac* après infection par le virus Visna et coloration par le X-gal. Nous constatons que les cellules bleues, appelées « gal+ », ne sont pas majoritaires dans la culture infectée. Les cellules gal+ sont aussi bien des cellules individuelles que des syncytia. Dans ces deux types cellulaires, le virus Visna est capable de déclencher un nouveau cycle de réplication viral. On retrouve également de nombreuses cellules non bleues ou « gal- ». Ces cellules sont soit des cellules non infectées par le virus Visna soit des cellules infectées dans lesquelles le virus est présent mais ne se réplique pas. La

coloration X-gal est présentée dans la figure 63, à 6 jours et 7 jours d'infection, mais dès 3 jours, il est possible de mettre en évidence des cellules gal+.

4.3.2. Détermination du pourcentage de cellules « gal+ »

Nous avons dénombré le nombre de cellules bleues, par champ microscopique. Pour un même temps d'infection, nous avons dénombré plusieurs champs optiques et calculé le pourcentage de cellules gal+.

On observe que le pourcentage de cellules « gal+ » augmente avec le temps d'infection (figure 64). Mais à 9 jours pi, seulement 13,33 % \pm 5,6 des cellules sont bleues. L'écart-type nous permet de constater que le nombre de cellules bleues par champ est variable. Le constat que l'on peut faire est double : peu de cellules sont infectées et capables de déclencher un nouveau cycle de réplication virale après infection par le virus Visna et le nombre de cellules infectées restent assez bas malgré des temps d'infection de 9 jours.

4.3.3. Détermination du pourcentage de cellules apoptotiques

De la même façon, nous avons calculé le pourcentage d'apoptose dans les cellules de GSMt-*lac* en fonction du temps d'infection. Par marquage DAPI, nous avons compté les noyaux apoptotiques présentant une fluorescence bleue intense et un aspect condensé ou fragmenté.

Sur la figure 65, on remarque que le pourcentage d'apoptose augmente avec le temps d'infection jusqu'à 8 jours pi pour atteindre 51,33% de noyaux apoptotiques. Une légère baisse à 9 jours pi (44,33%) peut s'expliquer par l'apparition d'une lyse cellulaire. Le relargage de LDH est observée à 9 jours pi et se corrèle avec la chute du pourcentage d'apoptose.

4.3.4. Corrélation entre apoptose et infection

Compte tenu des résultats obtenus précédemment concernant la différence entre le pourcentage de cellules infectées et capables de produire de nouvelles particules virales (gal+) et le pourcentage de cellules en apoptose, nous avons réalisé un double marquage Xgal/DAPI ce qui a permis d'observer 4 populations cellulaires différentes :

- ❖ les cellules DAPI+/gal+ sont les cellules apoptotiques et infectées,

- ❖ les cellules DAPI+/gal- correspondent aux cellules apoptotiques soit non infectées ou soit infectées par le virus Visna en état de latence.
- ❖ les cellules DAPI-/gal+, cellules non apoptotiques mais infectées ayant déclenché un nouveau cycle de réplication virale dans le but de produire de nouvelles particules virales,
- ❖ les cellules DAPI-/gal-, cellules non apoptotiques, soit non infectées soit infectées par le virus Visna en état de latence.

La figure 66 nous montre les résultats obtenus après double marquage des cellules de GSMt-*lac* infectées par le virus Visna. Les photos A et B représentent le même champ. La photo A montre des cellules infectées après révélation de l'activité β -galactosidase : peu de cellules sont bleues et donc peu de cellules sont infectées et productives de nouvelles particules virales (gal+). La photo B montre les noyaux des cellules colorés par le DAPI : de nombreux noyaux présentent une fluorescence bleue très intense (DAPI+) et un aspect condensé. Leur nombre est beaucoup plus important que le nombre de cellules bleues (gal+, A). Les flèches blanches indiquent des noyaux condensés (B) qui ne sont pas colorés en bleu sur la photo A. Inversement, les cellules indiquées par les flèches vertes (A) sont des cellules gal+ dont les noyaux ne sont pas fluorescents en DAPI (B).

A la vue de ces résultats, nous avons effectué un comptage des 3 différentes populations les plus intéressantes (figure 67). Quelque soit le temps d'infection, on confirme les résultats précédemment décrits à savoir que le pourcentage de cellules gal+/DAPI+ est faible dans les cellules de GSMt-*lac* infectées : il est maximum à 8 jours pi et n'excède pas 5,84 %. Le pourcentage de cellules gal+/DAPI- augmente progressivement au cours du temps avec un maximum à 9 jours pi soit 8,83 %. Le pourcentage le plus important est celui représentant le taux de cellules gal-/ DAPI+ qui est maximum à 8 jours pi avec 45,50% des cellules en apoptose puis il baisse à 9 jours pi (39,83%).

Ainsi, le pourcentage de cellules gal+/DAPI+ reste très faible quelque soit le temps d'infection. Dans la culture infectée, la population cellulaire majoritaire est la population gal-/DAPI+. Autrement dit, les cellules apoptotiques sont principalement les cellules non infectées ou celles dans lesquelles le génome viral est latent mais le virus ne se réplique pas. Les cellules gal+ sont très rarement en apoptose. Le virus Visna n'agit pas de la même façon sur toutes les cellules en culture. Toutes les cellules ne produisent pas des particules virales ; on se trouve donc en présence d'une population hétérogène.

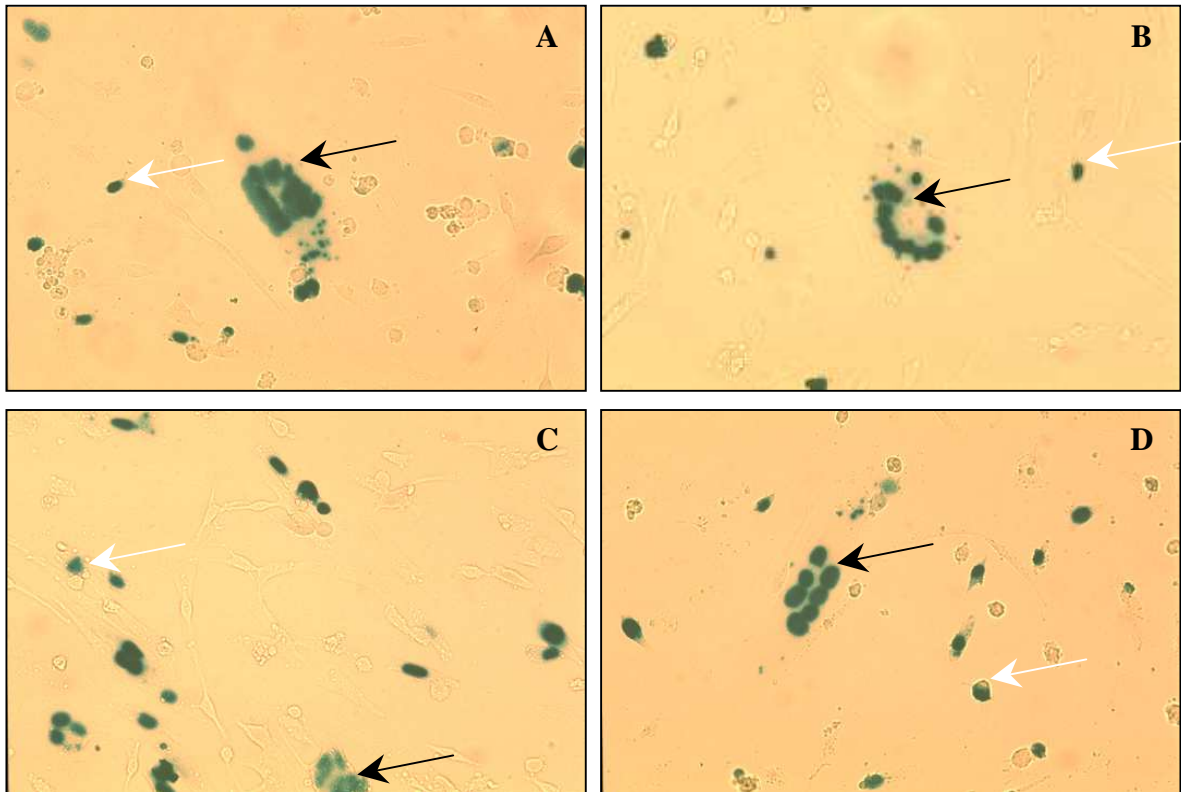


Figure 63 : Mise en évidence de l'activité β -gal dans les cellules de GSMt-*lac* infectées

A et B : cellules infectées et colorées après 6 jours pi

C et D : cellules infectées et colorées après 7 jours pi

Les cellules infectées qui vont produire de nouvelles particules virales (cellules bleues) sont aussi bien les syncytia (flèches noires) que les cellules individualisées (flèches blanches).

Grossissement x200

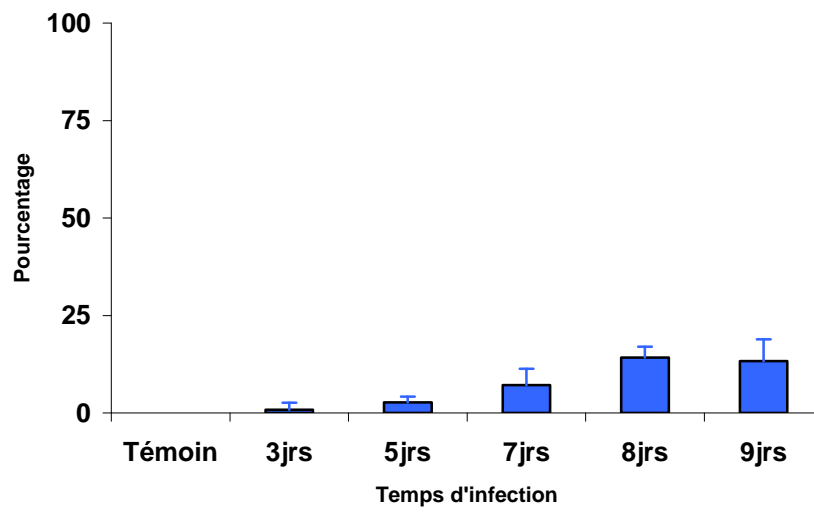


Figure 64 : Pourcentage de cellules « gal+ » en fonction du temps d'infection

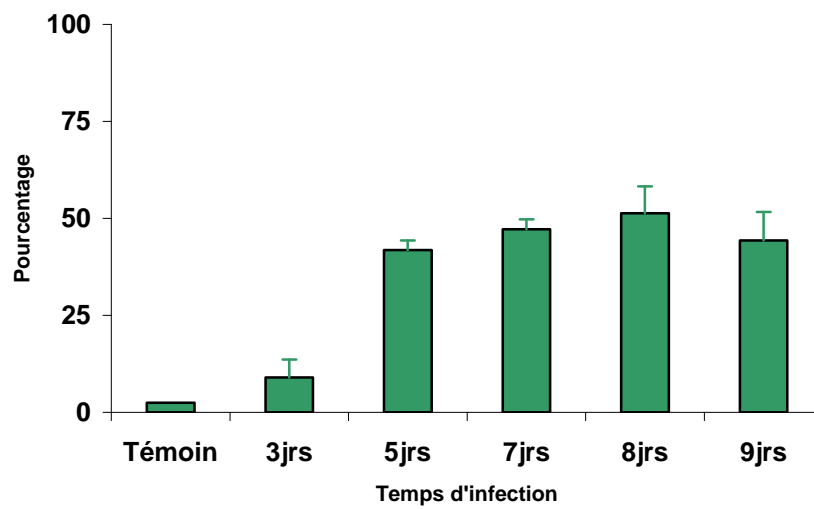


Figure 65 : Pourcentage d'apoptose en fonction du temps d'infection après marquage au DAPI

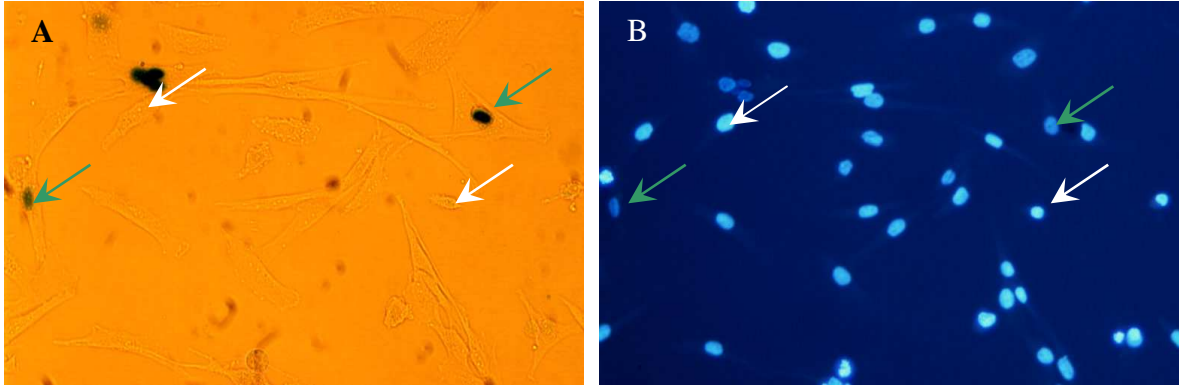


Figure 66 : Double marquage X-gal et DAPI dans les cellules de GSMt-*lac* infectées par le virus Visna

A : coloration X-gal ; B : coloration DAPI

Flèche blanche : cellules gal-/DAPI+ ; flèche verte : cellules gal+/DAPI-

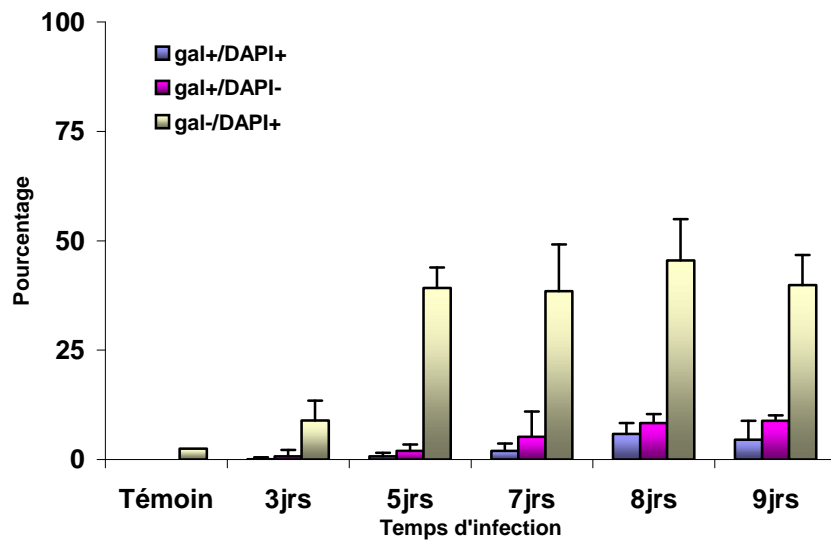


Figure 67 : Evaluation de l'apoptose par rapport aux pourcentages de cellules infectées

- Cellules de GSMt-*lac* apoptotiques, infectées et capables de produire des particules virales
- Cellules de GSMt-*lac* non apoptotiques, infectées et capables de produire des particules virales
- Cellules de GSMt-*lac* apoptotiques non infectées ou infectées de façon latente

DISCUSSION

L'induction de l'apoptose lors des infections virales peut-être une étape déterminante dans la pathogénèse des maladies. Le HIV-1 est un exemple de virus pathogène capable d'induire le processus apoptotique dans les cellules infectées et non infectées. Ce phénomène participe activement à l'immunodéficience observée chez les malades. La disparition progressive des lymphocytes, dépendante du HIV, perturbe le contrôle de la réplication virale par le système immunitaire, désorganise les organes lymphoïdes où a lieu la réponse immunitaire, et conduit à l'installation du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), avec apparition d'infections opportunistes sévères. Les mécanismes responsables de la disparition des lymphocytes T CD4 au cours de l'infection par le HIV sont complexes, et ils ne sont que partiellement élucidés. Malgré le développement d'une réponse immunitaire active, le virus persiste à un niveau élevé dans le sang et les organes lymphoïdes des patients et détruit progressivement les défenses immunitaires. Ainsi, la mort du patient n'est pas due *in fine* au virus lui-même mais plutôt à la réponse de l'organisme hôte chez qui l'apoptose participe à la destruction de la population lymphocytaire et ainsi à celle du système immunitaire. Certains virus, comme le HPV, ont la capacité de former des tumeurs chez l'hôte au cours de leur cycle réplicatif. L'HPV a la possibilité de déclencher l'apoptose pour bloquer l'activité oncogénique, mais aussi la capacité de bloquer le processus apoptotique déclenché en réponse à une désynchronisation du cycle cellulaire (Finzer *et al.*, 2002). Dans ce cas, le contrôle de l'apoptose est, comme dans le cas du HIV, une étape déterminante pour l'installation de la maladie. L'étude des voies apoptotiques activées ou réprimées par l'infection virale permet de comprendre la contribution de l'hôte dans l'établissement de la maladie. La caractérisation des constituants cellulaires et viraux, potentiellement impliqués dans la régulation de la mort cellulaire par apoptose, est une étape essentielle pour une meilleure compréhension de la pathogénèse virale et l'élaboration de stratégies innovantes afin de prévenir l'apparition des formes sévères de la maladie.

Au sein d'un organisme, de nombreux facteurs agissant sur les cellules viennent moduler la multiplication virale en modifiant la réceptivité et la permissivité de l'hôte : citons parmi ces facteurs, la température, le pH, les hormones, les facteurs de croissance, les phases du cycle cellulaire ou la synthèse d'interférons. Dans notre système d'infection *in vitro*, nous avons utilisé des cellules primaires fibroblastiques obtenues à partir de plexus choroïdes, cibles du virus Visna lors de l'infection naturelle. Ce système de culture *in vitro* est clos avec absence d'interférence des systèmes immunitaire et inflammatoire qui coexistent dans l'infection Visna du mouton. L'effet cytopathologique (ECP) induit par le virus Visna se

caractérisé par l'apparition de syncytia, le développement d'un processus apoptotique avec *in fine* une lyse cellulaire permettant la libération des virions. Les précédents travaux du laboratoire ont établi l'apparition des principales modifications morphologiques apoptotiques (condensation et fragmentation chromatinienne), mais aussi biochimiques avec l'activation de la cascade des caspases. Le traitement des cellules de PC infectées, par des inhibiteurs de caspases, retarde l'apparition du phénomène de lyse cellulaire en permettant un maintien de l'intégrité membranaire et en réduisant la production de particules virales. En utilisant ces inhibiteurs, il a été possible de démontrer que l'activation des caspases est associée aux effets cytopathologiques induits par le virus Visna (Duval *et al.*, 2002a). Ces travaux ont permis de conclure que l'ECP observé après infection des cellules de PC est en relation directe avec l'induction de l'apoptose. De part l'activation des caspases-8 et -9, nous avons aussi déterminé l'implication des voies extrinsèque et intrinsèque au cours de l'apoptose Visna-induite.

Notre travail a pour but de rechercher les événements moléculaires qui se produisent en amont de l'activation des caspases, avec la mise en évidence de l'implication de la mitochondrie dont le rôle est complexe dans l'activation et la régulation de l'apoptose, et aussi de caractériser l'enchaînement des événements et des différentes protéines qui régulent son intervention.

Nous avons tout d'abord exploré la voie intrinsèque mitochondriale et la voie secondaire qui en découle : la voie indépendante des caspases.

La mitochondrie, délimitée par une double barrière membranaire, est le théâtre d'échanges d'ions et de protéines. L'isolement relatif de la mitochondrie lui permet de maintenir, au niveau de sa membrane interne, un potentiel électrochimique élevé qui est nécessaire à ses fonctions métaboliques. Des modifications majeures de la perméabilité mitochondriale semblent déterminantes dans le déclenchement de la mort cellulaire programmée (Kroemer *et al.*, 1998). Elles se produisent bien avant l'activation des caspases et des endonucléases (Green & Kroemer, 1998). Au cours de l'apoptose, la mitochondrie subit des modifications de la perméabilité de ses deux membranes. Les équipes de B. Mignotte et G. Kroemer ont montré que la dissipation du potentiel de la membrane interne mitochondriale était un événement précoce de l'apoptose (Vayssière *et al.*, 1994 ; Zamzami *et al.*, 1996). Par utilisation d'un fluorochrome sensible à l'état du **potentiel mitochondrial transmembranaire**, nous avons mis en évidence l'existence d'une chute de ce potentiel lors

de l'infection *in vitro* par le virus Visna. Cette chute est très marquée à 7 jours pi avec près de 80% des cellules à $\Delta\Psi_m$ très bas, contre seulement 11% dans les cellules de PC non infectées. Le marquage *in situ* avec le fluorochrome JC-1 nous permet d'observer la chute du $\Delta\Psi_m$ dans les syncytia ce que nous ne pouvions pas distinguer par CMF. **La chute du potentiel mitochondrial transmembranaire concerne donc toutes les populations cellulaires autant les cellules individuelles que les syncytia.** Elle se manifesterait même précocément dans les syncytia puisque dès 3 jours d'infection, ils ont des mitochondries à bas $\Delta\Psi_m$ visibles. Nos travaux sont en accord avec ceux de Ferri *et al.* (2000a) qui décrivent les mêmes phénomènes dans des syncytia issus de cellules HeLa transfectées par le gène env du HIV-1. La chute du $\Delta\Psi_m$ s'observe aussi dans les cellules de PC traitées par la staurosporine, inducteur chimique d'apoptose sur de nombreux types cellulaires (Bijur *et al.*, 2000). La staurosporine a été choisie lors de nos précédentes études comme contrôle positif d'apoptose dans notre modèle cellulaire (Duval, 2003). Parmi les nombreux stress testés tels que la privation de sérum, les radiations gamma ou un grand nombre de molécules chimiques, seule la staurosporine s'est révélée être un inducteur efficace d'apoptose sur les cellules de PC. La chute du $\Delta\Psi_m$ apparaît dans les cellules de PC traitées par la staurosporine après seulement 2 heures de traitement avec plus de la moitié des cellules présentant un $\Delta\Psi_m$ bas.

En 1996, le groupe de Wang montre qu'une protéine présente dans l'espace intermembranaire mitochondrial, **le cytochrome c**, est libérée dans le cytoplasme et interagit avec la protéine Apaf-1 contribuant à l'activation des caspases en particulier l'activation de la procaspase-9 en caspase-9 active, après formation d'un complexe : l'apoptosome (Ravagnan *et al.*, 2002). D'autres molécules de tailles supérieures à celle du cyt-c sont également libérées de l'espace intermembranaire au cours de l'apoptose. C'est le cas de l'**AIF**, flavoprotéine de 57 Kda caractérisée par le groupe de G. Kroemer (Susin *et al.*, 1999b). Celle-ci est redistribuée de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol puis vers le noyau où elle induit une condensation de la chromatine (Susin *et al.*, 2000). L'espace intermembranaire mitochondrial abrite aussi certaines caspases, sous la forme de zymogènes inactifs tels que les pro-caspases-2, -3, -8 et -9, qui sont libérées et activées dans des conditions proapoptotiques (Susin *et al.*, 1999a). Dans le but de mettre en évidence la libération du cyt-c et de l'AIF, nous avons utilisé deux techniques : le western-blot et l'immunocytochimie nous ont permis d'observer l'expression des protéines cyt-c et AIF dans les cellules de PC infectées ou traitées

par la staurosporine et les variations d'expression de ces protéines dans les différents compartiments cellulaires : le noyau, le cytoplasme et la mitochondrie.

Les protéines AIF et cyt-c sont observées dans les extraits protéiques totaux des cellules de PC. L'infection entraîne une augmentation progressive de l'expression du cyt-c alors que la quantité d'AIF ne varie pas par rapport au témoin. Par fractionnement des protéines cellulaires, **la présence de l'AIF dans le noyau des cellules infectées est mise en évidence dès 3 jours post-infection**, puis la quantité d'AIF augmente dans le noyau après 5 jours d'infection et diminue à 7 jours, alors qu'elle ne varie pas dans la fraction mitochondriale des cellules infectées. **La libération du cyt-c débute aussi à 3 jours pi** avec un relargage massif ensuite ce dernier est absent du cytoplasme. Ce résultat est surprenant puisque nous détectons la présence du cyt-c dans les extraits protéiques totaux quel que soit le temps d'infection. Nous supposons qu'au cours de la technique d'extraction puis de séparation des protéines, nous avons perdu une grande quantité de cyt-c. D'après l'augmentation d'expression du cyt-c dans les extraits totaux infectés, on peut supposer que le cyt-c est produit en quantité suffisante suite à l'infection pour former de nombreux complexes apoptosomes et activer une grande quantité de caspase-9. En revanche, AIF agit seul dans le noyau des cellules pour induire une voie caspase-indépendante. L'ordre de relargage de ces deux molécules varie en fonction du stimulus apoptotique et du type cellulaire (Ferri *et al.*, 2000b). **On peut dire que le cyt-c et l'AIF sont libérés de la mitochondrie simultanément au cours de l'infection par le virus Visna.** Dans le cas de l'infection *in vitro* par le HIV, le relargage de l'AIF précède celui du cyt-c de quelques heures ; une boucle d'amplification par l'AIF accentue l'ouverture des pores mitochondriaux et la chute du $\Delta\Psi_m$, sans connaissance du mécanisme précis (Ferri *et al.*, 2000b). Nous observons dans les cellules de PC infectées, une chute du potentiel mitochondrial transmembranaire au niveau de la membrane interne puis un relargage des molécules apoptogènes *via* la membrane externe mitochondriale ; l'apoptose Visna-induite s'accompagne des signes traduisant la perméabilisation des deux membranes mitochondriales, comme c'est le cas lors de l'infection par le HIV, mais avec une chronologie des événements un peu différente (Ferri *et al.*, 2000a). Le traitement par la staurosporine entraîne aussi la libération du cyt-c et de l'AIF. Mais dans ce cas, la chute du potentiel mitochondrial commence dès 2 heures de traitement et le relargage du cyt-c et de l'AIF apparaissent après 5 heures de traitement.

La méthode *in situ* par marquage immunocytochimique confirme l'augmentation de l'expression du cyt-c à 2 et 3 jours pi. Il nous est impossible de visualiser le relargage du cyt-c

dans le cytoplasme mais seulement une augmentation d'expression. En revanche, nous détectons la présence de l'AIF dans le noyau des cellules infectées et nous observons très nettement que **le relargage de l'AIF se manifeste dans les cellules individuelles comme dans les syncytia**. Au delà de trois jours pi, le marquage immunocytochimique ne nous permet pas d'observer des différences de marquage.

On peut affirmer que le virus Visna active la voie intrinsèque mitochondriale qui permet la libération de l'AIF et du cyt-c. La libération de l'AIF et sa localisation nucléaire est caractéristique de l'activation de la voie indépendante des caspases (Susin *et al.*, 2000). Ces événements mitochondriaux, dissipation du potentiel de la membrane interne mitochondriale et libération de facteurs à travers la membrane externe mitochondriale, sont caractéristiques de l'apoptose (Kroemer & Reed, 2000) et modulés par les protéines pro- ou anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Gross *et al.*, 1999 ; Borner, 2003). Les protéines anti-apoptotiques comme bcl-2 ou Bcl-X_L sont en partie localisées au niveau de la membrane externe mitochondriale. Cette localisation empêche la dissipation du potentiel mitochondrial ainsi que la libération du cyt-c et d'AIF à travers la membrane externe. Inversement, les protéines pro-apoptotiques de cette famille comme Bax, Bim, Bmf ou Bak sont solubles et viennent s'ancrer à la membrane pour agir directement et induire ces modifications. On suppose que ces protéines interviennent directement dans les modifications de la perméabilité mitochondriale au cours de l'apoptose (Green & Reed, 1998). Des mitochondries, isolées à partir de cellules surexprimant Bcl-2, présentent une résistance à l'ouverture du PTP ; inversement, la micro-injection de la protéine Bax recombinante dans des cellules induit la dissipation du potentiel mitochondrial et l'apoptose de ces cellules (Marzo *et al.*, 1998 ; Vander Heiden *et al.*, 1997).

Quels sont alors les rôles des protéines Bcl-2 et Bax dans l'apoptose Visna-induite ?

L'analyse par western blot démontre une chute d'expression de Bcl-2 à 3 jours post-infection et **aucune expression n'est détectée au-delà**. Le marquage immunocytochimique montre une très faible expression de la protéine Bcl-2 dans les cellules non infectées. En revanche, elle est seulement exprimée dans quelques cellules infectées à 3 jours pi. Cela a aussi été observé lors de l'infection par le HIV où les protéines Tat et gp120 provoquent une chute de l'expression de Bcl-2 qui précède la chute du potentiel mitochondrial membranaire (Sastray *et al.*, 1996 ; Hashimoto *et al.*, 1997). La protéase du HIV serait également capable de provoquer le clivage de la protéine Bcl-2 par activation de la caspase-8, modifiant ainsi la balance entre la quantité

de membres pro- et anti-apoptotiques (Strack *et al.*, 1996). Dans le cas du virus Visna, il n'a pas été possible de justifier l'absence de protéines Bcl-2 dans les cellules infectées à partir de 5 jours d'infection mais la protéase du rétrovirus pourrait être responsable du clivage de la protéine Bcl-2 puisque dans notre modèle la caspase-8 est active. La chute d'expression puis l'absence de Bcl-2 dans les cellules de PC infectées coïncident cinétiquement avec la chute du $\Delta\Psi_m$. Bcl-2 ne peut plus alors réguler l'ouverture des pores mitochondriaux dans les cellules infectées par le virus Visna.

L'emploi de trois méthodologies différentes : RT-PCR, western-blot et immunocytochimie ne nous a pas permis de mettre en évidence **l'expression de l'ARNm, ni l'expression de la protéine Bax dans les cellules de PC** non infectées ni dans les cellules infectées par le virus Visna ou traitées par la staurosporine. Alors que dans des lymphocytes T infectés par le HIV, l'augmentation de l'expression des ARNm et de la protéine Bax est détectée dès 48h d'infection (Genini *et al.*, 2001). Les amorces PCR que nous avons utilisées ne convenaient pas. Les trois anticorps anti-Bax testés, provenant de fournisseurs différents, ne nous ont pas permis de mettre en évidence l'expression de la protéine Bax. Deux hypothèses peuvent expliquer ces résultats. Le gène codant pour la protéine Bax n'est pas exprimé dans les cellules de PC alors que l'expression de Bax serait ubiquitaire ou bien un ou plusieurs autres membres de la famille de protéines Bcl-2 jouerait son rôle pro-apoptotique. La séquence du génome ovin n'est pas complètement connue ce qui explique nos difficultés. Les anticorps que nous avons utilisés sont le plus souvent des anticorps dirigés contre des protéines humaines et non ovines, ce qui pourrait être une explication de leur non-spécificité. Ceci limite les expérimentations au niveau moléculaire.

La **protéine p53** joue un rôle central dans le maintien de la stabilité et de l'intégrité du génome cellulaire. En tant que facteur de transcription, elle bloque la transition G1/S du cycle cellulaire et joue un rôle dans l'induction de la mort cellulaire par apoptose (Levine, 1997). Les altérations de l'ADN, la déplétion en facteurs de croissance ou encore l'expression de protéines virales peuvent déclencher la voie apoptotique dépendante de la protéine p53. La protéine p33 des baculovirus et le HIV activeraient par phosphorylation la voie p53-dépendante conduisant au relargage du cyt-c et de l'AIF puis à l'activation des caspases (Prihod'ko *et al.*, 1999; Genini *et al.*, 2001). Mais certains autres virus ont développé des mécanismes pour bloquer l'apoptose induite par la protéine suppresseur de tumeur p53 (Hardwick, 1997). Parmi ces virus, on peut citer des virus à ADN, tels les adénovirus

humains, le virus simien (SV40) ou les papillomavirus humains, mais aussi des virus à ARN, tels le HIV et les virus HTLV-1 et 2 (Teodoro & Branton, 1997a et b). Le HIV est à la fois un activateur et un répresseur de la voie p53 dépendante. En effet, les protéines du HIV possèdent des rôles antagonistes d'inducteur ou de répresseur de l'apoptose : c'est le cas par exemple de la protéine Tat (McCloskey *et al.*, 1997 ; Harrod *et al.*, 2003).

Pour explorer l'expression de p53 dans notre système cellulaire d'infection *in vitro*, nous avons utilisé deux anticorps dirigés contre la protéine p53 : un anticorps anti-p53 et un anticorps anti-p53 phosphorylée sur la sérine 392. Le facteur de transcription p53 est actif sous la forme d'un tétramère (Levine, 1997) qui semble se stabiliser par phosphorylation sur la sérine 392 (Sakaguchi *et al.*, 1997). Nous avons démontré que l'infection par le virus Visna induit une augmentation progressive de l'expression de la protéine p53 jusqu'à 7 jours pi. Par double marquage p53 phosphorylée/DAPI nous avons détecté dans les noyaux apoptotiques des cellules infectées, la présence de p53 phosphorylée active. L'infection par ce virus ovin entraîne l'augmentation de l'expression de la protéine p53, son activation par phosphorylation sur la sérine 392 et sa translocation nucléaire. Ainsi, lors de l'infection par le virus Visna, p53 agit majoritairement comme facteur de transcription. Dans la littérature, Gougeon (2001) constate une chute de l'expression de la protéine p53 lors de l'infection par le HIV. Ceci est décrit comme un moyen de suppression de l'apoptose par le virus. D'autres auteurs ont montré une augmentation de l'expression de p53 phosphorylée sur la sérine 15 (Genini *et al.*, 2001) *in vitro*. Marchenko *et al.*, 2000 ont aussi publiés que p53 serait capable de s'insérer dans la membrane mitochondriale pour activer le complexe Apaf-1/caspase-9, sans libération et intervention du cyt-c. p53 serait également capable de se lier à des protéines virales telles que Tat ou Vpr du HIV pour agir sur l'apoptose (Ariumi *et al.*, 2001 ; Sawaya *et al.*, 1998). Le HIV est l'exemple type de la complexité d'un système d'infection virale apoptotique, contrairement à l'effet d'une drogue qui agit toujours de façon identique sur les mêmes cellules en culture en respectant les mêmes conditions expérimentales. Dans le cas des virus, comme c'est le cas pour le virus Visna, les cinétiques d'apparition des phénomènes peuvent varier d'un lot à l'autre.

Par activation de quelle cible transcriptionnelle p53 agit dans notre système cellulaire ?

Nous avons démontré que l'expression de la protéine Bcl-2 est sous-exprimée voire absente lors de l'infection *in vitro* par le virus Visna. Les gènes *Bcl-2* et *Bax* mais aussi *p21* font partie des cibles transcriptionnelles de la protéine p53. La protéine p21 est un inhibiteur

des complexes cyclines/kinases qui régulent les transitions entre les différentes phases du cycle cellulaire. La protéine p21 agit principalement en provoquant l'arrêt des cellules en phase G1 du cycle cellulaire. Nous constatons une augmentation de l'expression de **la protéine p21** après 7 jours d'infection. Les travaux de Devireddy & Jones (1999) décrivent le même phénomène lors de l'infection par le virus de l'herpès bovin 1. Néanmoins, bien que l'expression de p21 augmente, la représentation de l'analyse du cycle cellulaire des PC infectées ne montre aucun arrêt du cycle. Il aurait été intéressant de pouvoir déterminer par l'analyse de l'expression des ARNm, si p21, Bax et Bcl-2 sont régulés dans notre système par p53. En référence à la bibliographie et par comparaison avec le HIV, nous supposons que l'expression de Bcl-2 serait régulée par les protéines virales du virus Visna. Lors de l'infection par le HIV, l'expression de l'ARNm et de la protéine p21 est surexprimée (Génini *et al.*, 2001). Vpr active p21 par une voie p53-dépendante. Vpr provoque *via* p21 un arrêt du cycle cellulaire en G2/M, permettant la production de particules virales, ce qui empêcherait la réponse immunitaire de l'hôte et ainsi favoriserait la persistance virale (Chowdhury *et al.*, 2003). Dans notre modèle PC-Visna, l'augmentation de l'expression de p21 n'entraîne pas l'arrêt du cycle cellulaire, ni en G1, ni en G2/M. p21 pourrait alors être surexprimée selon une voie indépendante de p53 et favoriser l'apoptose. p21 est aujourd'hui décrite comme impliquée dans l'apoptose indépendamment de p53 mais son action dépendrait du signal apoptotique (Gartel & Tyner, 2003). Par exemple dans des lignées Hep3B déficientes en p53, la surexpression de p21 provoque l'apoptose, comme les radiations ionisantes le font par surexpression de p21 dans des thymocytes (Gartel & Tyner, 2003). Le génome du virus Visna ne code pas de protéine Vpr ou son équivalent. De très récents travaux démontrent un arrêt cellulaire en G2 suite à l'infection par un virus CAEV recombinant exprimant les gènes Vpr et Vpx issus du SIV (Bouzar Baya *et al.*, 2003). Il a aussi été décrit que la protéine Bcl-2 est capable de provoquer un arrêt du cycle cellulaire en G1 par un mécanisme encore inconnu (Rincheval *et al.*, 2002). Suite à l'infection par le virus Visna, l'absence d'expression à la fois de Vpr et Bcl-2 pourrait expliquer que le cycle cellulaire ne s'arrête ni en G1 ni en G2 dans les cellules de PC infectées.

L'analyse du cycle cellulaire met en évidence **la présence d'une population sub-G1 dans les cellules infectées par le virus Visna**. Le nombre de cellules en sub-G1 augmente avec le temps d'infection. Ce phénomène a été aussi observé lors de l'infection, *in vitro*, de cellules d'origine pulmonaire par le CAEV (Gendelman *et al.*, 1997). Dès 4 jours d'infection, des cellules ont un contenu en ADN diminué par perte de fragments d'ADN clivés au cours

de l'apoptose ; c'est ce que nous avons montré sur l'échelle de ladders par électrophorèse. Nous supposons d'après la largeur du pic sub-G1 que la population cellulaire possède un contenu en ADN variable du à la perte de fragments hétérogènes. Plus le temps d'infection augmente plus la largeur du pic augmente. Il y a donc bien induction d'un processus apoptotique lors de l'infection par le virus Visna puisque la fragmentation de l'ADN est une des caractéristiques de la mort cellulaire par apoptose (Rasola *et al.*, 1999; Sakahira *et al.*, 1999; Ferri *et al.*, 2000). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par la technique TUNEL, technique qui marque les extrémités 3'-OH libérées lors du clivage de l'ADN (Duval *et al.*, 2002b). Le traitement par la staurosporine concrétise aussi un pic sub-G1 indiquant une fragmentation de l'ADN des cellules de PC, mais la taille du pic est moins large. La staurosporine provoque le clivage de l'ADN entre les nucléosomes permettant l'obtention de fragments de taille régulière. De nombreux articles décrivent le profil en échelle ou ladders comme un critère non irréfutable de la mort cellulaire (Hengartner, 2000). Certains auteurs ont montré qu'en fonction du type cellulaire, de la nature du stimulus apoptotique, l'ADN des cellules apoptotiques n'est pas oligo-fragmenté, ce qui se traduit par une absence de ladders. L'analyse de l'ADN issu de cellules de PC apoptotiques infectées montre un profil de migration différent de celui après traitement par la staurosporine. Les fragments ont un poids moléculaire supérieur à 180 pb ou à des multiples de 180 pb. Le même phénomène est observé dans le cas du virus de la rage, *in vitro* (Cheung *et al.*, 2000), alors que d'autres virus comme le virus influenza (Uchida *et al.*, 2002), le HSV-1 (Koyama & Adachi, 1997), le BHV-1 (Hanon *et al.*, 1998), le HIV (Plymale *et al.*, 1999) ou le CAEV (Gendelman, 1997) présentent une échelle d'ADN caractéristique, libérant des fragments d'ADN distants de 180 à 200 pb. Concernant les cellules de PC infectées, nos résultats sont concordant avec ceux obtenus par CMF. Certains auteurs ont publié que les cellules apoptotiques ne présentant pas de profil en échelle, ont une fragmentation chromatinienne de haut poids moléculaire de l'ordre de 50 Kb visible par électrophorèse en champ pulsé (Sakahira *et al.*, 1999 ; Oberhammer *et al.*, 1993). Cette fragmentation pourrait aussi être en relation avec la libération de l'AIF qui est responsable d'une fragmentation de haut poids moléculaire (Susin *et al.*, 2000).

Tous les évènements moléculaires que nous venons de justifier précèdent généralement l'activation des caspases (Green & Kroemer, 1998). **L'activation des caspases-3, -8 et -9** est caractéristique de l'apoptose Visna-induite ; elle est directement associée aux

effets cytopathologiques du virus Visna (Duval *et al.*, 2002a). Les résultats que nous obtenons confirment l'activation des caspases mais des différences mineures dans les cinétiques d'apparition des différentes activités sont observées. Les délais d'apparition des phénomènes apoptotiques peuvent varier, du fait que nous n'avons pas utilisé le même lot de virus et de cellules primaires. Ces deux facteurs modifient sensiblement la reproductibilité des cinétiques. Nous montrons que l'activité caspase-9 commence à devenir significative à 6 jours pi, après le relargage du cyt-c et la formation de l'apoptosome. La caspase-8, impliquée dans la voie extrinsèque, est aussi active à 6 jours pi, en même temps que la caspase-9. On peut supposer que ces deux voies d'apoptose sont activées en parallèle par le virus Visna. La caspase-3 est active dès 5 jours pi avec un pic d'activité maximal à 7 jours pi, plus tardif que pour les caspases-8 et -9. L'activité caspase-3 est maximale après activation des caspases-8 et -9 avec une intensité beaucoup plus importante que celle des caspases-8 et -9. Dans les cellules de mammifères, la pro-caspase-3 est exprimée en plus grande quantité que les précurseurs des autres caspases (Earnshaw *et al.*, 1999). Les voies apoptotiques intrinsèque (caspase-9) et extrinsèque (caspase-8) convergent vers l'activation de la caspase exécutrice majeure, la caspase-3 comme cela est décrit dans la plupart des systèmes cellulaires (Roy & Nicholson, 2000). L'apoptosome représente un des éléments déclencheurs de la voie d'exécution du processus apoptotique en clivant et en activant la caspase-3. Une fois active dès 5 jours pi, elle entraîne des coupures dans l'ADN. Le relargage de l'AIF est aussi directement responsable de coupures directes dans l'ADN cellulaire (Ye *et al.*, 2002): il est relargué dès 3 jours pi avec un pic à 5 jours pi. Le profil électrophorétique de migration de l'ADN obtenu pourrait être le résultat d'une action concertée entre l'AIF et la caspase-3. L'un agissant directement, le second par l'intermédiaire d'autres protéines cellulaires. L'absence d'activation de la caspase-1, caspase induite au cours de la réponse inflammatoire (Earnshaw *et al.*, 1999), nous montre que l'infection *in vitro* par le virus Visna n'induit à aucun moment de réponse inflammatoire, confirmant l'absence de nécrose. En revanche, la fuite de LDH constatée après 7 jours d'infection correspondrait à une nécrose secondaire due à l'ECP lytique du virus. La lyse est une conséquence inhérente à notre système d'infection mais aussi à l'absence de phagocytose des cellules apoptotiques. Ce phénomène de nécrose secondaire a été observé lors d'autres études, *in vitro* (Kroemer *et al.*, 1998).

Nous avons beaucoup comparé les mécanismes de transduction du signal apoptotique Visna-induit avec les voies empruntées lors de l'infection par le HIV et nous constatons que

les mécanismes apoptotiques Visna-induit sont apparentés à ceux induits par le HIV. Les travaux de Finkel en 1995 démontrent que, dans le cas du HIV, les cellules infectées « de façon productive » sont peu apoptotiques et les cellules apoptotiques sont rarement infectées. L'infection, *in vitro*, des lymphocytes T CD4 est associée à l'effet cytopathologique du HIV qui induit la mort par apoptose des cellules infectées, conséquence directe de l'infection virale, mais aussi indirectement par certaines voies pro-apoptotiques dans les lymphocytes non infectés après activation par les protéines du virus (Gougeon, 2003). Ces phénomènes aboutissent à la destruction des lymphocytes T CD4 sachant que le HIV active des mécanismes directs mais aussi indirects pour détruire les lymphocytes par apoptose, observe-t-on le même phénomène lors de l'infection *in vitro* par le virus Visna ? Quelle est la proportion de cellules infectées par le virus Visna dans la culture et quelle est la corrélation entre infection et apoptose avec notre rétrovirus animal ?

En absence d'anticorps dirigés contre des protéines virales du virus Visna nous n'avons pas pu différencier les cellules infectées et produisant des particules virales, des cellules non infectées. Nous avons donc utilisé un autre type cellulaire grâce à une collaboration avec l'AFSSA de Niort. Les fibroblastes d'origine caprine ou GSM, issus de membrane synoviale, ont la capacité d'être infectés par le virus Visna comme l'a montré Chebloune en 1996 avec l'apparition de syncytia, *in vitro*. Les cellules de GSM utilisées dans notre étude sont immortalisées et transfectées par un gène rapporteur sous la dépendance d'un promoteur viral. **Les cellules de GSMt-lac** sont avant tout des lignées "indicatrices". Jusqu'à ce jour, l'intérêt de cette lignée cellulaire était de permettre une mesure quantitative des titres viraux et de s'orienter vers une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans l'infectivité et la réplication des lentivirus des petits ruminants (Valas *et al.*, 2003). Cette lignée a été construite sur un modèle similaire de cellules Hela contenant le gène de la β -galactosidase sous le contrôle d'un LTR tronqué du HIV-1, appelée CD4-LTR/beta-gal. Elle a été aussi utilisée pour mesurer les titres viraux de stocks de HIV-1 (Kimpton & Emerman, 1992). En 1997, Gendelman *et al.* démontre que le taux d'apoptose maximal obtenu dans les cellules de GSM infectées par le CAEV est de 24% après 6 jours d'infection.

Il existe peu de systèmes cellulaires, *in vitro*, sur lesquelles le virus Visna a la capacité de se répliquer, mis à part les PC et les macrophages ovins qui sont les cibles majeures du virus *in vivo*. Après infection par le virus Visna, **les cellules de GSMt-lac présentent un ECP caractéristique** : présence de syncytia après coloration par May-Grünwald et Giemsa et une lyse cellulaire caractérisée par le relargage tardif de la LDH. L'ECP apparaît plus

tardivement que dans les cellules de PC ; les syncytia sont visibles dès 6 jours pi contre 3 jours pour les PC et le relargage de la LDH est élevé dès 9 jours pi contre 7 jours dans le cas des cellules de PC. Pour obtenir ces résultats nous avons testé une infection massive par le pool viral au lieu de la dose infectante de 0,1 MOI utilisée avec les cellules de PC. Ces différences dans la cinétique d'apparition de l'ECP peuvent être dues à l'origine cellulaire des GSMt-*lac* qui ne sont pas les cibles préférentielles du virus Visna, elles seraient donc moins permissives au virus. **La staurosporine est aussi un inducteur d'apoptose sur les cellules de GSMt-*lac*.** Le traitement par la staurosporine semble induire plus rapidement la fragmentation de l'ADN des cellules de GSMt-*lac* que celle des cellules de PC ; deux heures après traitement, la totalité des noyaux apparaît fragmentée par marquage DAPI. Leur immortalisation et leur transfection pourraient les rendre plus sensibles. En effet, on obtient un faible taux d'apoptose spontanée dans les cellules de GSMt-*lac* contrôle.

Suite à l'infection par le virus Visna, nous avons mis en évidence dans les cellules de GSMt-*lac* l'apparition des modifications morphologiques caractéristiques de l'apoptose (condensation et fragmentation de la chromatine) mais aussi biochimiques avec activation de la caspase exécutive majeure, la caspase-3. Notre but n'a pas été de décrire les voies apoptotiques induites lors de l'infection des cellules de GSMt-*lac* par le virus Visna mais de mettre en évidence l'induction d'un processus apoptotique. En utilisant un couple substrat/inhibiteur spécifique de la caspase-3, nous avons montré que **la caspase-3 est active** avec un pic significatif à 8 jours pi. L'activité maximale de la caspase-3 (1122 URF) est plus élevée dans les cellules de GSMt-*lac* que dans les cellules de PC (maximum à 543 URF). Ceci peut s'expliquer par une apoptose spontanée des cellules de GSMt-*lac* témoins avec 496 URF contre 184 URF dans les cellules de PC témoins. Après traitement par la staurosporine, l'activité caspase-3 est plus basse (810 URF) dans les cellules de GSMt-*lac* que dans les cellules de PC avec 4002 URF, mais le temps de traitement varie. La staurosporine comme le virus Visna sont des inducteurs d'apoptose aussi bien dans les cellules de PC que dans les cellules de GSMt-*lac*.

Les cellules de GSMt-*lac* sont des lignées indicatrices c'est à dire que lorsqu'une cellule de GSMt-*lac* est infectée et qu'elle synthétise la protéine Rev, elle se colore en bleu en présence de X-gal. Ces cellules nous permettent de distinguer, après infection, les cellules non infectées (non bleues) des cellules infectées capables de déclencher un nouveau cycle viral (bleues). En revanche, il nous est impossible de connaître la proportion de cellules infectées de façon latente puisque celles-ci ne seront pas bleues. Nous nous sommes donc intéressés

uniquement aux cellules capables de déclencher un nouveau cycle viral et de produire de nouvelles particules virales puisque l'intérêt premier de cette lignée est de permettre la mesure du titre viral.

Grâce aux cellules de GSMt-*lac* nous démontrons qu'après infection seulement 13% des cellules sont infectées et déclenchent un nouveau cycle viral (gal+) alors que nous obtenons un taux maximum d'apoptose de 51% (DAPI+). Une chute du taux d'apoptose (44%) à 9 jours s'explique par l'apparition de la nécrose secondaire. Après infection, en culture, certaines cellules sont donc non infectées et d'autres infectées de façon latente ou de façon productive. Par double coloration X-gal/DAPI, nous avons expliqué la différence entre le taux de cellules infectées et le taux d'apoptose. Comme pour le HIV, les cellules infectées qui sont capables de déclencher un nouveau cycle de réplication viral ne sont pas toujours apoptotiques et inversement. C'est à dire que la plupart des cellules en apoptose serait non infectée et les cellules infectées seraient rarement apoptotiques. Comme Finkel (1995), nous supposons que les cellules infectées par le virus Visna et productives, synthétisent des protéines virales solubles telles que Tat ou la gp135. Elles provoqueraient l'apoptose des cellules non infectées ou des cellules pour lesquelles le virus est à l'état latent. Nos résultats ont été obtenus dans les cellules de GSMt-*lac* et non dans les cellules de PC mais on peut supposer qu'il se produit le même phénomène. On peut aussi penser que les voies intrinsèque et extrinsèque, que nous avons décrites comme induites lors de l'infection dans les cellules de PC, pourraient ne pas être activées en parallèle dans une même cellule. L'apoptose des cellules infectées et des cellules non infectées pourraient être la conséquence de l'activation de l'une ou l'autre voie et non des deux, comme cela est décrit dans le cas du HIV (Gougeon, 2003). De part la présence de différentes « populations » cellulaires dans la culture infectée, nous pensons que toutes les cellules ne sont pas synchrones dans l'apparition des phénomènes apoptotiques.

Quel serait alors le rôle de l'apoptose lors de l'infection, *in vitro*, par le virus Visna ? Dans le cas du HIV on lui décrit à la fois un rôle activateur et un rôle répresseur de l'apoptose. Dans le cas des adénovirus, l'apoptose est tout d'abord inhibée par les protéines virales telles que E1B, puis la protéine virale E1A lève cette inhibition pour permettre la dissémination des nouvelles particules virales. De part les différents résultats que nous obtenons, on peut supposer que les cellules non infectées entrent en apoptose précocément pour ne pas être infectées à leur tour et empêcher la propagation des particules virales. On peut aussi penser que le rôle du virus, *in vitro*, est de détruire toutes les cellules et surtout

celles qu'il n'arrive pas à infecter. Par contre dans les cellules infectées et productives, le virus retarderait l'apoptose afin de produire de nouvelles particules virales ; ceci est en accord avec de précédents résultats qui décrivent que dans les cellules de PC infectées 20 % seulement de syncytia sont apoptotiques. Le rôle des syncytia est peu décrit dans la bibliographie mais ces derniers pourraient constituer des réservoirs de virions. Les cellules infectées entrent en apoptose tardivement et libèrent les particules virales néosynthétisées dans l'environnement cellulaire. Dans le cas du virus Visna, le processus apoptotique représenterait une étape importante dans la dissémination du virus aux cellules voisines. Comme le HIV, le virus Visna a su développer des stratégies directes et indirectes pour détruire les cellules qu'il infecte *in vitro*.

Les processus apoptotiques viro-induits sont à l'origine de dérèglements cellulaires qui influencent l'évolution clinique des infections virales. L'infection par le HIV en est un exemple très représentatif. Il est alors intéressant de rechercher si **l'utilisation de drogues antivirales** agit sur les événements apoptotiques ce qui modifierait l'évolution de la pathogenèse. En absence de vaccins contre les maladies Visna et Maedi, nous avons testé sur notre modèle virus-cellule, l'effet d'un inhibiteur de la reverse transcriptase virale et d'un inhibiteur de protéase le Nelfinavir[®].

Nous avons contrôlé pour chacune des techniques utilisées pour déceler l'apoptose que d'une part l'AZT n'a pas d'action pro-apoptotique sur les cellules ovines de PC à la dose non cytotoxique de 25 μ M et d'autre part qu'il ne protège pas de l'apoptose induite par un inducteur chimique tel que la staurosporine. Cet inhibiteur de la reverse transcriptase virale a bien une action spécifique sur l'enzyme virale qui intervient dans la réplication du virus Visna. Le traitement par l'AZT n'induit aucune modification morphologique nucléaire (condensation et fragmentation chromatinienne, apparition de ladders) et les activités caspase-1, -3, -8 et -9 sont identiques à celles des cellules témoins non infectées et aucun marquage avec le FITC-VAD-FMK n'est observé dans les cellules de PC traitées uniquement par l'AZT.

Le traitement par l'AZT des cellules de PC infectées par le virus inhibe les modifications morphologiques caractéristiques de l'apoptose visibles après coloration DAPI. Il réduit le pourcentage d'apoptose de 50 à 20% et empêche l'apparition des ladders. Les modifications morphologiques et les étapes terminales de l'apoptose (fragmentation) sont bloquées par l'AZT. La fragmentation de la chromatine lors du processus apoptotique est le résultat de l'activation de la caspase-3 (Budijardjo *et al.*, 2000). L'endonucléase responsable

du clivage de l'ADN est constituée d'une sous-unité inhibitrice (DFF45/ICAD) et d'une sous-unité endonucléasique (DFF40/CAD), lorsqu'elle est inactive. Son activation par la caspase-3 entraîne le clivage et la dissociation des deux sous-unités (Widlak *et al.*, 2000). On a montré que l'activité caspase-3 est totalement inhibée lors du traitement des cellules de PC infectées par l'AZT. L'activation de la caspase-3 est le résultat de l'activation des voies extrinsèque et intrinsèque apoptotiques (Roy & Nicholson, 2000). C'est l'exemple typique du mécanisme en cascade due à l'action des caspases initiatrices (caspase-8) ou régulatrices (caspase-9) agissant en amont par clivage de la pro-caspase-3 en caspase active (Roy & Nicholson, 2000). Ainsi le traitement des cellules infectées par l'AZT inhibe l'activation des caspases-8 et -9, mais ne modifie pas l'absence d'activité caspase-1.

A ce stade, on peut supposer que l'AZT est un inhibiteur d'apoptose à large spectre puisque les voies intrinsèque et extrinsèque ne sont pas activées lors de l'infection et du traitement par l'AZT. Ces caspases sont-elles les seules qui sont inactives dans les cellules de PC après traitement par l'AZT ? Le FITC-VAD-FMK, inhibiteur de caspases à large spectre, marque spécifiquement des cellules qui contiennent des caspases actives. En revanche, dans les cellules infectées par le virus et traitées par l'AZT, on ne retrouve plus aucune cellule marquée donc il n'y a plus aucune caspase active. L'AZT n'inhibe pas seulement l'activation des caspases-3, -8 et -9, mais toutes les caspases.

L'absence de relargage de l'AIF dans les cellules traitées par l'AZT a confirmé que la voie mitochondriale n'est pas active. Lors de l'étude de la chute du potentiel mitochondrial transmembranaire, nous démontrons que l'AZT n'inhiberait que partiellement l'apoptose Visna-induite puisque 51% des cellules traitées par l'AZT présentent une chute du $\Delta\Psi_m$ à 7 jours pi contre 80% pour les cellules infectées après 7 jours mais non traitées et 11% pour les cellules témoins.

Les travaux de R. Duval (2002b), et nous l'avons confirmé, démontre que l'infection par le virus Visna est associée à un phénomène apoptotique et non nécrotique, d'une part parce que la perte de l'intégrité membranaire ne s'observe que très tardivement au cours de l'infection et que la caspase-1 inflammatoire n'est pas activée. Nous avons montré que la perte de l'intégrité membranaire est retardée dans les cellules infectées après traitement par l'AZT puisque le relargage de LDH est diminuée. L'AZT continue à exercer un rôle inhibiteur sur le relargage de la LDH car, après avoir renouvelé le surnageant de culture par un milieu neuf sans AZT, on remarque que le relargage de LDH est diminué dans les cellules infectées ayant reçu l'AZT. L'AZT retarde l'apparition des effets cytopathologiques du Visna

: formation de syncytia, apoptose et nécrose secondaire associée à la lyse cellulaire, *in vitro*. Les mêmes résultats sont obtenus avec les cellules de GSMt-*lac* infectées en présence d'AZT.

Dans ce travail, on a mis en évidence que **l'AZT est capable de bloquer les nombreuses voies apoptotiques** induites par le virus Visna. Mais, il inhiberait partiellement l'apoptose Visna-induite et retarderait la perte de l'intégrité membranaire. A ce jour, les études concernant l'AZT sont focalisées sur son rôle inducteur d'apoptose vis à vis de lignées cancéreuses. A notre connaissance, deux références ont évalué l'effet de l'AZT sur l'apoptose induite par le HIV dans des systèmes *in vitro* de co-culture de cellules infectées. En 1995, Maldarelli *et al.* souhaite prouver que la réplication virale est indispensable à l'induction de l'apoptose. L'AZT est utilisé pour bloquer la nouvelle synthèse d'ADN viral. Ils ne démontrent aucun effet anti-apoptotique de l'AZT dans des co-cultures de cellules H9 traitées par 10 μM d'AZT. En revanche, une étude plus récente montre qu'un traitement par 0,1 μM d'AZT inhibe l'induction de l'apoptose d'astrocytes en co-culture avec des macrophages ; le surnageant de culture issu de macrophages infectés par le HIV est capable de provoquer l'apoptose d'astrocytes en culture (Aquaro *et al.*, 2000). Ces auteurs confirment que la production de nouvelles particules virales par les macrophages est indispensable à l'induction de l'apoptose des astrocytes. Dans notre modèle 25 μM d'AZT bloque l'apoptose Visna-induite dans des cellules de PC. Dans ces différents modèles d'infection rétrovirale et de traitement par l'AZT *in vitro*, les conditions d'infection mais aussi la concentration d'AZT utilisée diffèrent. Ces résultats comme ceux obtenus avec des lignées cancéreuses dépendent du temps de traitement, de la dose et du type cellulaire.

L'AZT est un inhibiteur nucléosidique de la reverse transcriptase virale. Il s'incorpore dans l'ADN viral au cours de la reverse transcription et agit comme un terminateur de chaîne (Wutzler & Thust, 2001). Il bloque ainsi la réplication du virus au début du cycle, en amont de l'intégration du génome viral dans l'ADN de la cellule hôte (Declercq, 2002). Nous avons démontré que l'AZT inhibe les étapes tardives de l'apoptose. Nous pouvons déduire que les étapes amont de l'étape de rétro-transcription ne seraient pas nécessaires et suffisantes au virus pour induire l'apoptose dans les cellules de PC. Par contre la rétrotranscription et les étapes en aval, telles la synthèse de l'ADN viral et l'étape d'intégration du génome viral, seraient des stades importants indispensables à l'induction de l'apoptose par le virus Visna. Les inhibiteurs de protéase en agissant en fin de cycle viral sur la protéase empêche la maturation des protéines virales. Nous avons recherché l'efficacité d'un antiprotéase du HIV, le Nelfinavir[®] et son métabolite, sur la réplication d'un rétrovirus animal et son effet sur

l'apoptose Visna-induite. Malheureusement les inhibiteurs de protéase anti-HIV n'ont aucun effet sur la réplication du virus Visna. La structure de la protéase du virus Visna doit être différente de celle du HIV. C'est le cas aussi de la protéase du FIV qui s'est avérée insensible aux antiprotéases actuellement disponibles, soulignant les limites du modèle chat pour les études thérapeutiques expérimentales (Morailon, 2003). Ces résultats soulignent une fois de plus les limites des modèles animaux pour les traitements médicamenteux mais non pour la compréhension des mécanismes moléculaires.

CONCLUSION

L'étude des voies apoptotiques activées ou réprimées lors d'une infection virale permet de mieux comprendre la contribution de l'hôte dans l'installation et l'évolution de la maladie. La connaissance des constituants cellulaires et protéines virales potentiellement impliqués dans la régulation de la mort cellulaire par apoptose est aussi essentielle pour l'élaboration de stratégies innovantes et efficaces afin de prévenir l'apparition des formes sévères de la maladie.

Ces travaux s'inscrivent dans la continuité de précédents résultats ayant démontré l'existence des phénomènes apoptotiques au cours de l'infection par le virus Visna, en culture cellulaire.

Nous avons fait évoluer les connaissances et démontré **le rôle central de la mitochondrie dans l'apoptose Visna-induite** dans les fibroblastes de plexus choroïde comme cela a été publié dans de nombreux autres systèmes cellulaires, cibles d'autres virus. Après avoir déclenché **une chute du potentiel mitochondrial transmembranaire**, le **virus Visna entraîne la libération simultanée**, par la mitochondrie, de deux molécules apoptogènes l'**AIF** et le **cytochrome c**. Suite à la perméabilisation du compartiment mitochondrial, l'**AIF** active **la voie indépendante des caspases**. Nous avons confirmé que l'apoptose Visna-induite emprunte les deux principales voies apoptotiques dépendantes des caspases, avec **l'activation de la voie intrinsèque** ou voie mitochondriale et de celle de **la voie extrinsèque** ou voie des récepteurs. **La régulation du phénomène apoptotique** pourrait impliquer **la protéine anti-apoptotique Bcl-2** dont l'expression chute très rapidement pendant l'infection virale, mais aussi **la protéine suppresseur de tumeur p53** dont la phosphorylation semble indispensable dans l'apoptose Visna-induite. **L'expression de la protéine p21** semble indépendante de l'expression de la protéine p53, puisque l'augmentation de p21 n'est pas corrélée à un arrêt du cycle cellulaire.

Nous avons utilisé un nouveau modèle cellulaire qui nous a permis de mieux explorer la stratégie d'infection du virus, *in vitro*. Nous démontrons qu'il se comporte comme le HIV c'est à dire qu'il est capable d'induire le processus apoptotique dans les cellules infectées et non infectées. Comme le HIV, le virus Visna a su développer des stratégies directes et indirectes pour détruire les cellules qu'il infecte *in vitro* ; ainsi, le processus apoptotique représenterait une étape importante dans la dissémination du virus aux cellules voisines.

Nous démontrons aussi le **rôle inhibiteur de l'AZT** sur la réplication du virus Visna d'une part et sur l'apoptose Visna-induite d'autre part. Mais, les inhibiteurs de protéase, actifs contre l'enzyme du HIV, ne sont pas efficaces sur ce rétrovirus animal.

Malgré ces nombreuses avancées, certains mécanismes demeurent obscurs et beaucoup de questions se posent encore :

- ❖ Si le virus Visna induit, *in vitro*, l'apoptose des cellules infectées et non infectées dans un modèle de cellules transformées et transfectées d'origine caprine, on peut se demander s'il en est de même dans les fibroblastes de plexus choroïde mais aussi dans les macrophages, cibles majeures du virus *in vivo*. Dans le cas du HIV, il est maintenant bien admis que des protéines virales telles que tat ou la gp120 sont libérées par les cellules infectées et sont responsables de l'apoptose des cellules non infectées. Les protéines structurales et régulatrices du virus Visna interfèrent-elles dans le processus apoptotique. Les syncytia empruntent-ils les mêmes voies apoptotiques ?
- ❖ En montrant le rôle inhibiteur de l'AZT lors de l'apoptose Visna-induite, *in vitro*, on s'est rendu compte que le pourcentage de cellules apoptotiques a diminué. Le pourcentage de cellules qui reste en apoptose pourrait correspondre soit aux cellules apoptotiques non infectées mais aussi à celles dans lesquelles le virus est déjà intégré et donc inaccessible aux antirétroviraux. Or on sait que dans le traitement du SIDA, le virus intégré dans les cellules des foyers ganglionnaires n'est jamais éliminé. C'est aussi le cas des infections herpétiques où les virus refont surface lors des phases de réactivation. Il serait aussi intéressant de savoir à quel moment précis du cycle répliatif se déclenche l'apoptose. Une molécule douée d'un pouvoir antirétroviral mais aussi anti-apoptotique améliorerait-elle la pathogénèse des infections à rétrovirus ? L'inefficacité d'un inhibiteur de la protéase virale testé comme le Nelfinavir[®] ou son métabolite M8 ne nous a pas permis d'envisager ce qui se passe à la phase terminale du cycle de réplication. En est-il de même pour les autres antiprotéases ?
- ❖ En réponse à l'infection virale, le processus apoptotique peut-être déclenché par les « agents de surveillance de l'hôte », comme les récepteurs de mort situés à la surface de la membrane cytoplasmique, la protéine kinase dépendante de l'ARN (PKR), le réticulum endoplasmique (RE) et la protéine p53. Au cours de l'apoptose Visna-induite nous avons caractérisé le rôle initiateur de la voie extrinsèque ou voie des récepteurs et l'implication de la protéine p53. Mais nous n'avons pas encore exploré le rôle du RE. Les mécanismes mis en jeu par le RE ne sont pas totalement connus ; la perte d'intégrité fonctionnelle du

RE due à la réplication virale peut activer certains signaux d'alerte. La perte de l'homéostasie calcique due à une sortie d'ions calcium dans le cytosol serait reconnue comme un signal activateur de la machinerie apoptotique. En effet, l'activation de la caspase-12, une nouvelle caspase transductrice, est liée au contrôle des flux calciques. La protéine PKR est activée par la production d'ARN bicaténaire au cours de la réplication virale et par phosphorylation. Elle permet un arrêt progressif des synthèses protéiques de l'hôte et déclenche l'apoptose via la voie de transduction médiée par Fas. L'absence de synthèse d'ARN double brin lors de la réplication du virus Visna, suppose l'absence d'implication de la PKR dans notre système à moins que cette dernière puisse être activée par phosphorylation par d'autres protéines cellulaires ou virales.

Les cellules de PC infectées par le virus Visna impliquent les mêmes médiateurs apoptotiques que tous autres types cellulaires. Mais l'origine ovine des cellules nous a quelquefois contraint à élargir nos perspectives de recherches. Notre bonne maîtrise de ce système viral, non pathogène pour l'homme, le présente comme un excellent modèle de lentivirus animal pour l'étude de la pathogénie des maladies à rétrovirus.

BIBLIOGRAPHIE

A

Abelson, M.L. & Schoborg, R.V. (2003). Characterization of the caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) rev N-terminal elements required for efficient interaction with the RRE. *Virus Research*, **92**, 23-35.

Algeciras-Schimmich, A., Shen, L., Barnahart, B.C., Murmann, A.E., Burkhardt, J.K. & Peter, M.E. (2002). Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Molecular and cellular biology*, **22**, 207-220.

Amarande-Mendes, G.P. & Green, D.R. (1999). The regulation of apoptotic cell death. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **32**, 1053-1061.

Amendola, A., Gougeon, M.L., Poccia, F., Bondurand, A., Fesus, L. & Piacentini, M. (1996). Induction of tissue transglutaminase in HIV pathogenesis : evidence for a high rate of apoptosis of CD4 T lymphocytes and accessory cells in lymphoid tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **93**, 11057.

Anderson, A.A., Harkiss, G.D. & Watt, N.J. (1994). Quantitative analysis of immunohistological changes in the synovial membrane of sheep infected with *maedi-visna* virus. *Clinical immunology and immunopathology*, **72**, 21-29.

Antonsson, B. & Martinou, J.C. (2000). The Bcl-2 protein family. *Experimental cell research*, **256**, 50-57.

Aquaro, S., Panti, S., Caroleo, M.C., Balestra, E., Cenci, A., Forbici, F., Ippolito, G., Mastino, A., Testi, R., Mollace, V., Calio, R. & Perno, C.F. (2000). Primary macrophages infected by human immunodeficiency virus trigger CD-95-mediated apoptosis of uninfected astrocytes. *Journal of leukocyte biology*, **68**, 429-435.

Arch, R.H. & Thompson, C.B. (1999). Lymphocyte survival—the struggle against death. *Annual review of cell and developmental biology*, **15**, 113-140.

Ariumi, Y., Kaida, A., Hatanaka, M. & Shimotohno, K. (2001). Functional cross-talk of HIV-1 Tat with p53 through its C-terminal domain. *Biochemistry and Biophysical research Communication*, **287**, 556-561.

Arrigo, S.J. & Chen, I.S.Y. (1991). Rev is necessary for translation but not cytoplasmic accumulation of HIV 1, vif, vpr, and env/vpu 2 RNAs. *Gene & Development*, **5**, 808-819.

Ashe, P.C. & Berry, M.D. (2003). Apoptotic signaling cascades. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. **27**, 199-214.

Audoly, G., Sauze, N., Harkiss, G.D., Vitu, C., Russo, P., Quérat, G., Suzan, M. & Vigne, R. (1992). Identification and subcellular localization of the *Q* gene product of visna virus. *Virology*, **189**, 734-739.

B

Balzarini, J., Cahard, D., Wedgwood, O., Salgado, A., Velazquez, S., Yarnold, C.J., Declercq, E., McGuigan, C. & Thormar, H. (1998). Marked inhibitory activity of masked aryloxy arminoacyl phosphoramidate derivatives of dideoxynucleoside analogues against visna virus infection. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology* **17**, 296-302.

Banda, N.K., Bernier, J., Kurahara, D.K., Kurrle, R., Haigwood, N., Sekaly, R.P. & Finkel, T.H. Cross-linking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis. *Journal of experimental medicine*, **76**, 1099-1106.

Barber, G.N. (2001). Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death and Differentiation* **8**, 113-126.

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.

Barone, M.V., Crozat, A., Tabae, A., Philipson, L. & Ron D. (1994). CHOP (GADD153) and its oncogenic variant, TLS-CHOP, have opposing effects on the induction of G1/S arrest. *Genes & development*, **8**, 453-464.

Bartz, S.R. & Emerman, M. (1999). Human immunodeficiency virus type 1 Tat induces apoptosis and increases sensitivity to apoptotic signals by up-regulating FLICE/caspase-8. *Journal of Virology*, **73**, 1956-1963.

Baya bouzar, A., Guiguen, F., Morin, T., Villet, S., Fornazero, C., Garnier, C., Gallay, K., Gounel, F., Favier, C., Durand, J., Balleydier, S., Mornex, J.F., Narayan, O. & Chebloune, Y. (2003). Specific G2 arrest of caprine cells infected with a caprine arthritis encephalitis virus expressing *vpr* and *vpx* genes from simian immunodeficiency virus. *Virology* **309**, 41-52.

Beg, A.A. & Baltimore, D. (1996). An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science*, **274**, 782-784.

Benjahad, A., Benhaddou, R., Granet, M., Kaouadji, M., Krausz, P., Piekarskis, S., Thomasson, S., Bosgiraud, C. & Delebassée, S. (1994). Synthesis and antiretroviral evaluation of 3-alkyl 2-piperazone nucleoside analogs. *Tetrahedron letters*, **35**, 9545-9548.

Benjahad, A., Granet, M., Krausz, P., Bosgiraud, C. & Delebassée, S. (1996). Synthesis of 3-alkyl 2-piperazinone nucleosides with potential antiretroviral activity. *Nucleoside & Nucleotide*, **15**, 1849-1861.

Bennett, M., Macdonald, K., Chan, S.W., Luzio, J.P., Simari, R. & Weissberg, P. (1998). Cell surface trafficking of Fas : a rapid mechanism of p53 mediated apoptosis. *Science*, **282**, 290-293.

Benveniste, O., Estaquier, J., Lelièvre J.D., Vildé, J.L., Ameisen, J.C. & Leport C. (2001). Possible mechanism of toxicity of zidovudine by induction of apoptosis of CD4+ and CD8+ T-cells in vivo. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, **20**, 896-897.

Bijur, G.N., de Sarno, P., & Jope, R.S. (2000). Glycogen synthase kinase-3b facilitates staurosporine- and heat shock-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 7583-7590.

Biola, A. & Pallardy, M. (2001). L'apoptose. *Cholé-doc*, **67**.

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.

Blacklaws, B., Bird, P. & McConnell, I. (1995). Early events in infection of lymphoid tissue by a lentivirus, maedi-visna. *Trends in Microbiology* **3**, 434-440.

Borner, C. (2003). The Bcl-2 protein family : sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular Immunology*, **39**, 615-647.

Bosgiraud, C., Nicolas, J.A. & Simeon de Buochberg, M. (1985). Les virus lents en médecine animale et humaine. *Revue médicale vétérinaire*, **136**, 609-616.

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.

Budijardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. & Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual review of cell and developmental biology* **15**, 269-290.

C

Candé, C., Cohen, I., Daugas, E., Ravagnan, L., Larochette, N., Zamzani, N. & Kroemer, G. (2002). Apoptosis-inducing factor (AIF) : a novel independent death effector released from mitochondria. *Biochimie* **84**, 215-222.

Castedo, M., Roumier, T., Blanco, J., Ferri, K.F., Barretina, J., Tintignac, L.A., Andreau, K., Perfettini, J.L., Amendola, A., Nardacci, R., Leduc, P., Ingber, D.E., Druillennec, S., Roques, B., Leibovitch, S.A., Vilella-Bach, M., Chen, J., Este, J.A., Modjtahedi, N., Piacentini, M. & Kroemer, G. (2002). Sequential involvement of cdk1, mTOR and p53 in apoptosis induced by the HIV-1 envelope. *The EMBO Journal*, **21**, 4070-4080.

Chavan, S., Kodoth, S., Pahwa, R. & Pahwa, S. (2001). The HIV protease inhibitor Indinavir inhibits cell-cycle progression in vitro in lymphocytes of HIV-infected and uninfected individuals. *Blood* **98**, 383-389.

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.

Cheevers, W.P., Snekvik, K.R., Trujillo, J.D., Kumpula-mcWhirter, N.M., PrettyOn Top, K.J. & Knowles, D.P. (2003). Prime-boost vaccination with plasmid DNA encoding caprine-arthritis encephalitis lentivirus env and viral SU suppresses challenge virus and development of arthritis. *Virology*, **306**, 116-125.

Cheung, A.K., Chen, Z., Sun, Z. & McCullough (2000). Pseudorabies virus induces apoptosis in tissue culture cells. *Archives of Virology* **145**, 2193-2200.

Chowdhury, I.H., Wang, X-F, Landau, N.R., Robb, M.L., Polonis, V.R., Birx, D.L. & Kim, J.H. (2003). HIV-1 Vpr activates cell cycle Inhibitor p21/waf1/Cip1: a potential mechanism of G2/M cell cycle arrest. *Virology* **305**, 371-377.

Clements, J.E., Zinck, M.C., Narayan, O. & Gabuzda, D.H. (1994). Lentivirus infection of macrophages. *Immunol. Ser.*, **60**, 589-600.

Corbeil, J. & Richman, D.D. (1995). Productive infection and subsequent interaction of CD4-gp120 at the cellular membrane is required for HIV-induced apoptosis of CD4⁺ T cells. *Journal of General Virology*, **76**, 681-690.

Couzinet, A., Hérincs, Z. & Hueber, A.D. (2002). Régulation de la mort cellulaire programmée : vers une conception plus dynamique. *Medecine/Sciences*, **18**, 841-852.

Crane, S.E., Buzy, J. & Clements J.E. (1991). Identification of cell membrane proteins that binds Visna virus. *Journal of Virology*, **65**, 6137-6143.

Crommentuyn, K.M., Rosing, H., Nan-Offeringa, L.G., Hillebrand, M.J., Huitema, A.D. & Beijnen, J.H. (2003). Rapid quantification of HIV protease inhibitors in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **38**, 157-66.

Cuille, J. & Chelle, P.L. (1936). La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable ? *Compte-rendu de l'Académie des Sciences*, **203**, 1552-1554.

Cutlip, R.C., Jackson, T.A. & Lehmkul, H.D. (1979). Lesions of ovine progressive pneumonia: interstitial pneumonitis and encephalitis. *American journal of veterinary research*, **40**, 1370-1374.

D

Da Silva Texeira, M.F., Lambert, V., Mselli-Lakahl, L., Chettab, A., Chebloune, Y. & Mornex J.F. (1997). immortalization of caprine fibroblasts permissive for replication of small ruminant lentiviruses. *American Journal of Veterinary Research*, **58**, 579-584.

Darnay, B.G. & Aggarwal, B.B. (1997). Early events in TNF signaling : a story of associations and dissociations. *J Leukoc Biol*, **61**, 559-566.

David, D. & Thèze, J. (2000). Infection à VIH et immunothérapie associée. *Annales de l'Institut Pasteur*. Editions scientifiques et médicales Elsevier.

Davis, J.L. & Clements, J.E. (1989). Characterization of a cDNA clone encoding the visna virus transactivating protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**, 414-418.

De clerq, E. (2002). Strategies in the design of antiviral drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* **1**, 13-25.

De Parseval, A. & Elder, J.H. (1999). Demonstration that the orf2 encodes the feline immunodeficiency virus transactivating (Tat) protein and characterization of a unique gene product with partial rev activity. *Journal of Virology*, **73**, 608-617.

Depelley, J., Granet, R., Kaouadji, M., Krausz, P., Piekarski, S., Bosgiraud, C. & Delebassée, S. (1996). New aromatic triazinic nucleosides : synthesis and antiretroviral evaluation of b-ribosylamine nucleoside analogs. *Nucleoside & Nucleotide*, **127**, 995-1008.

Devireddy, L.R. & Jones, C.J. (1999). Activation of caspases and p53 by bovine herpesvirus 1 infection results in programmed cell death and efficient virus release. *The Journal of Virology* **73**, 3778-3788.

Duval, R. (2003). Expression des différentes voies apoptotiques induites par le rétrovirus Visna. (Thèse Doct. Pharm. Limoges)

Duval, R., Bellet, V., Delebassée, S. & Bosgiraud, C. (2002b). Implication of caspases during maedi-visna virus-induced apoptosis. *Journal of general Virology* **1 83**, 3153-3161.

Duval, R., Delebassée, S., Cardot, P.J. & Bosgiraud, C. (2002a). Visna virus-induced cytopathic effect in vitro is caused by apoptosis. *Archives of Virology* **147**, 943-959.

E

Edinger, A.L., Mankowski, J.L., Doranz, B.J., Margulies, B.J., lee, B., Rucker, J., Sharron, M., Hoffman, T.L., berson, J.F., Zink, M.C., Hirsch, V.M., Clements, J.E. & Doms, R.W. (1997). CD4-independent, CCR5-dependent infection of brain capillary endothelial cells by a neurovirulent simian immunodeficiency virus strain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14742-14747.

Egberink, H. & Horzinek, M.C. (1992). Animal immunodeficiency viruses. *Veterinary Microbiology*, **33**, 311-331.

Ekert, P.G. & Vaux, D.L. (1997). Apoptosis in the immune system. *British medical bulletin.*, **53**, 591-603.

Earnshaw, W.C., Martins, L.M. & Kaufmann, S.H. (1999). Mammalian caspases : structure, activation, substrates, and functions during apoptotis. *Annual review of biochemistry*, **68**, 383-424.

Estaquier, J., Lelievre, J.D., Petit, F., Brunner, T., Moutouh-De Parseval, I., Richman, D.D., Ameisen, J.C. & Corbeil, J. (2002). Effects of antiretroviral drugs on human immunodeficiency virus type 1-induced CD4(+) T-cell death. *Journal of Virology*, **76**, 5966-5073.

Evan, G. & Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science*, **281**, 1317-1322.

Everett, H. & McFadden, G. (1999). Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends in Microbiology* **7**, 160-165.

Everett, H. & MacFadden, G. (2001). Viruses and apoptosis : meddling with mitochondria. *Virology*, **288**, 1-7.

F

Ferri, K.F., Jacotot, E., Blanco, J., Este, J.A. & Kroemer, G. (2000a). Mitochondrial control of cell death induced by HIV-1-encoded proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* **926**, 149-164.

Ferri, K.F., Jacotot, E., Blanco, J., Este, J.A., Zamzami, N., Susin, S.A., Xie, Z., Brothers, G., Reed, J.C., Penninger, J.M. & Kroemer, G. (2000b). Apoptosis control in syncytia induced by the HIV type 1-envelope glycoprotein complex : role of mitochondria. *Journal of Experimental Medicine* **192**, 1081-1092.

Ferri, K.F. & Kroemer, G. (2000c). Control of apoptotic DNA degradation. *Nature Cell Biology*, **2**, E63-E64.

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 productive cells of HIV and SIV-infected lymph nodes. *Nature medicine*, **1**, 129.

Finzer, P., Aguilar-Lemarroy, A. & Rösl, F. (2002). The role of human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 in apoptosis. *Cancer Letters*, **188**, 15-24.

Flanagan, J.G. (1999). Life on the road. *Nature*, **401**, 747-748.

G

Gäken, J.A., Tavassoli, M., Gan, S.U., Valian, S., Giddings, I., Darling, D.C., Galea-Lauri, J., Thoma, M.G., Abedi, H., Schreiber, V., Ménissier de Murcia, J., Collins, M.K.L., Shall, S. & Farzanesh, F. (1996). Efficient retroviral infection of mammalian cells is blocked by inhibition of poly(ADP-Ribose) Polymerase activity. *Journal of Virology*, **70**, 3992-4000.

Garg, A.K. & Aggarwal, B.B. (2002). Reactive oxygen intermediates in TNF signaling. *Molecular immunology*, **39**, 509-517.

Gartel, A.L. & Tyner, A.L. (2002). The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Molecular Cancer Therapeutics*, **1**, 639-649.

Gdovin, S.L. & Clements, J.E. (1992). Molecular mechanisms of visna virus Tat : identification of the targets for transcriptional activation and evidence for a 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. *Journal of General Virology* **78**, 801-805.

Genini, D., Sheeter, D., Rought, S., Zaunders, J.J., Susin, S.A., Kroemer, G., Richman, D.D., Carson, D.A., Corbeil, J. & Leoni, L.M. (2001). HIV induces lymphocyte apoptosis by a p53-initiated, mitochondrial-mediated mechanism. *FASEB Journal*, **15**, 5-6.

Georgsson, G. & Palsson, P.A (1971). The histopathology of maedi a slow, viral pneumonia of sheep. *Veterinary Pathology*, **8**, 63-80.

Ghosh, S.K., Wood, C., Boise, L.H., Mian, A.M., Deyev, V.V., Feuer, G., Toomey, N.L., Shank, N.C., Cabral, L., Barber G.N. & Harrington Jr, W.J. (2003). Potentiation of TRAIL-induced apoptosis in primary effusion lymphoma through azidothymidine-mediated inhibition of NF- κ B. *NEOPLASIA*, **101**, 2321-2327.

Goldmacher, V.S. (2002). vMIA, a viral inhibitor of apoptosis targeting mitochondria. *Biochimie*, **84**, 177-185.

Goldrath, A., Bevan, M. (1999). Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature*, **402**, 255-262.

Gougeon, M.L. (2001). Apoptose et virus : les voies de signalisation de la mort cellulaire et les stratégies virales mises en jeu pour moduler ces voies. *Virologie*, **5**, 347-360

Gougeon, M.L. (2003). Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack. *Nature Immunology* **3**, 392-404.

Gougeon, M.L., Lecoœur, H., Dulioust, A., Enouf, M.G., Crouvoiser, M., Goujard, C., Debord, T. & Montagnier. L. (1996). Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons : the increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *Journal of Immunology*, **156**, 3509.

Gougeon, M.L., Lecoœur, H. & Sasaki, Y. (1999a). Apoptosis and the CD95 system in HIV disease. Impact of HAART. *Immunology Letters.*, **66**, 97-103.

Gougeon, M.L. & Montagnier L. (1999b). Programmed cell death as a mechanism of CD4 and CD8 T cell deletion in AIDS. Molecular control and effect of of highly active anti-retroviral therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **887**, 199-212.

Green, D. & Kroemer, G. (1998). The central executioners of apoptosis : caspases or mitochondria. *Trends in Cell Biology*, **8**, 267-271.

Green, D.R. & Reed, J.C (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, **281**, 1309-1312.

Grell, M., Zimmermann, G. & Gottfried E. (1999). Induction of cell death by tumor necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40, and CD30 : a role of TNFR1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *EMBO Journal*, **18**, 3034-3043.

Gross, A., McDonnell, J.M. & Korsmeyer, S.J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*, **13**, 1899-1911.

Gupta, S. (2003). Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *International Journal of Oncology*, **22**, 15-20.

H

Hajnoczky, G., Davies, E. & Madesh, M. (2003). Calcium signaling and apoptosis. *Biochemical and Biophysical research communications*, **34**, 445-454.

Hanon, E., Meyer, G., Vanderplassen, A., Dessy-Doize ,C., Thiry, E. & Pastoret, P.P. (1998). Attachment but not penetration of bovine herpesvirus 1 is necessary to induce apoptosis in target cells. *Journal of Virology* **72**, 7638-7641.

Hardwick, J.M. (1997). Virus-induced apoptosis. *Advances in Pharmacology*, **41**, 295-336.

Harmache, A., Bouyac, M., Audoly, G., Hiéblot, C., Peveri, P., Vigne, R. & Suzan, M. (1995). The *vif* gene is essential for efficient replication of caprine arthritisencephalitis virus in goat synovial membrane cells and affects the late steps of the virus replication. *Journal of Virology*, **69**, 3247-3257.

Harrod, R., Nacsá, J., Van Lint, C., Hansen, J., Karpova, T., McNally, J. & Franchini, G. (2003). Human immunodeficiency virus type-1 tat/co-activator acetyltransferase interactions inhibit p53Lys-320 acetylation and p53-responsive transcription. *The Journal of biological chemistry*, **278**, 12310-12318.

Hashimoto, F., Oyaizu, N., Kalyanaraman, V.S. & Pahwa, S. (1997). Modulation of Bcl-2 protein by CD4 cross-linking : a possible mechanism for lymphocyte apoptosis in human immunodeficiency virus infection and for rescue of apoptosis by IL-2. *BLOOD*, **90**, 45-53.

Hay, S. & Kannourakis, G. (2002). A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *Journal of General Virology*, **83**, 1547-1564.

Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, **407**, 770-776.

Herbein, G., Mahlknecht, U., Batliwalla, F., Gregersen, P., Pappas, T., Butler, J., O'Brien, W.A. & Verdin, E. (1998). Apoptosis of CD8+ T cells is mediated by macrophages through interaction of HIV gp120 with chemokine receptor CXCR4. *Nature*, **395**, 189-194.

Hoglund, S., Ohagen, A., Lawrence, K. & Gabuzda, D. (1994). Role of vif during packing of the core of the HIV-1. *Virology*, **201**, 349-355.

Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Harris, C.C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science*, **253**, 49-53.

Hotzel, I. & Cheevers W.P. (2001). Host range of small-ruminant lentivirus cytopathic variants determined with a selectable caprine arthritis-encephalitis virus pseudotype system. *Journal of Virology*, **75**, 7384-7391.

Hullinger, G.A., Knowles, D.P., McGuire, T.C. & Cheevers, W.P. (1993). Caprine arthritis encephalitis lentivirus SU is the ligand for infection of caprine synovial membrane cells. *Virology*, **192**, 328-331.

I

Ichijo, N., Nishida, E. & Irie, K. (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signalling pathways. *Science*, **275**, 90-94.

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 mitochondrial permeability transition pore. *Journal of experimental medicine*, **191**, 33-46.

Johnson, F.B., Sinclair, D.A. & Guarente, L. (1999). Molecular biology of aging. *Cell*, **96**, 291-302.

Jolly, P.E., Huso, D.L., Sheffer, D. & Narayan, O. (1989). Modulation of lentivirus replication by antibodies: Fc portion of immunoglobulin molecule is essential for

enhancement of binding, internalization, and neutralization of visna virus in macrophages. *Journal of Virology*, **63**, 1811-1813.

K

Kang, K.H., Kim, W.H. & Choi, K.H. (1999). p21 promotes ceramide-induced apoptosis and antagonizes the antideath effect of Bcl-2 in human hepatocarcinoma cells. *Experimental Cell Research*, **253**, 403-412.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie A.R. (1972). Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* **26**, 239-257.

Kimpton, J & Emerman, M. (1992). Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene. *Journal of Virology*, **66**, 2232-2239.

Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E. Green, D.R. & Newmeyer, D.D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria : a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, **275**, 1132-1136.

Korsmeyer, S.J., wei, M.C., Saito, M. Weiler, S., Oh, K.J. & Schlesinger, P.H. (2000). Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death and Differentiation*, **12**, 1166-1173.

Koyama, A.H. & Adachi, A. (1997). Induction of apoptosis by herpes simplex virus type 1. *Journal of General Virology* **78**, 2909-2912.

Kroemer, G. & Reed, J.C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nature medicine* **6**, 513-519.

Kroemer, G., Zamzami, N. & Susin, S.A. (1998). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology Today* **18**, 44-51.

L

Larrouturou, S. (1993). Activité in vitro de substances antirétrovirales contre le virus Visna-Maedi. Evaluation de plusieurs méthodes. (Thèse Doct. Pharm. Limoges)

Leblanc, A.C. (2003). Natural cellular inhibitors of caspases. *Progress neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, **27**, 215-229.

Lechner, F., Machado, J., Bertoni, G., Seow, H.F., Dobbelaere, D.A. & Peterhans E. (1997). Caprine arthritis encephalitis virus dysregulates the expression of cytokines in macrophages. *Journal of Virology*, **71**, 7488-7497.

Lee, R.K., Cai, J.P., Deyev, V., Gill, P.S., Cabral, L., Wood, C., Agarwal, R.P., Xia, W., Boise, L.H., Podack, E. & Harrington Jr, W.J. (1999). Azidothymidine and interferon-alpha induce apoptosis in herpesvirus-associated lymphomas. *Cancer Research*, **59**, 5514-5520.

Lerondelle, C., Fleury, C. & Vialard, J. (1989). The mammary gland: target organ for infection with the caprine arthritis and encephalitis virus. *Ann Rech Vet*, **20**, 57-63.

Levine, A.J. (1997) p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell* **88**, 323-331.

Li, C.J., Friedman, D.J., Wang, C., Metelev, V. & Pardee, A.B. (1995). Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV Tat protein. *Science*, **268**, 429-431.

Li, H., Zhu, H., Xu, C. & Yuan, J. (1998). Cleavage of Bid by caspase-8 mediates mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, **94**, 491-501.

Lin, Y., Devin, A., Rodriguez, Y. & Liu, Z.G. (1999). Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes & development*, **13**, 2514-2526.

Lincet, H., Poulain, L., Remy, J.S., Deslandes, E., Duigou, F., Gauduchon, P. & Staedel, C. (2000). The p21(cip1/waf1) cyclin-dependent kinase inhibitor enhances the cytotoxic effect of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Letter*, **161**, 17-26.

Lipton, S.A. & Gendelman, H.E. (1995). Dementia associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *The New England journal of medicine*, **332**, 934-940.

Liu, X.S., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R. & Wang, X. (1996a). Induction of apoptotic program in cell-free extracts : requirement for dATP and cytochrome C. *Cell*, **86**, 147-157.

Liu, Z.G., Hsu, H., Goeddel, D.V. & Karin, M. (1996b). Dissection of TNF receptor I effector functions : JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappa-B activation prevents cell death. *Cell*, **87**, 565-576.

Locksley, R.M., Killeen, N. & Leonardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies : integrating mammalian biology. *Cell*, **104**, 487-501.

Loeffler, M., Daugas E., Susin, S.A., Zamzami, N., Métivier, D., Nieminen, A.L., Brothers, G., Penninger, J.M. & Kroemer, G. (2001). Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *The FASEB Journal* **15**, 758-767.

Lomonosova, E., Subramanian, T. & Chinnadurai (2002). Requirement of BAX for efficient Adenovirus-induced apoptosis. *Journal of virology*, **76**, 11283-11290.

Luch, A. (2002). Cell cycle control and cell division : implications for chemically induced carcinogenesis. *ChemBiochem*, **3**, 506-516.

M

McCloskey, T.W., Ott, M., Tribble, E., Khan, S.A., Teichberg, S., Paul, M.O., Pahwa, S., Verdin, E. & Chirmule N. (1997). Dual role of HIV Tat in regulation of apoptosis in T cells. *Journal of Immunology*, **158**, 1014-1019.

MacCullough, K.D., Martindale, J.L., Klotz, L.O., Aw, T.Y. & Holbrook, N.J. (2001). GADD153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl-2 and perturbing the cellular redox state. *Molecular and cellular biology*, **21**, 1249-1259.

MacFarlane, M. (2003). TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicology letters*, **139**, 89-97.

Maldarelli, F., Sato, H., Berthold, E., Orenstein, J. & Martin, M.A. (1995). Rapid induction of apoptosis by cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*, **69**, 6457-6465.

Marchenko, N.D., Zaika, A. & Moll, U.M. (2000). Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 16202-16212.

Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J.M., Susin, S.A., Vieira, H.L.L, Prevost, M.C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J.C. & Kroemer, G. (1998). Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis, *Science*, **281**, 2027-2031.

McNees, A.L. & Gooding, L.R. (2002). Adenoviral inhibitors of apoptotic cell death. *Virus Research*, **88**, 87-101.

Mediavilla, M.D. & Sanchez-Barcelo, E.J. (2000). Doses and time dependent effects of 3'-azido-3'-deoxythymidine on T47D human breast cancer cells in vitro. *Pharmacology & toxicology* **87**, 138-143.

Meier, P., Finch, A. & Evan, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature*, **407**, 796-800.

Miller, S.J., Suthiphongchai, T. Zambetti, G.P. & Ewen, M.E. (2000). P53 binds selectively to the 5' untranslated region of cdk4, an ARN element necessary and sufficient for transforming growth factor β - and p53-mediated translational inhibition of cdk4. *Molecular and cellular biology*, **20**, 8420-8431.

Mo, Y., Gan, Y., Song, S., Johnston, J., Xiao, X., Wientjes, M.G. & Au, J.L. (2003). Simultaneous targeting of telomeres and telomerase as a cancer therapeutic approach. *Cancer research*, **63**, 579-585.

Morillon, A. (2003). Infection du chat par le virus de l'immunodéficience féline. *La revue du praticien*, **53**, 471-473.

Moretti, S., Alesse, E., Marcellini, S., Di Marzio, L., Zazzeroni, F., Parroni, R., Famularo, G., Boschini, A., Cifone, M.G. & De Simone, C. (1999). Combined antiretroviral therapy reduces HIV-1 plasma load and improves CD4 counts but does not interfere with ongoing lymphocyte apoptosis. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, **21**, 645-665.

Moretti, S., Famularo, G., Marcellini, S., Boschini, A., Santini, G., Trinchieri, V., Lucci, L., Alesse, E. & De Simone, C. (2002). L-carnitine reduces lymphocyte apoptosis and oxidant stress in HIV-1 infected subjects treated with zidovudine and didanosine. *Antioxidants & Redox Signalling*, **4**, 391-403.

Mornex, J.F., Lena, P., Loire, R., Cozon G., Greenland, T., Guigen, F., Jacquier, M.F. & Cordier, G. (1994). Lentivirus-induced interstitial lung disease: pulmonary pathology in sheep naturally infected by the *visna-maedi* virus. *Veterinary Research*, **25**, 478-488.

Moyle, G. (2000). Toxicity of antiretroviral nucleoside and nucleotide analogues : is mitochondrial toxicity the only mechanism ? *Drug safety*, **23**, 467-481.

Mselli-Lakhal, L., Favier, C., leung, K., Guigen, D., Grezel, P., Miossec, P., Mornex, J.F., Narayan, O., Querat & Chebloune, Y. (2000). Lack of functional receptors is the only barrier that prevents caprine arthritis encephalitis virus from infecting human cells. *Journal of Virology*, **74**, 8343-8348.

Muthumani, K., Choo, A.Y., Hwang, D.S., Chattergoon, M.A., Dayes, N.N., Zhang, D., Lee, M.D., Duvvuri, U. & Weiner, D.B. (2003). Mechanism of HIV-1 viral

protein R-induced apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **304**, 583-592.

N

Nakagawa, T. & Yuan, J. (2000). Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *Journal of cellular biology*, **150**, 887-894.

Narayan, O. & Clements, J.E. (1989). Biology and pathogenesis of lentivirus. *Journal of General Virology*, **70**, 1617-1639.

Narayan, O. & Cork, L.C. (1985). Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia leukoencephalomyelitis and arthritis. *Reviews of infectious diseases*, **7**, 89-98.

Nicholson, D.W. & Thornberry N.A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends in biochemical sciences* **22**, 299-306.

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 *The EMBO Journal* **12**, 8679-8684.

Ohnimus, H. & Jassoy, C. (1997). Apoptotic cell death upon contact of CD4 T lymphocytes with HIV glycoprotein expressing cells is mediated by caspases but Bypasses CD95 (Fas/Apo-1) and TNF receptor-1. *Journal of Immunology*, **159**, 5246-5252.

Olsen, H., Cochrane, A.W., Dillon, P.J., Nalin, C.M. & Rosen. C.A. (1990). Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein with a structured region in env mRNA is dependent on multimeric formation mediated through a basic stretch of amino acids. *Gene & Development*, **4**, 1357-1364.

Oyadomari, S., Araki, E. & Mori, M. (2002). Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic β -cells. *Apoptosis*, **7**, 335-345.

P

Pajonk, F., Himmelsbach, J. Riess, K., Sommer A. & McBride, W.H. (2002). The human immunodeficiency virus (HIV)-1 protease inhibitor saquinavir inhibits proteasome function and causes apoptosis and radiosensitization in non-HIV-associated human cancer cells. *Cancer research*, **62**, 5230-5235.

Parone, P.A., James, D. & Martinou, J.C. (2002). Mitochondria : regulating the inevitable. *Biochimie* **84**, 105-111.

Pepin, M., Vitu, C., Russo, P., Mornex, J.F. & Peterhans E. (1998). Maedi-visna virus infection in sheep : a review. *Veterinary research* **29**, 341-367.

Petursson, G., Turelli, P., Matthiasdottir, S., Georgsson, G., Andresson, O.S., Torsteinsdottir, S., Vigne, R., Andresdottir, V., Gunnarsson, E., Agnarsdottir, G. & Quérat, G. (1998). Visna virus dUTPase is dispensable for neuropathogenicity. *Journal of Virology*, **72**, 1657-1661.

Phenix, B.N. & Badley, A.D. (2002). Influence of mitochondrial control of apoptosis on the pathogenesis, complications and treatment of HIV infection. *Biochimie* **84**. 251-254.

Phenix, B.N., Angel, J.B., Mandy, F., Kravcik, S., Parato, K., Chambers, K.A., Gallicano, K., Hawley-Foss, N., Cassol, S., Cameron, D.W. & Badley A.D. (2000). Decreased HIV-associated T cell apoptosis by HIV protease. *AIDS research and human retroviruses* **10**, 559-567.

Phenix, B.N., Cooper, C., Owen, C. & Badley, A.D. (2002). Modulation of apoptosis by HIV protease inhibitors. *Apoptosis*, **7**, 295-312.

Phenix, B.N., Lum, J.J., Nie, Z., Sanchez-Dardon, J. & Badley A.D. (2001). Antiapoptotic mechanism of HIV protease inhibitors: preventing mitochondrial transmembrane potential loss. *Blood* **98**, 1078-1085.

Piazza, C., Gilardini Montani, M.S., Moretti, S., Cundari, E. & Piccolella, E. (1997). Cutting edge : CD4+ T cells kill CD8+ T cells via Fas/Fas ligand-mediated apoptosis. *Journal of Immunology*, **158**, 1503-1506.

Plymale, D.R., 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.

Prikhod'ko, G.G., Wang, Y., Freulich, E., Prives, C. & Miller, L.K. (1999).

Baculovirus p33 binds human p53 and enhances p53-mediated apoptosis. *Journal of Virology*, **73**, 1227-1234.

Puccinini, M., Rinaudo, M.T., Chiapello, N., Ricotti, E., Baldovino, S., Mostert, M. & Tovo, P.A. (2002). The human 26S proteasome is a target of antiretroviral agents. *AIDS*, **16**, 693-700.

R

Rao, R.V., Hermel, E., Castro-Obregon, S., del Rio, G., Ellerby, L.M., Ellerby, H.M. & Bredesen, D.E. (2001). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *The journal of biological chemistry*, **276**, 33869-33874.

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 Journal*, **13**, 1711-1723.

Ravagnan, L., Roumier, T. & Kroemer G. (2002). Mitochondria, the killer Organelles and their weapons. *Journal of cellular physiology* **192**, 131-137.

Reed, L.J. & Muench H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene* **27**, 493-497.

Richards, A.D., Broadhurst, A.V., Ritchie, A.J., Dunn, B.M. & Kay, J. (1989a). Inhibition of the aspartic proteinase from HIV-2. *FEBS Letter*. **253**, 214-216.

Richards, A.D., Roberts, R., Dunn, B.M., Graves, M.C. & Kay, J. (1989b). Effective blocking of HIV-1 proteinase activity by characteristic inhibitors of aspartic proteinases. *FEBS Letter*, **247**, 113-117.

Rincheval, V., Renaud, F., Lemaire, C., Godefroy, N., Trotot, P., Boulo, V., Mignotte, B. & Vayssière, J.L. (2002). Bcl-2 can promote p53-dependent senescence versus apoptosis without affecting the G1/S transition. *Biochemical and Biophysical Communications* **298**, 282-288.

Roger, P.M., Breittmayer, J.P., Arlotto, C., Pugliese, P., Pradier, C., Bernard-Pomier, G., Dellamonica, P. & Bernard, A. (1999). Highly active anti-retroviral therapy (HAART) is associated with a lower level of CD4⁺ T cell apoptosis in HIV-infected patients. *Clinical and experimental immunology* **118**, 412-426.

Roy, S. & Nicholson, D.W. (2000). Programmed cell-death regulation: basic mechanisms and therapeutics opportunities. *Molecular Medicine Today*, **6**, 264-266.

Ryan, K.M., Phillips, C. & Vousden, K.H. (2001). Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Current Opinion in Cell Biology*, **13**, 332-337.

S

Sakaguchi, K., Sakamoto, H., Lewis, M.S., Anderson, C.W., Erickson, J.W., Appella, E. & Dong, X. (1997). Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53. *Biochemistry* **36**, 10117-10124.

Sakahira, H., Enari, M., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y. & Nagata S. (1999). Apoptotic nuclear morphological change without DNA fragmentation. *Current Biology* **9**, 543-546.

Salvatori, D., Vicenzetti, S., Maury, G., Gosselin, G., Gaubert, G. & Vita, A. (2001). Maedi-visna virus, a model for in vitro testing of potential anti-HIV drugs. *Comparative immunology, Microbiology and infectious diseases* **24**, 113-122.

Salvatori, D., Volpini, R., Vincenzetti, S., Vita, A., Costanzi, S., Lambertucci, C., Cristalli, G. & Vittori S. (2002). Adenine and Deazaadenine Nucleoside and Deoxynucleoside Analogues: Inhibition of Viral Replication of Sheep MVV (In Vitro Model for HIV) and Bovine BHV-1. *Bioorganic & medicinal chemistry* **10**, 2973-2980.

Sarubbi, E., Seneci, P.F., Angelastro, M.R., Peet, N.P., Denaro, M. & Islam, K. (1993). Peptide aldehydes as inhibitors of HIV protease. *FEBS Letter*, **319**, 253-256.

Sastry, K.J., Marin, M.C., Nehete, P.N., McConnell, K., el-Naggar, A.K. & McDonnell, T.J. (1996). Expression of human immunodeficiency virus type 1 Tat results in downregulation of Bcl-2 and induction of apoptosis in hematopoietic cells. *Oncogene*, **13**, 487-493.

Sawaya, B.E., Khalili, K., Mercer, W.E., Denisova, L. & Amini, S. (1998). Cooperative actions of HIV-1 Vpr and p53 modulate viral gene transcription. *The Journal of biological chemistry*, **273**, 20052-20057.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H. & Peter, M.E. (1998). Two CD95 (Apo-1/Fas) signaling pathways. *EMBO Journal*, **17**, 1675-1687.

Schwartz-Cornil, I., Chevalier, N., Belloc, C., Le Rhun, D., Laine, V., Berthelemy, M., Mateo, A. & Levy, D. (1997). Bovine leukemia virus-induced lymphocytosis in sheep is

associated with reduction of spontaneous B cell apoptosis. *Journal of General Virology*, **78**, 153-162.

Selliah, N. & Finkel, T.H. (2001). Biochemical mechanisms of HIV induced T cell apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, **8**, 127-136.

Sigurdsson, B., Grimsson, H. & Palsson, P.A. (1952). Maedi, a chronic progressive infection of sheep lungs. *Journal of Infectious Diseases*, **90**, 233-241.

Sigurdsson, B., Palsson, P.A. & Grimsson, H. (1957). Visna, a demyelinating transmissible disease of sheep. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, **16**, 389-403.

Simon, J.H., Fouchier, R.A., Southerling, T.E., Guerra, C.B., Grant, C.K. & Malim, M.H. (1997). The vif and gag proteins of human immunodeficiency virus type 1 colocalize in infected human T cells. *Journal of Virology*, **71**, 5259-5267.

Sloand, E.M., Maciejewski, J., Kumar, P., Kim, S., Chaudhuri, A & Young, N. (2000). Protease inhibitors stimulate hematopoiesis and decrease apoptosis and ICE expression in CD34 (+) cells. *BLOOD*, **96**, 2735-2739.

Smaili, S.S., Hsu, Y.T., Carvalho, A.C.P., Rosenstock, T.R., Sharpe, J.C. & Youle, R.J. (2003). Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. *Brazilian Journal of medical and biological research*, **36**, 183-190.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 9571-9576.

Sok, J., Wang, X.Z., Batchvarova, N., Kuroda, M., Harding, H. & Ron, D. (1999). CHOP-dependent stress-inducing expression of a novel form of carbonic anhydrase VI. *Molecular and cellular biology*, **19**, 495-504.

Somasundaram, K. & El-Deiry, W.S. (2000). Tumor suppressor p53 : regulation and function. *Frontiers in Biosciences*, **5**, 424-437.

Strange, R., Metcalfe, T., Thackray, L. & Dang, M. (2001). Apoptosis in normal and neoplasia mammary gland development. *Microscopy Research and technique.*, **52**, 171-181.

Suarez, D.L., Van der Maaten, M.J., Wood, C. & Whetstone, C.A. (1993). Isolation and characterization of new wild-type isolates of bovine lentiviruses. *Journal of Virology*, **67**, 5051-5055.

Susin, S.A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Prevost, M.C., Brothers, G., Mak, T.W., Penninger, J., Earnshaw, W.C. & Kroemer, G. (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine*, **192**, 571-580.

Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prevost, M.C., Alzari, P.M. & Kroemer, G. (1999a). Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *The journal of experimental medicine*, **189**, 381-394.

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. (1999b). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-446.

Susin, S.A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M. & Kroemer G. (1996). Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *The journal of experimental medicine* **184**, 1331-1342.

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. *rchives of Pathology & Laboratory medicine*, **124**, 240-245.

Tejera, A.M., Alonso, D.F., Gomez, D.E. & Olivero, O.A. (2001). Chronic in vitro exposure to 3'-azido-2', 3'-dideoxythymidine induces senescence and apoptosis and reduces tumorigenicity of metastatic mouse mammary tumour cells. *Breast cancer research and treatment* **65**, 93-99.

Teodoro, J.G. & Branton, P.E. (1997a). Regulation of apoptosis by viral gene products. *Journal of Virology*, **71**, 1739-1746.

Teodoro, J.G. & Branton, P.E. (1997b). Regulation of p53-dependent apoptosis, transcriptional repression, and cell transformation by phosphorylation of the 55-kilodalton E1B protein of human adenovirus type 5. *Journal of Virology*, **71**, 3620-3627.

Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**, 1456-1462.

Thormar, H., Balzarini, J., Debyser, Z., Witvrouw, M., Desmyter, J. & De clerq, E. (1995). Inhibition of visna virus replication and cytopathic effect in sheep choroid plexus cell cultures by selected anti-HIV agents. *Antiviral research* **27**, 49-57.

Thormar, H., Balzarini, J., Holy, A., Jindrich, J., Rosenberg, I., Debyser, Z., Desmyter, J. & De clerq E. (1993). Inhibition of visna virus replication by 2', 3'-dideoxynucleosides and acyclic nucleoside phosphonate analogs. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **37**, 2540-2544.

Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T. & Ichijo, H. (2001). ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Reports*, **2**, 222-228.

Toomey, N.L., Deyev, V.V., wood, C., Boise, L.H., Scott, D., Liu, L.H., Cabral, L., Podack, E.R., Barber G.N. & Harrington, W.J. (2001). Induction of TRAIL-mediated suicide program by interferon alpha in primary effusion lymphoma. *Oncogene*, **20**, 7029-7040.

Tsujimoto, Y. (2003). Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *Journal of Cellular physiology*, **195**, 158-167.

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*, **83**, 5214-5218.

Turreli, P., Petursson, G., Guiguen, F., Mornex, J.F., Vigne, R. & Quérat, G. (1996). Replication properties of dUTPase-deficient mutants of caprine and ovine lentiviruses. *Journal of Virology*, **70**, 1213-1217.

U

Uchide, N., Ohyama, K., Bessho, T., Yuan, B. & Yamakawa T. (2002). Apoptosis in cultured human fetal membrane cells infected with influenza virus. *Biological & pharmaceutical bulletin* **25**, 109-114.

Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P. & Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*, **287**, 664-666.

V

Valas, S., Perrin, G., Rolland, M. & Mamoun, R. (2003). Un test sur cellules indicatrices pour l'étude de l'infection par les lentivirus des petits ruminants. *Virologie*, **7**, numéro spécial.

Vander Heiden, M.G., Chandel, N.S., Williamson, E.K., Schumacker, P.T. & Thompson, C.B. (1997). Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell*, **91**, 627-37.

Van Gurp, M., Festjens, N., Van Loo, G., Saelens, X. & Vandenabeele, P. (2003). Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **34**, 487-497.

Vayssiere, J.L., Petit, P.X., Risler, Y. & Mignotte, B. (1994). Commitment to apoptosis is associated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in cell lines conditionally immortalized with simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 11752-1175.

Verhage, M., Maia, A.S., Plomp, J.J., Brussaard, A.B., Heeroma, J.H., Vermer, H., Toonen, R.F., Hammer, R.E., van der Berg, T.K., Missler, M., Geuze, H.J. & Südhof, T.C. (2000). Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science*, **287**, 864-869.

Villet, S., faure, C., Bouzar, B.A., Morin, T., Verdier, G., Chebloune, Y. & Legras, C. (2003). Lack of trans-activation function of Maedi Visna virus and Caprine arthritis encephalitis virus tat proteins. *Virology*, **307**, 317-327.

Vinatier, D., Orazi, G., Cosson, M & Dufour, P. (2001). Theories of endometriosis. *European journal of obstetrics, gynecology and reproductive biology*, **96**, 21-34.

Vossen, M.T.M., Westerhout, E.M., Söderberg-Nauclér, C. & Wiertz, E.J.H.J. (2002). Viral immune evasion : a masterpiece of evolution. *Immunogenetics*, **54**, 527-542.

W

Wan, W. & De petrillo, P.B. (2002). Ritonavir protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis. *Neurotoxicology*, **23**, 301-306.

Wang, X.Z., Lawson, B., Brewer, J.W., Zinszner, H., Sanjay, A., Mi, L.J., Boorstein, R., Kreibich, G., Hendershot, L.M. & Ron, D. (1996). Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Molecular and cellular biology*, **16**, 4273-4280.

Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B. & Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK : a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, **292**, 727-730.

Weichold, F.F., Bryant, J.L., Pati, S., Barabitskaya, O., Gallo, R.C. & Reitz, M.S. (1999). HIV-1 protease inhibitor ritonavir modulates susceptibility to apoptosis of uninfected cells. *Journal of human virology*, **2**, 261-269.

Widlak, P., Li, P., Wang, X. & Garrard, W.T. (2000). Cleavage preferences of the apoptotic endonuclease DFF40 (Caspase-activated Dnase or nuclease) on naked DNA and chromatin substrates. *The journal of biological chemistry* **275**, 8226-8232.

Willett, B.J., Picard, L., Hosie, M.J., Turner, J.D., adema, K. & Clapham, P.R. (1997). Shared usage of the chemokine receptor CXCR4 by the feline and human immunodeficiency viruses. *Journal of Virology*, **71**, 6407-6415.

Wutzler, P. & Thust, R. (2001). Genetic risk of antiviral nucleoside analogues – a survey. *Antiviral research* **49**, 55-74.

Y

Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T-I., Jones, D.P. & Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2 : release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, **275**, 1129-1132.

Ye, H., Candé, C., Stephanou, N.C., Jiang, S., Gurbuxani, S., Larochette, N., Dauga,s E., Garrido, C., Kroemer, G. & Wu H. (2002). DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nature structural biology* **9**, 680-684.

Yoneda, T., Imaizumi, K., Oono, K., Yui, D., Gomi, F., Katayama, T. & Tohyama, M. (2001). Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 13935-13940.

Z

Zamzami, N. & Kroemer, G. (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **2**,67-71.

Zamzami, N., Susin, S.A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M. & Kroemer, G. (1996). Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *The journal of experimental medicine* **183**, 1533-1544.

Zhang, J., Balestrieri, E., Grelli, S., Matteucci, C., Pagnini, V., D'agostini, C., Mastino, A. & Macchi B. (2001). Efficacy of 3'-azido 3' deoxythymidine (AZT) in preventing HTLV-1 transmission to human cord blood mononuclear cells. *Virus research* **78**, 67-78.

Zhang, Y., Fujita, N. & Tsuruo, T. (1999). Caspase-mediated cleavage of p21 WAF1/CIP1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene*, **18**, 1131-1138.

Zhong, D.S., Lu, X.H., Conklin, B.S., Lin, P.H., Lumsden, A.B., Yao, Q & Chen (2002). HIV protease inhibitor ritonavir induces cytotoxicity of human endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **22**, 1560-1566.

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. *The Journal of biological chemistry*, **272**, 7797-7800.

Zimmermann, K.C., Bonzon, C. & Green, D.R. (2001). The machinery of programmed cell death. *Pharmacology & Therapeutics*, **92**, 57-70.

Zinck, M.C. & Johnson, L.K. (1994). Pathology of lentivirus infections in sheep and goats. *Virus Research*, **32**, 139-154.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	4
ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION	18
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	21
1. UN MODELE DE LENTIVIRUS : LE VIRUS MAEDI-VISNA (VMV)	22
1.1. Les lentivirus dans la taxonomie des <i>Retroviridae</i>	22
1.2. Structure des particules lentivirales	23
1.3. Organisation génomique du virus Maedi-Visna (Pépin <i>et al.</i> , 1998)	23
1.4. Les protéines virales du VMV et leur rôle	25
1.4.1. Les enzymes virales	25
1.4.1.1. La réverse transcriptase	25
1.4.1.2. La dUTPase	27
1.4.1.3. L'intégrase	27
1.4.1.4. La protéase	27
1.4.2. Les protéines régulatrices	27
1.4.2.1. La protéine Tat	28
1.4.2.2. La protéine Rev	28
1.4.2.3. La protéine Vif	29
1.4.3. Les protéines virales de structure	29
1.5. Les récepteurs et cibles cellulaires du VMV	30
1.6. Le cycle lentiviral (figure 3)	32
1.7. Les pathologies associées au VMV et aux lentivirus (tableau 1)	34
1.7.1. Atteinte pulmonaire	34
1.7.2. Atteinte du système nerveux central	35
1.7.3. Atteinte des articulations	35
1.7.4. Atteinte des glandes mammaires	36
1.7.5. Atteinte du système immunitaire	36
2. L'APOPTOSE	38
2.1. Rôle physiologique	39
2.2. Apoptose et pathologies	40
2.3. Les mécanismes généraux de l'apoptose	41
2.3.1. La voie intrinsèque mitochondriale	41
2.3.1.1. Fonctions physiologiques de la mitochondrie dans la cellule	41
2.3.1.2. Rôle de la mitochondrie au cours de l'apoptose	43
2.3.2. Régulation de la voie mitochondriale par la famille de protéines Bcl-2	51
2.3.3. La voie extrinsèque des récepteurs de mort	57
2.3.3.1. Mécanisme d'activation de la voie extrinsèque	57
2.3.4. Les caspases : acteurs principaux dans l'étape d'exécution	62
2.3.4.1. Structure et nomenclature	62
2.3.4.2. Les substrats des caspases	64
2.4. La protéine suppresseur de tumeur p53 et l'apoptose	65
2.4.1. Structure de p53	65
2.4.2. Régulation de p53	66
2.4.3. Les fonctions de p53	67
2.4.3. Quelques cibles de p53	68
2.4.4. Interactions entre p21 et p53	69
2.5. Implication du réticulum endoplasmique dans l'apoptose	72
2.6. Lentivirus et apoptose	73
2.6.1. HIV et apoptose	74

2.6.1.1. Les mécanismes de régulation de l'apoptose dans les cellules infectées par le HIV : les voies directes	76
2.6.1.2. Les mécanismes de régulation de l'apoptose dans les syncytia	78
2.6.1.3. L'apoptose dans les cellules « Bystander » : les voies indirectes	80
2.6.1.4. La régulation négative de l'apoptose par les protéines virales du HIV	81
2.6.2. VMV, CAEV et apoptose	81
3. LES INHIBITEURS POTENTIELS DE L'APOPTOSE VIRO-INDUITE	84
3.1. Les antirétroviraux	84
3.1.1. Les inhibiteurs nucléosidiques de la réverse transcriptase, un exemple: l'AZT	84
3.1.1.1. INTI et VMV	89
3.1.1.2. AZT et apoptose	89
3.1.2. Les inhibiteurs de protéase (IP)	91
3.1.2.1. IP et apoptose	92
3.2. Les protéines virales inhibitrices de l'apoptose (figure 24)	94
3.2.1. Les protéines virales qui contrôlent les voies médiées par p53	94
3.2.2. Modulation de la voie mitochondriale par les protéines virales	95
3.2.3. Les protéines virales inhibitrices des caspases ou de la voie des caspases	96
3.2.4. Les protéines virales inhibitrices de la voie des récepteurs de mort	96
3.3. Les cytokines et l'apoptose (David & Théze, 2000)	99
3.4. Les inhibiteurs de synthèse des caspases	100
OBJECTIFS	101
MATERIEL ET METHODES	103
1. SOUCHE VIRALE VISNA K1514	104
1.1. Obtention d'un pool viral	104
1.2. Titrage du pool viral	104
2. CULTURES CELLULAIRES	106
2.1. Les cellules primaires ovines de Plexus choroïde (PC)	106
2.2. Les cellules caprines de GSMt- <i>lac</i>	107
2.2.1. Culture des cellules de GSMt- <i>lac</i>	107
2.2.2. Révélation de l'activité β -galactosidase dans les cellules de GSMt- <i>lac</i> infectées en présence de 5-Bromo-chloro-3-indolyl-b-D-galactoside (X-gal)	107
2.2.2.1. Principe de la coloration	107
2.3. Témoin positif d'apoptose : traitement des cellules par la staurosporine	109
3. ACTION D'ANTIRÉTROVIRAUX SUR LE VIRUS VISNA	110
3.1. Les différents antiviraux testés	110
3.2. Recherche de la cytotoxicité des antirétroviraux	111
3.2.1. Technique de coloration par le MTT	111
3.2.2. Calcul du pourcentage de cytotoxicité et du pourcentage de protection	112
4. ANALYSE DES MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES NUCLÉAIRES CARACTÉRISTIQUES DE L'APOPTOSE	113
4.1. Marquage par le DAPI	113
4.2. Analyse de la fragmentation de l'ADN génomique	113
4.3. Mise en évidence de la présence d'une population sub-G1 par cytométrie de flux	114
5. ETUDE DU POTENTIEL TRANSMEMBRANAIRE MITOCHONDRIAL ($\Delta\Psi_m$)	115
5.1. Analyse du potentiel transmembranaire mitochondrial par double marquage	115
5.2. Mode opératoire	115
5.2.1. Analyse du $\Delta\Psi_m$ par CMF	115
5.2.2. Mise en évidence du potentiel mitochondrial membranaire par simple marquage (JC-1), <i>in situ</i>	116
6. ETUDE DE L'EXPRESSION DES ARNm PAR RÉVERSE TRANSCRIPTION SUIVIE D'UNE RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (RT-PCR)	117

6.1. Extraction des ARN totaux _____	117
6.2. RT-PCR _____	118
6.2.1. La réaction de transcription inverse (RT) _____	118
6.2.2. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) _____	118
7. ANALYSE DES PROTÉINES CELLULAIRES PAR WESTERN-BLOT _____	120
7.1. Extraction des protéines _____	120
7.1.1. Extraction des protéines totales _____	120
7.1.2. Extraction des protéines mitochondriales, cytoplasmiques et nucléaires _____	120
7.1.3. Dosage protéique de l'extrait cellulaire _____	121
7.2. Western-blot _____	121
7.2.1. Préparation des échantillons _____	121
7.2.2. Electrophorèse des protéines en gel de polyacrylamide _____	122
7.2.2.1. Migration _____	122
7.2.2.2. Transfert sur membrane de nitrocellulose _____	122
7.2.3. Incubation des membranes avec l'anticorps _____	122
7.2.4. Révélation par réaction de chimiluminescence _____	123
8. EXPRESSION DES PROTÉINES CELLULAIRES PAR IMMUNOCYTOCHIMIE _____	126
9. ACTIVITÉS CASPASES _____	129
9.1. Dosage des activités caspases _____	129
9.2. Marquage <i>in situ</i> par le FITC-VAD-FMK _____	131
10. DOSAGE DE L'ACTIVITÉ LDH (LACTATE DÉSHYDROGÉNASE) _____	132
10.1. Principe _____	132
10.2. Mode opératoire _____	132
10.3. Calcul du pourcentage de cytotoxicité _____	133
RESULTATS _____	134
1. MISE EN ÉVIDENCE DE L'ECP INDUIT PAR LE VIRUS VISNA, <i>IN VITRO</i> _____	135
2. LES VOIES IMPLIQUÉES DANS L'APOPTOSE VISNA-INDUITE _____	136
2.1. Mise en évidence de l'expression de l'ARNm de gènes pro- ou anti-apoptotiques _____	136
2.2. La voie intrinsèque mitochondriale est activée au cours de l'apoptose Visna-induite _____	139
2.2.1. Mise en évidence de la chute du $\Delta\Psi_m$ _____	139
2.2.1.1. Analyse par CMF _____	139
2.2.1.2. Révélation de la chute du $\Delta\Psi_m$ par marquage <i>in situ</i> avec le fluorochrome JC-1 _____	140
2.2.2. Le choix des anticorps _____	146
2.2.3. Le virus Visna provoque la libération de l'AIF et du cytochrome c _____	147
2.2.3.1. Mise en évidence de l'expression du cyt-c _____	147
2.2.3.2. Mise en évidence du relargage de l'AIF _____	148
2.2.3.3. Expression de l'AIF et du cyt-c par immunocytochimie _____	148
2.2.4. L'infection par le virus Visna provoque une baisse de l'expression de la protéine Bcl-2 _____	153
2.2.5. p53 et p21 régulent l'apoptose Visna-induite _____	155
2.2.5.1. Expression de la protéine p53 _____	155
2.2.5.2. Etude de l'expression par western-blot d'une des cibles transcriptionnelles de p53 : la protéine p21 _____	158
2.3. Implication des caspases dans l'apoptose Visna-induite _____	159
2.4. Etude de la fragmentation de la chromatine _____	161
2.4.1. Mise en évidence du clivage de l'ADN _____	161
2.4.2. Mise en évidence d'une population sub-G1 par analyse du cycle cellulaire par CMF _____	161
3. EFFET D'ANTIRÉTROVIRAUX SUR L'APOPTOSE VISNA-INDUITE _____	164
3.1. Effet d'un INTI : l'AZT _____	164
3.1.1. Cytotoxicité et effet antiviral de l'AZT _____	164
3.1.2. Effet de l'AZT sur l'apoptose Visna-induite _____	166
3.1.2.1. Inhibition par l'AZT des modifications morphologiques nucléaires observées au cours de l'apoptose _____	166

3.1.2.2. Conservation de l'intégrité membranaire des cellules de PC infectées et traitées par l'AZT	171
3.1.2.3. L'AZT inhibe l'activation de la voie intrinsèque mitochondriale induite par le virus Visna	173
2.1.2.4. L'AZT inhibe l'activation des caspases	176
3.2. Effet des autres antirétroviraux	181
4. UTILISATION D'UN NOUVEAU MODÈLE CELLULAIRE : LES CELLULES DE GSMt-lac	183
4.1. Infection des cellules de GSMt-lac par le virus Visna	183
4.2. Mise en évidence des principales caractéristiques apoptotiques	185
4.2.1. Effet du traitement par la staurosporine	185
4.2.2. Modifications morphologiques observées au cours de l'infection par le virus Visna	185
4.2.3. Modifications de l'intégrité membranaire	185
4.2.4. Mise en évidence de l'activité caspase-3	190
4.2.6. Etude de la chute du $\Delta\Psi_m$	192
4.3. Relation entre apoptose et infection	192
4.3.1. Mise en évidence de l'activité β -galactosidase dans les cellules infectées en présence de X-gal	192
4.3.2. Détermination du pourcentage de cellules « gal+ »	193
4.3.3. Détermination du pourcentage de cellules apoptotiques	193
4.3.4. Corrélation entre apoptose et infection	193
DISCUSSION	198
CONCLUSION	216
BIBLIOGRAPHIE	219
TABLE DES MATIERES	244
LISTE DES FIGURES	248
LISTE DES TABLEAUX	251

LISTE DES FIGURES

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	21
Figure 1 : Structure du virus Visna-Maedi	24
Figure 2 : Organisation génomique du virus Visna-Maedi	26
Figure 3 : Cycle de réplication des lentivirus	33
Figure 4 : La respiration mitochondriale	42
Figure 5 : Modèle apoptotique impliquant la mitochondrie	43
Figure 6 : Mécanismes de perméabilisation des membranes mitochondriales	44
Figure 7 : Formation de l'apoptosome	47
Figure 8 : Structure schématique du précurseur de la protéine AIF (67 Kda)	49
Figure 9 : Voie apoptotique mitochondriale ou voie intrinsèque	52
Figure 10 : Classification des membres de la famille Bcl-2	54
Figure 11 : Régulation de l'apoptose par les membres de la famille Bcl-2	56
Figure 12 : Voies d'activation des TNFR	58
Figure 13 : La voie du TNF induit des signaux pro et anti-apoptotiques	60
Figure 14 : Représentation de la voie de signalisation de Fas	61
Figure 15 : Représentation schématique du mécanisme d'activation des caspases	63
Figure 16 : Structure de la protéine p53 humaine	66
Figure 17 : régulation du cycle cellulaire par p53	67
Figure 18 : Représentation schématique du cycle cellulaire	70
Figure 19: Apoptose dans les cellules infectées et les syncytia	79
Figure 20 : Formule chimique de l'AZT	86
Figure 22 : Etapes de phosphorylation intracellulaires de l'AZT	88
Figure 23 : Structure moléculaire de l'AZT comparée à la thymidine triphosphate (dTTP)	88
Figure 24 : Niveaux d'action des protéines virales inhibitrices de l'apoptose	98
MATERIEL ET METHODES	103
Figure 25 : Formule chimique des composés testés	110
RESULTATS	134
Figure 26 : Coloration des cellules de PC au MGG	135
Figure 27: Mise en évidence de l'expression des ARNm dans les cellules de PC témoins	137
Figure 28 : Mise en évidence de l'expression des ARNm dans les cellules de PC infectées par le virus Visna à 3 jours pi	138
Figure 29 : Analyse par CMF de la chute du $\Delta\Psi_m$ suite à l'infection par le virus Visna	142
Figure 30 : Marquage <i>in situ</i> des cellules de PC par le JC-1	145
Figure 31 : Expression des protéines AIF et cyt-c par western-blot à partir d'extraits protéiques totaux	150

Figure 32 : Expression des protéines AIF et cyt-c dans les différents compartiments cellulaires des PC par western-blot	150
Figure 33 : Etude de la libération du cytochrome c par immunocytochimie	151
Figure 34 : Etude de la libération de l'AIF par immunocytochimie	152
Figure 35 : Expression de la protéine Bcl-2 par western-blot	154
Figure 36 : Expression de la protéine Bcl-2 par immunocytochimie	154
Figure 37 : Expression de la protéine p53 par immunocytochimie	156
Figure 38 : Double marquage p53 phosphorylée/DAPI	157
Figure 39 : Expression de la protéine p21 par western-blot	158
Figure 40 : Les activités caspases-3, -1, -8 et -9 dans les cellules de PC	160
Figure 41: Electrophorèse de l'ADN cellulaire sur gel d'agarose	162
Figure 42 : Détection par CMF d'un pic sub-G1 dans les cellules infectées	163
Figure 43 : Mise en évidence d'un pic sub-G1 suite au traitement par la staurosporine	163
Figure 44: Pourcentage de protection et de viabilité cellulaire en présence d'AZT par la technique du MTT	165
Figure 45 : Marquage nucléaire des cellules de PC après coloration DAPI	168
Figure 46: Représentation du pourcentage d'apoptose dans les cellules de PC	169
Figure 47: Electrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN cellulaire	170
Figure 48 : Cinétique de libération de la LDH dans les cellules de PC	172
Figure 49 : Cinétique de libération secondaire de la LDH	172
Figure 50: Cytogrammes FL1 vs FL2 et analyse du potentiel mitochondrial transmembranaire ($\Delta\Psi_m$)	174
Figure 51 : Inhibition du relargage de l'AIF par l'AZT	175
Figure 52 : Activités caspases-3, -1, -8 et -9 dans les cellules infectées et/ou traitées par l'AZT	178
Figure 53 : Activités des caspases dans les cellules de PC traitées par la staurosporine et/ou l'AZT	179
Figure 54: Marquage par le FITC-VAD-FMK	180
Figure 55: Analyse du potentiel mitochondrial transmembranaire ($\Delta\Psi_m$)	182
Figure 56 : Coloration des cellules de GSMt-lac au May-Grünwald Giemsa	184
Figure 57: Marquage nucléaire par coloration DAPI dans les cellules de GSMt-lac traitées par la staurosporine	187
Figure 58 : Marquage nucléaire des cellules de GSMt-lac par le DAPI	187
Figure 59 : Cinétique de libération de la LDH dans les GSMt-lac infectées par le virus Visna	188
Figure 60 : Cinétique de libération de la LDH dans les cellules de GSMt-lac infectées avec ou sans traitement par l'AZT	189
Figure 61 : Evolution de la cinétique de libération secondaire de LDH dans les cellules de GSMt-lac infectées	189

Figure 62: Activité caspase-3 dans les cellules de GSMt-<i>lac</i> infectées par le virus Visna	191
Figure 63 : Mise en évidence de l'activité β-gal dans les cellules de GSMt-<i>lac</i> infectées	195
Figure 64 : Pourcentage de cellules « gal+ » en fonction du temps d'infection	196
Figure 65 : Pourcentage d'apoptose en fonction du temps d'infection après marquage au DAPI	196
Figure 66 : Double marquage X-gal et DAPI dans les cellules de GSMt-<i>lac</i> infectées par le virus Visna	197
Figure 67 : Evaluation de l'apoptose par rapport aux pourcentages de cellules infectées	197
<i>DISCUSSION</i>	198
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	219

LISTE DES TABLEAUX

<i>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</i>	21
Tableau 1 : Manifestations cliniques principales des infections lentivirales	37
Tableau 2 : Les cibles transcriptionnelles de p53	68
Tableau 3 : Mécanismes d'apoptose proposés dans les cellules infectées par HIV	77
Tableau 4 : Mécanismes d'apoptose proposés dans les cellules non-infectées	80
Tableau 5 : Mécanismes de suppression de l'apoptose mis en jeu dans les cellules non infectées	81
Tableau 6: Les inhibiteurs nucléosidiques de la réverse transcriptase (INTI)	85
Tableau 7: Les inhibiteurs nucléotidiques de la réverse transcriptase	85
Tableau 8: Les inhibiteurs non nucléosidiques de la réverse transcriptase (INNTI)	85
Tableau 9: Quelques nouvelles molécules en cours d'essais	86
Tableau 10: les inhibiteurs de protéase	92
<i>MATERIEL ET METHODES</i>	103
Tableau 11: Liste des amorces testées en RT-PCR	119
Tableau 12: Conditions expérimentales testées en RT-PCR	119
Tableau 13: Conditions d'utilisation des anticorps primaires en western-blot	124
Tableau 14: Conditions d'utilisation des anticorps secondaires	125
Tableau 15: Conditions d'utilisation des anticorps primaires en immunocytochimie	127
Tableau 16 : Conditions d'utilisation des anticorps secondaires en immunocytochimie	128
Tableau 17 : Les différents substrats et inhibiteurs de caspases utilisés	129
Tableau 18 : Distribution des réactifs pour le dosage des activités caspases	130
<i>RESULTATS</i>	134
Tableau 19 : Résultats obtenus par la technique de RT-PCR avec les couples d'amorces testés	136
Tableau 20 : Résultats de l'analyse des cytogrammes FL2 versus FL1	144
Tableau 21 : Résultats obtenus en immunocytochimie	146
Tableau 22 : Résultats obtenus en western-blot	146
Tableau 23 : Pourcentage de protection et de viabilité en présence d'AZT	165
Tableau 24: Analyse des cytogrammes 1, 2 et 3	174
Tableau 25: Analyse des cytogrammes 1, 2 et 3	182
Tableau 26 : Evaluation du pourcentage de cytotoxicité par dosage du relargage de la LDH dans les cellules de GSMt-lac infectées	188
<i>DISCUSSION</i>	198
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	219

RESUME :

Le lentivirus Visna responsable d'une encéphalopathie progressive démyélinisante présente de fortes homologues génomiques avec le HIV et infecte *in vitro* les fibroblastes du plexus choroïde ovin en induisant l'apoptose. Nous avons caractérisé 3 voies apoptotiques Visna-induite et démontré le rôle central de la mitochondrie lors de l'infection et de l'apoptose. Le relargage du cytochrome c et l'activation de la caspase-9 démontrent l'implication de la voie apoptotique intrinsèque. Le relargage simultané de l'AIF emprunte la voie caspase-indépendante. Par activation de la caspase-8, la voie extrinsèque est aussi une voie de transduction du signal pro-apoptotique induite par ce virus. La protéine suppresseur de tumeur p53 régule l'apoptose Visna-induite, l'implication de p21 est indépendante de la voie p53 et l'expression du facteur anti-apoptotique bcl-2 est absente. Nous montrons l'action d'un inhibiteur de la reverse transcriptase virale, l'AZT sur l'apoptose : l'AZT retarde l'ECP du virus en maintenant l'intégrité membranaire et inhibe l'apoptose par blocage des 3 voies, alors qu'un inhibiteur de protéase est inactif sur notre modèle viral. L'utilisation d'un modèle caprin, transfecté a permis de montrer que le virus Visna développe des stratégies pour détruire les cellules infectées et non infectées. L'apoptose participe activement à la dissémination du virus.

MOTS CLES : Virus Visna, apoptose, cytochrome c, AIF, caspases, rétrovirus, AZT, cellules ovines de plexus choroïde, cellules caprines de membrane synoviale.

ABSTRACT :

Visna lentivirus causes severe encephalitis and a progressive demyelinating disease in sheep. Nevertheless many biological similarities exist between VMV and HIV in gene sequence, genomic organization. *In vitro*, VMV infects sheep choroid plexus cells (SCPC) from ovine tissue explants. We showed that Visna virus induced apoptosis in SCPC via activation of 3 apoptotic pathways. We demonstrated the central role of mitochondria in VMV-induced apoptosis. Release of cytochrome c in the cytosol of infected-cells and caspase-9 activation demonstrated the role of the intrinsic pathway of apoptosis. The concomitant translocation of AIF to the nucleus of infected cells was characteristic of a caspase-independent pathway. Via caspase-8 activation, the extrinsic pathway was implicated in VMV-induced apoptosis. VMV apoptosis may be regulated by p53 tumor suppressor with a downregulation of bcl-2 and upregulation of p21 in a p53-independent way. By blocking the replication cycle of VMV at the beginning, AZT prevents apoptosis in infected cells by inhibiting the 3 pathways and maintaining plasma membrane integrity. Protease inhibitor was unable to block viral replication and apoptosis. By using goat synovial membrane transfected cells we showed that apoptosis occurs predominantly in uninfected cells and not in productively infected cells. Apoptosis permits virus dissemination.

KEYWORDS : Visna-Maedi virus, apoptosis, cytochrome c, Apoptosis Inducing Factor, caspases, retrovirus, AZT, sheep choroid plexus cells, Goat synovial membrane.