

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**Induction d'apoptose et rôle potentiel dans la prévention de
l'établissement d'une infection persistante de cellules du système nerveux
par le virus de la stomatite vésiculaire**

Par
Marc Desforges

Thèse présentée pour l'obtention
du grade de Docteur ès sciences (PhD.)
en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne : François Denis, INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe : Louis Flamand, Université Laval
Yves Langelier, Université de Montréal

Directeur de recherche : Pierre Talbot, INRS-Institut Armand-Frappier
Laurent Poliquin, Université du Québec à Montréal

Résumé

Dans l'étiologie de certaines pathologies neurodégénératives, les infections virales persistantes peuvent représenter un facteur important. Afin d'identifier les facteurs cellulaires et viraux importants pour mener à l'établissement d'une infection persistante par un virus cytopathique neuroinvasif et neurotrope, le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) nous sert de modèle. L'utilisation éventuelle possible de VSV en tant que traitement antitumoral chez l'humain ajoute à l'intérêt de bien comprendre les facteurs associés à l'établissement d'une persistance par ce virus, en particulier à l'intérieur de cellules du SNC.

Dans certaines circonstances, ce virus habituellement très cytopathique, est susceptible de produire plusieurs quasi-espèces au cours de son cycle réplicatif afin de réduire son niveau de virulence. Parmi les variants ainsi produits, certains peuvent porter des mutations qui favorisent la mise en place d'un équilibre entre les virus et les cellules infectées; les dommages aux cellules sont ainsi limités et les cultures cellulaires infectées peuvent survivre en devenant un réservoir viral. Nos résultats, obtenus à l'aide d'une panoplie de variants VSV étudiés dans un modèle en culture cellulaire, indiquent que l'apoptose est induite par plusieurs voies simultanées suite à une infection par le VSV. Les variants de sérotype Indiana portant une protéine M de type sauvage induisent un fort degré d'apoptose où les cultures cellulaires sont complètement détruite en moins de 72 heures. Toutefois, une altération du processus apoptotique survient lors de l'infection par différents mutants VSV-Indiana portant une protéine M mutante ainsi que lors de l'infection par le sérotype moins virulent New Jersey. Ces variants moins cytolytiques permettent la survie des cellules infectées, entre autres en induisant moins fortement l'apoptose, et réussissent à y établir une infection persistante.

La souche VSV-Indiana de type sauvage induit l'apoptose sur la lignée cellulaire humaine H4 provenant du SNC, en partie par l'intermédiaire de la protéine M alors que les différents mutants de M et la souche New Jersey (moins cytopathique) induisent moins efficacement ce phénomène. L'analyse de l'expression de gènes cibles associés au mécanisme apoptotique ne révèlent aucune modulation significative, suggérant entre

autre que le facteur transcriptionnel pro-apoptotique p53 n'est pas nécessaire lors de l'induction d'apoptose par le VSV. La différence d'induction de la mort cellulaire programmée est plutôt à relier à un degré variable d'activation des caspases (protéases cellulaires contrôlant l'apoptose) et de relocalisation de la protéine Bax, un facteur pro-apoptotique de la famille Bcl-2, du cytoplasme vers les mitochondries tel que nous l'avons démontré par immunobuvardage de type *Western* à partir de fractions cellulaires séparées et par microscopie confocale. De plus, il semble que la voie apoptotique principale induite suite à l'infection par VSV soit celle régulée par la mitochondrie et que l'activation de la caspase-8 représente un système d'amplification du processus global d'apoptose.

Néanmoins, la description globale du phénomène apoptotique induit lors de l'infection par le VSV n'est pas totalement complétée et d'autres facteurs viraux et cellulaires, non identifiés à ce jour, semblent impliqués. Parmi ceux-ci on retrouve le facteur transcriptionnel NF- κ B, le PTP (*permeability transition pore*), ainsi que les calpaïnes et les cathepsines, des cystéine protéases pouvant avoir un rôle en conjugaison avec les caspases lors de l'induction d'apoptose. Des résultats préliminaires de survie cellulaire lors de l'infection par nos variants en présence d'un inhibiteur de NF κ B, indiquent d'ailleurs que la voie impliquant ce facteur serait probablement intéressante à décortiquer. L'implication du PTP, des calpaïnes et des cathepsines est aussi discutée sur la base de résultats préliminaires qui suggèrent un rôle potentiel pour ces protéases dans la relocalisation de Bax vers les mitochondries; laissant présager une fonction dans l'apoptose induite par le VSV.

Avant-propos

Le présent document porte sur la problématique des infections virales persistantes au niveau du système nerveux central. Sans prétention, le modèle présenté dans cette thèse se veut une contribution modeste mais significative afin d'aider à mieux comprendre comment une infection persistante s'installe en identifiant quelques uns des facteurs viraux et cellulaires impliqués dans ce processus.

Le premier chapitre de cette thèse présente « l'États des connaissances » sur l'infection virale d'un point de vue très large. Les 2^e et 3^e chapitres ont trait au travail réalisé durant les 4 années de mon doctorat et représente le cœur de notre étude. Le 4^e et dernier chapitre s'organise autour d'une discussion plus large des principaux points présentés dans les articles des chapitres II et III, d'une présentation de résultats préliminaires et de leur discussion dans un contexte qui ouvre sur la suite du projet de caractérisation de l'apoptose induite lors de l'infection par le VSV et sur les perspectives à plus long terme. La dernière portion du chapitre 4 discute des enjeux possibles autour de l'établissement possible d'infection persistante par VSV au niveau du SNC entre autre dans le contexte bien particulier de l'utilisation de ce virus en tant que traitement antitumoral chez l'humain.

Remerciements

Il est parfois difficile de remonter en arrière et d'identifier quels événements ou quelles personnes peuvent nous avoir influencé au point où l'on décide de redevenir étudiant à temps plein. C'est le genre de décision qui ne devrait pas être prise à la légère et qui, dans mon cas en tous cas, a tout de même nécessité une réflexion en profondeur.

Ceux qui un jour tomberont par hasard sur mon mémoire de maîtrise, verront que j'avais parlé d'une drôle de mouche qui avait dû me piquer pour que je décide de revenir aux études. En fait, je me rend bien compte aujourd'hui qu'il y a plutôt eu plusieurs personnes et aucune mouche...

Parmi ces personnes, mon ami Laurent a bien sûr tenu le rôle principal pour un bon bout de temps, puis peu à peu, Pierre a tenu un rôle tout aussi primordial. Les Poliquinains et les Talbotins et certains amis, dont en particulier l'autre Pierre (celui des bibittes), auront aussi joué un rôle dans tout ça. Toutefois.....

On entend souvent dire que derrière chaque grand homme il y a une femme. Je crois que dans mon cas on pourrait rectifier en disant plutôt qu'à côté de cet homme ordinaire, il y avait et il y a encore aujourd'hui, une femme pas tout à fait ordinaire qui au cours de cette aventure assez particulière, s'est avérée d'une aide morale, d'une patience et d'un amour pas du tout ordinaire. Merci Annie...JVAKDN... Merci, même s'il ne le comprend pas pour l'instant à mon petit Poupouroutchou Antoine. Même si ses nuits parfois mouvementées m'ont enlevé quelques heures de sommeil et d'étude, ses rires au retour du labo m'auront certainement permis de mieux passer à travers la dernière année de mon doctorat.

Merci à toutes les personnes qui prendront le temps de lire cette thèse...

Marc Desforges

Table des matières

1. INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : ÉTAT DES CONNAISSANCES	3
2. Les Virus	3
3. Système immunitaire et infection virale	4
3.1 Immunité antivirale naturelle	4
3.2 Immunité antivirale spécifique	5
4.L'Interféron	6
5.Infection aiguë vs infection persistante	8
5.1 Les infections persistantes	9
5.2 Stratégies virales conduisant à la persistance	10
5.2.1 Modulation du système immunitaire par les virus; des exemples fascinants	11
5.3 Persistance virale: quelques exemples	17
5.4 Le Système Nerveux Central : un site de choix pour la persistance virale	20
5.4.1 Immunité antivirale et autoimmunité au SNC	21
5.4.2 Virus et persistance : modèles animaux de neuropathologies associées	25
5.4.2.1 Le virus de Theiler	25
5.4.2.2 Le coronavirus murin : MHV	26
5.4.2.3 Virus mutants et persistance au SNC	27
6. VSV : Le Virus de la Stomatite Vésiculaire	28
6.1 Caractéristiques et structure du VSV	31
6.2 La protéine M de VSV : beaucoup plus qu'une protéine structurale	34
6.3 VSV : Divers types d'infections possibles	37
6.3.1 VSV : mutants et persistance	39
6.3.2 Infection persistante par VSV; autres cas	42
7. Apoptose et infection virale	43
7.1 L'apoptose : un processus complexe de destruction cellulaire régulée	43
7.1.1 Perspective historique	44
7.1.2 Les caspases : des protéases particulières	45
7.1.3 Différents stress et différents organites	47
7.1.4 La mitochondrie : Un organite central dans la régulation de l'apoptose	51
7.2 Importance de l'apoptose dans l'organisme	59
7.3 Infection virale et déclenchement de l'apoptose	62
7.3.1 Infection virale du SNC et induction d'apoptose	62
7.4 Virus régulateurs d'apoptose	64

8. Virus oncolytiques : utilisation thérapeutique potentielle de vieux ennemis	68
8.1 Virus à ADN	69
8.2 Virus à ARN	70
8.3 VSV : une arme oncolytique	71
9. Conclusion	74
10. Approche générale et Objectifs	75
Avant-propos aux chapitres II et III	76
CHAPITRE II : <i>Matrix protein mutations contribute to inefficient induction of apoptosis leading to persistent infection of human neural cells by vesicular stomatitis virus.</i>	77
CHAPITRE III : <i>Vesicular stomatitis virus-induced apoptosis in human neural cells is associated with Bax translocation to the mitochondria and activation of caspase-8</i>	120
CHAPITRE IV : VSV ET APOPTOSE; UN CONTEXTE PLUS GLOBAL	162
11. Matériel et Méthodes	162
11.1 Cellules et virus	162
11.2 Viabilité cellulaire avec ou sans inhibiteur	162
11.3 Préparation d'extraits protéiques et Immunobuvardage de type <i>Western</i>	163
11.4 Immunofluorescence indirecte	164
12. Résultats/Discussion	165
12.1 Induction d'apoptose et prévention d'infection persistante par VSV	166
12.2 Induction d'apoptose liée aux récepteurs de mort	169
12.3 Induction d'apoptose : les autres facteurs possibles	170
12.4 Mort cellulaire induite par d'autres processus que l'apoptose	172
12.5 Résultats préliminaires et discussion complémentaire aux chapitres II et III	173
12.5.1 Les calpaïnes	173
12.5.2 NF-kB, Apoptose et Infection virale	178

12.5.3 Les Cathepsines et autres facteurs lysosomiaux	182
12.5.4 Potentiel membranaire mitochondrial, PTP, translocation de Bax et survie cellulaire	184
12.6 Modèle d'induction d'apoptose par VSV	187
12.7 Infection persistante possible de VSV à l'intérieur de cellules issues du SNC	190
12.7.1 Infection persistante de virus oncolytique	191
12.7.2 Infection persistante et problèmes auto-immunitaires	192
12.7.3 Mutations dans la protéine M et persistance de VSV	195
CONCLUSION	199
RÉFÉRENCES	200
ANNEXE	243

Liste des tableaux

Tableau 1. Exemples choisis de virus capables d'altérer la réponse immunitaire	12
Tableau 2. Exemples de virus altérant la réponse cellulaire liée à la production d'IFN	15
Tableau 3. Virus pouvant établir une infection persistante chez l'animal	18
Tableau 4. Virus pouvant établir une infection persistante chez l'humain	19
Tableau 5. Implication possible d'infections virales dans le développement de pathologies auto-immunitaires au système nerveux central	24
Tableau 6. Membres des deux principaux sérotypes du virus de la stomatite vésiculaire et autres <i>vesiculovirus</i> apparentés retrouvés dans la nature.	30
Tableau 7A. Virus et protéines virales impliqués dans l'induction d'apoptose	65
Tableau 7.B Virus et protéines virales impliqués dans l'inhibition d'apoptose	66

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique d'un virion du virus de la stomatite vésiculaire et organisation de son génome	31
Figure 2. Représentation schématique des principales voies apoptotiques faisant intervenir les caspases	48
Figure 3. Les différentes molécules relocalisées vers la mitochondrie durant l'apoptose	59
Figure 4. Immunobuvardage de type <i>Western</i> montrant l'activité des calpaïnes et le clivage de la protéine Bax lors de l'infection des cellules H4 par VSV-TP6 et suite à un traitement par la camptothécine	177
Figure 5. Survie cellulaire accrue suite à l'infection des cellules H4 par les variants non persistants de VSV-Indiana en présence de PDTC, un inhibiteur du facteur transcriptionnel NF- κ B.	181
Figure 6. La relocalisation de la protéine Bax vers la mitochondrie est retardée en présence de CsA (inhibiteur du PTP) favorisant une survie cellulaire accrue suite à l'infection par VSV-TP6	186
Figure 7. Modèle proposé pour l'apoptose induite lors de l'infection par VSV-Indiana type sauvage.	189

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
ARN : acide ribonucléique
ATCC : *American Type Culture Collection*
BHE : barrière hémato-encéphalique
°C : degré Celsius
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CO₂ : dioxyde de carbone
CPA : cellule présentatrice d'antigène
dNTP : déoxynucléotide triphosphate
EDTA : acide éthylènediamine-tétraacétique
HCoV : coronavirus humain
HEPES : acide N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonique
HRP : peroxydase de raifort (*horseradish peroxidase*)
HSV : virus de l'herpès simplex
HTLV-1 : virus T lymphotrope humain de type 1
IFN : interféron
IgG : immunoglobuline G
IgM : immunoglobuline M
IL : interleukine
IRF : *interferon-regulatory factor*
JHM : J. Howard Muller
kb : kilobases (10³ bases)
kDa : kilodalton (10³ dalton)
LCMV : virus de la chorioméningite lymphocytaire
M : molaire
DMEM : Dulbecco's *modified eagle medium*
MgCl₂ : chlorure de magnésium
MHV : virus de l'hépatite murine (*murine hepatitis virus*)
mL : millilitres (10⁻³ litre)
mM : millimolaire (10⁻³ molaire)

MMP : métalloprotéinase de matrice
MOI : multiplicité d'infection
MOPS : acide 3-N-[morpholino]propanesulfonique
N : normale
NaCl : chlorure de sodium
NK : *natural killer*
nm : nanomètre (10^{-9} mètre)
PBM : protéine basique de la myéline
PBS : tampon salin phosphaté (*phosphate buffered saline*)
PCR : réaction de polymérisation en chaîne (*polymerase chain reaction*)
pH : potentiel d'hydrogène
p.i. : post-infection
PMSF : fluorure de phénylméthylsulfonyle
PTP : *Permeability transition pore*
p/v : poids sur volume
PVDF : *polyvinylidene difluoride*
RCT : récepteur des cellules T
RT : transcription inverse (*reverse transcription*)
SCID : *severe combined immunodeficiency*
SDS : sulfate dodécyl de sodium
SNC : système nerveux central
SVF : sérum de veau fœtal
TBS : *Tris Buffered Saline*
TBS-T : TBS additionné de Tween-20
TMEV : virus de l'encéphalomyélite de Theiler
TNF- α : *tumor necrosis factor-alpha*
TNF-R : récepteur du *tumor necrosis factor*
Tris : tris(hydroxyméthyl)aminométhane
 μ L : microlitres (10^{-6} litre)
v/v : volume sur volume
VSV : Virus de la stomatite vésiculaire

1. Introduction

Depuis leur découverte vers le milieu du XIXe siècle, les virus n'ont cessé de surprendre quant aux différents types d'infections et aux diverses formes de pathologies auxquelles ils ont pu être associés. Les infections persistantes représentent entre autre une réalité fort complexe dont les causes et conséquences sont souvent difficiles à identifier et à comprendre.

Afin d'établir une infection persistante, plusieurs virus ont développé diverses stratégies plus ou moins raffinées. Certaines de ces stratégies font appel à la modulation de la mort cellulaire programmée (l'apoptose), qui est engendrée par la machinerie cellulaire lors d'une infection virale ou encore à la modulation de diverses composantes du système immunitaire naturel ou acquis. Dans ces cas, des gènes viraux encodent des protéines particulières qui peuvent être produites spécifiquement pour ces fonctions modulatrices lors de l'infection. Toutefois, d'autres virus, souvent parmi les plus simples et les plus cytopathiques, ne semblent pas vraiment avoir de stratégie précise inscrite dans leur génome qui leur permettrait de produire des facteurs modulateurs. En fait, il appert que ces virus doivent se fier aux lois exercées par la pression sélective pour engendrer des mutations particulièrement favorables pour mener à l'établissement d'une infection persistante. Ces virus ont souvent un cycle réplicatif très court et très performant qui leur permet de produire une quantité très appréciable de nouveaux virions dans un court laps de temps. En contrepartie, plusieurs mutations surviennent dans divers gènes et entraînent la formation de variants moins cytotoxiques qui peuvent entre autre établir une infection persistante.

Certaines infections virales persistantes peuvent mener à des conséquences variables et parfois dramatiques. Un des principaux exemples notoires fait référence au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et au SIDA. Pourtant, plusieurs autres virus peuvent établir une infection persistante et engendrer des problèmes de santé importants. Le virus de l'hépatite B, pouvant causer, dans les cas les plus graves, un hépatocarcinome et les virus HTLV-1 (*human T-lymphotropic virus*) et EBV (*Epstein-Barr virus*), pouvant être associés au développement de lymphomes ou de leucémies,

représentent également des cas où les conséquences sont parfois assez dramatiques. Parmi toutes les formes d'infections persistantes qui peuvent survenir, un sujet d'intérêt particulier est la capacité qu'auraient nombres de virus (notamment le VIH), à persister au niveau du système nerveux central (SNC).

Depuis plusieurs années, diverses études suggèrent l'implication d'infections virales persistantes dans certaines maladies neurodégénératives. Bien que plusieurs modèles d'étude existent, certains mécanismes qui influencent l'établissement et le maintien d'une infection persistante restent à identifier. Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) est un virus normalement très cytotoxique mais certains facteurs viraux et cellulaires peuvent participer à l'établissement d'une infection persistante dans laquelle le virus engendre moins de dégâts et permet à la cellule infectée de survivre. Différentes mutations au niveau de la protéine matricielle semblent pouvoir altérer la capacité du virus à induire le processus apoptotique dans certains types cellulaires issus du SNC. VSV représente donc un outil intéressant afin d'étudier les processus par lesquels certains virus neurotropes réussissent à persister au niveau des cellules du SNC et, le cas échéant, être associés au développement de certaines affections neurologiques.

De plus, des études récentes ont montré que le VSV présentait un potentiel intéressant dans la lutte contre le cancer. En effet, lorsque utilisé en combinaison avec les interférons de type 1 (un type de molécule antivirale très puissante), le VSV semble infecter et tuer de manière préférentielle les cellules tumorales sans trop affecter les cellules saines à l'intérieur d'un organisme. Chercher à comprendre quels facteurs cellulaires ou viraux peuvent contribuer à transformer une infection aiguë en infection persistante est donc d'une grande importance afin de contrer d'éventuels effets secondaires néfastes qui pourraient résulter d'un traitement anti-cancer utilisant le VSV.

CHAPITRE I : ÉTAT DES CONNAISSANCES

2. Les virus

C'est vers 1840 qu'on retrace les premières hypothèses modernes faisant état de l'existence d'une classe particulière d'agents infectieux responsables de l'étiologie de certaines affections jusqu'alors inexplicables. Toutefois, ce n'est que durant la première guerre mondiale que Félix d'Hérelle démontre la nature corpusculaire de ces dits agents; les virus (Levine, 2001a).

Les virus représentent une classe bien à part d'agents infectieux. Ne pouvant se multiplier par eux-mêmes, ils sont des parasites obligatoires des cellules vivantes alors que leur statut biologique alimente sans cesse les polémiques. Ayant, pour la plupart, une structure fort rudimentaire, ils sont tout de même capables de s'accaparer la machinerie cellulaire pour l'utiliser à leur avantage et leur permettre de compléter leur cycle répliatif afin de se propager. Quel que soit le statut biologique véritable des virus, ils représentent une classe de pathogènes fort importante. En constante relation avec l'ensemble du monde vivant, et en particulier avec les êtres humains, leur étude demeure un champ important de la biologie moderne.

Depuis des décennies, les virus ont souvent été vus comme un système simplifié d'étude pour tenter de mieux comprendre des mécanismes cellulaires complexes (Spriggs, 1996). Pourtant, il devient aujourd'hui de plus en plus clair que même les virus les plus simples ne le sont pas autant qu'on pouvait le croire, surtout lorsque le sujet d'étude porte sur la compréhension de l'interaction cellule-virus.

La constante obligation qu'ont les virus à infecter les cellules d'un hôte et l'éventail de réponses déclenchées par cet hôte pour limiter les dégâts possibles, soulignent l'importance du concept de co-évolution et l'intérêt de chercher à mieux comprendre comment s'établit la relation hôte-virus qui détermine le type d'infection. En 2001, l'organisme *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)* dénombrait 3 ordres, 69 familles, 9 sous-familles, 243 genres, et 1550 espèces de virus (Condit, 2001). Leur grande diversité donne virtuellement aux virus le pouvoir d'infecter à peu

près tous les êtres vivants en occasionnant les pathologies les plus diverses. Malgré tout, il demeure que la plupart des virus ont un spectre plus ou moins restreint d'hôtes possibles, se limitant souvent à une ou quelques espèces chez qui ils n'infectent qu'un ou quelques types cellulaires (Fields et Knipe, 1991).

3. Système immunitaire et infection virale

Lors d'une infection virale typique, le système immunitaire de l'hôte met rapidement en branle une série d'événements en réponse à l'agression. Cette réponse immunitaire antivirale se fait à plus d'un niveau et utilise plusieurs armes différentes pour contrer l'intrus tout en limitant les dégâts. Pour engendrer une réponse immunitaire efficace, plusieurs cellules doivent coopérer pour arriver à contenir et éliminer le virus. Dans tout le branle-bas de combat mis en place pour contrer une infection virale, la branche d'immunité naturelle ou innée entre en jeu en deux phases. La phase initiale survient d'abord en réponse directe à la détection d'antigènes viraux et est rapidement suivie par la phase innée proprement dite, qui est en quelque sorte une phase d'amplification. De plus, les composantes de l'immunité naturelle mettent en place les premières lignes de défense et préparent le terrain pour la mise en place de la réponse immunitaire acquise spécifique (Biron et Sen, 2001). La réponse immunitaire face à l'infection virale ne fait pas partie intégrante des objectifs reliés à notre étude et, bien que sa manipulation représente un moyen fort répandu et efficace utilisé par plusieurs virus pour réussir à établir une infection persistante chez un hôte, elle ne sera que très brièvement traitée dans le présent document.

3.1- Immunité antivirale naturelle

Pour contrer une infection, l'immunité naturelle compte d'abord sur la production de nombreuses cytokines dont les interférons de type 1. Les cellules infectées par un virus produisent habituellement ce facteur afin d'inhiber la réplication et la propagation virale et il s'agit de la cytokine dont la production est induite de façon la plus importante lors d'infections virales (Biron, 1998).

Les composantes de l'immunité naturelle jouent un rôle dans la mise en place de l'immunité acquise spécifique. En effet, les cellules dendritiques, qui représentent ni plus ni moins qu'un intermédiaire entre les immunités innée et acquise, permettent souvent le véritable déclenchement de la réponse acquise spécifique en activant les lymphocytes T « naïfs » spécifiques à un antigène viral ou autre (Kadowaki *et al.*, 2000). Elles peuvent détecter une infection directement à l'aide de récepteurs particuliers ou par l'intermédiaire de cytokines tel les interférons de type 1 provenant d'autres cellules, ce qui entraîne l'activation de la réponse acquise impliquant les lymphocytes (LeBon et Tough, 2002). Ainsi, les cellules dendritiques réussissent à traduire une information captée par les cellules de l'immunité innée en langage compréhensible pour les cellules de l'immunité acquise et spécifique.

3.2- Immunité antivirale spécifique

L'immunité dite spécifique met en cause des mécanismes fort complexes de coopération entre diverses cellules très spécialisées afin de combattre les virus et autres pathogènes de façon efficace. Comme mentionné plus avant, de nombreuses cytokines sont produites pour faire face à une infection virale. Ces molécules servent entre autre à élaborer la mise en place d'un réseau de communication intercellulaire complexe et les signaux communiqués par ces cytokines dès la mise en place de l'immunité naturelle mènent éventuellement à une réponse acquise et spécifique optimale (Bloom et Ahmed, 1998). Cette seconde branche du système immunitaire se subdivise elle-même en deux voies, l'immunité humorale, faisant surtout référence aux différentes classes d'anticorps sécrétés par les lymphocytes B activés, et l'immunité à médiation cellulaire surtout liée aux lymphocytes T cytotoxiques, les CTL (*cytotoxic T lymphocytes*), qui reconnaissent des antigènes viraux, présents en association avec une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité CMH I à la surface de cellules infectées. Comme la très grande majorité des cellules nucléées de l'organisme portent un CMH I, les CTL peuvent donc virtuellement détruire n'importe quelle cellule infectée. Les branches de l'immunité humorale et à médiation cellulaire sont complémentaires et selon le type de virus qui infecte, la branche de l'immunité spécifique efficace pourra changer. En effet, beaucoup

de virus cytopathiques, dont le virus de la forêt de Semliki (SFV), le virus de la vaccine (Vaccinia), et le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), ont un cycle répliatif très rapide et la cellule infectée est rapidement lysée en libérant de nouveaux virions. Les anticorps sont dans ce cas très efficaces pour contenir et éliminer les virus libres. Dans le cas de virus non cytopathiques, tel le LCMV (*lymphochoriomeningitis virus*), dont le cycle est plus lent, les lymphocytes T cytotoxiques peuvent agir plus efficacement et éliminer les cellules infectées. Les anticorps complètent le travail en éliminant les quelques particules virales qui peuvent s'échapper lors de la lyse cellulaire (Kagi et Hentgartner, 1996).

En bref, quel que soit le type de réponse immunitaire impliqué, les cellules qui y participent produisent et sécrètent plusieurs cytokines qui servent de médiateurs cellulaires afin de régir les communications intercellulaires ou qui peuvent avoir un rôle direct de protection. Parmi la panoplie de cytokines, les divers types d'interférons sont très importants contre l'infection virale.

4. L'Interféron

C'est à la fin des années 50 que Isaacs et Lindemann (1957) publient leurs travaux décrivant une molécule sécrétée pouvant *interférer* avec la réplication du virus Influenza. On sait aujourd'hui que diverses formes d'interférons existent, qu'elles peuvent jouer de nombreux rôles différents et qu'elles sont sécrétées par différents types cellulaires.

Parmi les diverses cytokines sécrétées par les cellules du système immunitaire en réponse à une infection virale, l'interféron γ , ou interféron immun, est une des plus importantes. Du macrophage au lymphocyte, les cellules immunitaires répondent d'une façon ou d'une autre à un stimulus induit par l'interféron γ et les principales cellules qui produisent cette cytokine sont certains lymphocytes T et dans une moindre mesure les cellules NK (Biron, 1998; Barber, 2001) et les lymphocytes T suppresseurs (Samuel, 2001). Les interférons α et β (IFN de type 1) représentent des facteurs apparentés à l'interféron γ et sont produits par d'autres cellules de l'organisme (Biron, 1998; Samuel,

2001) et la plupart des types cellulaires ont la capacité de les produire en proportion variable selon le type d'infection (Biron, 1998; Goodbourn *et al.*, 2000). La synthèse des interférons est régulée de façon complexe. Sa production constitutive est très faible, voire inexistante, dans plusieurs type de cellules et l'induction de sa synthèse est très importante lors de l'infection par à peu près tous les virus, surtout pour l'interféron β (Biron, 1998). Un des principaux effets biologiques des interférons de type 1 est donc lié à la lutte antivirale et cette fonction se manifeste de plusieurs façons pour induire un état antiviral. Le rôle protecteur de l'interféron est clairement établi pour contrer l'infection par plusieurs virus, notamment VSV (Samuel, 2001), en bloquant leur cycle répliatif et en permettant de conserver l'intégrité des cellules non infectées. Dans le cas de VSV, il semble que la présence d'IFN favorise la production de virions ayant un pouvoir infectieux très réduit (Maheshwari et Friedman, 1980) Il appert que les dites particules virales ont un déficit important en protéine matricielle (M) et en glycoprotéine (G) virales (Maheshwari *et al.*, 1980a; 1980b; 1980c) dont la glycosylation est altérée (Maheshwari *et al.*, 1980c).

Paradoxalement, bien que l'interféron protège la plupart du temps les cellules contre les effets néfastes de l'infection virale, notamment lors d'une infection par VSV, il ne permet pas l'élimination directe et complète du virus et pourrait, dans certains cas, contribuer à instaurer une infection persistante (Benedict *et al.*, 2002; Ahmed *et al.*, 1997; Joklik, 1991). Ce rôle particulier attribué à l'IFN a d'ailleurs été démontré lors de l'infection de cellules murines L par les sérotypes Indiana (Ramseur et Friedman, 1977) et New Jersey (Nishiyama, 1977) de VSV.

Les recherches des dernières années ont permis de mettre en évidence que, dans certains cas, comme lors de l'infection par le virus *Influenza* (Balachandran *et al.*, 2000a), les interférons pouvaient aussi induire une susceptibilité accrue au processus apoptotique dans les cellules infectées. Le mécanisme semble principalement survenir via la voie faisant intervenir les facteurs FADD et caspase-8 reliés à la voie extrinsèque d'apoptose (Balachandran *et al.*, 2000a; Barber, 2001). Actuellement, deux modèles existent afin d'expliquer comment l'interféron peut à la fois protéger certaines cellules contre une infection virale en permettant à ces dites cellules de conserver leur intégrité et

d'un autre côté rendre certains types cellulaires plus susceptibles à l'apoptose. Le premier modèle suggère que seules les cellules infectées par un virus peuvent induire leur processus de mort programmée. En effet, selon ce modèle, l'interféron, produit par les cellules infectées, agirait d'une part de façon autocrine en sensibilisant la cellule où se réplique un virus afin qu'elle mette en branle le processus de mort programmée. D'autre part, l'interféron pourrait aussi agir de façon paracrine, donc au niveau de cellules avoisinantes non infectées, et, dans ce second cas, prévenir la réplication virale de même que l'induction d'apoptose qui pourrait être induite par une infection virale directe (Tanaka *et al.*, 1998). Le second modèle favoriserait plutôt la mise en place d'un état antiviral dans la cellule infectée ou non et engendrerait ou bien le processus d'apoptose ou bien la survie cellulaire selon le type de virus qui infecte (Balachandran *et al.*, 2000a; Barber, 2001).

De nombreuses études, réalisées à l'aide de souris dont l'expression du récepteur des interférons de type 1 est abolie (souris *knock-out*), ont clairement démontré l'importance des IFN dans la réponse immunitaire contre une panoplie de virus de familles différentes dont le virus de la Vaccine (*Poxviridae*), le LCMV (*Arenaviridae*), VSV (*Rhabdoviridae*), et les alphavirus Sindbis et virus de la forêt de Semliki (*Togaviridae*) (Samuel, 2001). Mais l'importance de l'interféron pour contrer l'infection virale est encore plus mise en évidence lorsque l'on note le nombre de virus portant des gènes codant pour des protéines qui peuvent d'une façon ou d'une autre altérer les fonctions antivirales de cette importante famille de molécules (Samuel, 2001). L'évolution a pris le temps de façonner des molécules dont la fonction spécifique est de brouiller la réponse antivirale liée à l'IFN afin de permettre que de nombreux virus puissent échapper aux mécanismes cellulaires reliés à cette cytokine. Ceci suggère fortement que l'IFN soit au centre d'une ou de multiples voies primordiales à éviter pour échapper au système immunitaire et peut-être arriver à établir une infection persistante.

5. Infection aiguë vs infection persistante

Selon la réponse antivirale mise en branle par l'hôte et selon le degré de virulence du virus, les infections virales peuvent être de deux types. Le premier, qualifié

d'infection aiguë, implique une multiplication et une propagation rapide du virus. C'est une course entre la réplication virale et la réponse antivirale de l'hôte. Dans ce cas, un effet cytopathique important peut être observé et un certain nombre de cellules peuvent être lysées lors du cycle répliatif du virus. *In vivo*, le système immunitaire de l'hôte réussira à contre-attaquer afin d'éliminer le pathogène, à défaut de quoi des symptômes plus ou moins sévères apparaîtront et pourront même éventuellement mener à la mort. Comme préalablement mentionné, l'infection persistante existe aussi et représente une situation plus énigmatique où le virus demeure à l'intérieur de cellules infectées sans se faire détruire et sans détruire l'hôte. (Oldstone, 1996; Oldstone et de la Torre, 1996; Whitton et Oldstone, 2001) L'interaction virus-cellule est centrale dans la détermination du type d'infection qui survient. Toutefois, cette interaction demeure obscure à plus d'un niveau et plusieurs déterminants importants qui l'influencent restent à identifier.

5.1 Les infections persistantes

Certains virus ont développé des stratégies leur permettant de moduler une infection aiguë afin de s'établir dans un hôte et d'y persister. Selon le type d'infection persistante, il y aura production de virions complets de façon continue ou épisodique ou encore seul certaines composantes virales (génom viral par exemple) seront détectées à l'intérieur des cellules infectées.

L'infection dite persistante peut être de deux types *in vivo* (Ahmed et Stevens, 1991; Ahmed *et al.*, 1997). Dans le premier cas, on est face à une infection chronique où il y a continuellement production de virions pouvant être détectés. Des exemples sont le virus de l'hépatite B chez l'humain de même que le LCMV chez la souris (Ahmed et Stevens, 1991). D'un autre côté, une infection dite latente, où le génome viral peut demeurer sous différents états, dépendant du type de virus, et où la production de particules virales n'est qu'occasionnelle, peut aussi survenir. S'ajoutent aussi à cette classification, les infections à lentivirus comme le VIH (un rétrovirus), qui sont en fait un cas spécial d'infection latente qualifiée de lente, où le virus intègre carrément son génome dans celui de son hôte (Borzakian, 1993).

De plus, il a été démontré qu'*in vitro*, l'infection chronique peut se subdiviser encore en deux formes. La première, l'infection stable, (mieux connue sous le nom de *steady state*), est celle où à peu près toutes les cellules d'une population sont infectées par un virus non lytique. La seconde façon d'installer la persistance virale chronique dans une population cellulaire *in vitro*, est appelée état porteur (*carrier state*). Ici, seulement quelques cellules sont infectées puis lysées à chaque cycle viral. Il se crée un équilibre entre la multiplication des cellules résistantes au virus et la lyse de celles qui sont infectées et l'infection persistante survient. (Borzakian, 1993)

5.2 Stratégies virales conduisant à la persistance

Bien que beaucoup de mécanismes restent à élucider autour de la mise en place et du maintien d'une infection persistante, certains faits notoires sont tout de même connus.

Selon Oldstone (1991), le portrait histopathologique d'une infection persistante est habituellement différent de celui observé en infection aiguë. L'infiltration de lymphocytes et la destruction des cellules infectées qui est associée à l'infection de type aiguë, est souvent absente ou très peu présente lors d'une infection persistante. De plus, plusieurs antigènes viraux habituellement retrouvés à la surface des cellules infectées (en particulier des glycoprotéines) le sont peu ou même pas en contexte de persistance. Cette situation fait en sorte que la lyse nécessitant les anticorps devient fort peu efficace et réduit la capacité de l'immunité à médiation cellulaire à reconnaître et tuer les cellules infectées (Oldstone, 1991).

Comme mentionné plus avant, pour pouvoir persister, l'effet cytolitique d'un virus doit également être limité. Une des façons semble être l'infection de cellules semi-permissives dans lesquelles l'expression de certains gènes viraux est restreinte (Tyler et Nathanson, 2001). Les cas des virus HSV dans les neurones, EBV dans les lymphocytes B et du papillomavirus dans les cellules basales de la peau sont des exemples bien documentés (Ahmed *et al.*, 1997)

Pour établir une persistance, les virus doivent également tenter de déjouer le système immunitaire et ainsi lui échapper. De nombreuses stratégies sont apparues au cours de l'évolution. Une façon fort répandue, qu'ont développé plusieurs virus pour

arriver à cette fin, est la production de protéines immunomodulatrices (Spriggs, 1996). Ces virokines sont de diverses natures. Plusieurs sont en fait des analogues de cytokines immunitaires inhibitrices qui empêchent certains types cellulaires de bien jouer leurs rôles dans la réponse antivirale. D'autres agissent plutôt de façon intracellulaire, en empêchant entre autre la cellule infectée de pouvoir présenter les antigènes viraux et/ou les molécules CMH à sa surface ou encore en stoppant l'induction de l'apoptose. (Spriggs, 1996; Oldstone and de la Torre, 1996).

5.2.1 Modulation du système immunitaire par les virus; des exemples fascinants

Selon Ahmed et collaborateurs, il existe au moins sept différentes stratégies ayant été élaborées par les différents virus au cours de leur co-évolution avec leur hôte afin d'établir et de maintenir une infection persistante. Nommément, ces stratégies sont (1) l'expression restreinte de certains gènes viraux, (2) l'infection de site à surveillance immunitaire réduite, (3) la variation antigénique, (4) l'inhibition d'expression de molécule de surface essentielle pour la reconnaissance immunitaire, (5) l'interférence dans la présentation d'antigène, (6) la production de molécules interférant avec la fonction de cytokines immunitaires et (7) l'induction de la tolérance immunitaire face à un virus spécifique (Ahmed *et al.*, 1997). Selon une certaine école de pensée, l'inhibition de l'apoptose devrait aussi être considérée comme faisant partie des stratégies de modulation des défenses de l'hôte contre les virus (Barber, 2001). Dans les pages qui suivent, plusieurs exemples de modulation du système immunitaire par une panoplie de virus différents sont résumés sous forme de tableaux. L'importance de déjouer les défenses de l'hôte afin d'avoir une chance d'établir une infection virale persistante, est mise en évidence de façon frappante lorsqu'on voit le nombre de virus ayant élaboré autant de moyens pour arriver à se faire « oublier un peu ».

Tableau 1. Exemples choisis de virus capables d'altérer la réponse immunitaire

Altération de la présentation antigénique

VIRUS	PROTÉINES	FONCTION	RÉFÉRENCE
HSV	ICP47 (IE-12)	retient CMH I au réticulum endoplasmique en s'associant à TAP	Hill <i>et al.</i> , 1995 Fruh <i>et al.</i> , 1995 Tomazin <i>et al.</i> , 1996
EBV	EBNA-1	altère dégradation de peptides au protéasome	Levitskaya <i>et al.</i> , 1995; 1997
VZV	ORF66	accumulation de CMH I au Golgi	Abendroth <i>et al.</i> , 2001
HCMV	US2	redirection de CMH I vers le protéasome	Mocarski, 2002
	US3	empêche le passage des CMH I du réticulum vers le Golgi	Mocarski, 2002
	US6	empêche le chargement des CMH I avec peptide en liant TAP dans réticulum	Mocarski, 2002
	US11	redirection de CMH I vers le protéasome	Mocarski, 2002
HHV-8	K3 et K5	augmente l'endocytose des CMH I	Ishido <i>et al.</i> , 2000
HHV-7	U21	redirige CMH I pour dégradation endocytique	Gewurz <i>et al.</i> , 2001
Adénovirus B, C, D, E	E3-19K	retient CMH I au réticulum endoplasmique	Blair et Hall, 1998
Adénovirus I2 (sous-genre A)	E1A	inhibe d'expression de l'ARN de la chaîne lourde de CMH I	Blair et Hall, 1998
Virus Myxoma	MV-LAP	augmente endocytose de CMH I	Guérin <i>et al.</i> , 2002
VIH	Nef	augmente endocytose et relocalisation de CMH I vers réseau trans-golgien	Schwartz <i>et al.</i> , 1996
	Vpu	induit dégradation de CMH I	Kerkau <i>et al.</i> , 1997
HTLV-I	p12	se lie à la chaîne lourde du CMH I et la redirige pour dégradation au protéasome	Johnson <i>et al.</i> , 2001

Tableau 1 (suite). Exemples choisis de virus capables d'altérer la réponse immunitaire

Production d'homologues de cytokines, chimiokines et récepteurs immunomodulateurs

VIRUS	PROTÉINES	FONCTION	RÉFÉRENCE
HHV-6	U12	homologue de récepteur à β -chimiokines (RANTES, MIP et MCP-1)	Isegawa <i>et al.</i> , 1998
	U51	altère recrutement de lymphocytes T en liant RANTES et en inhibant son expression	Milne <i>et al.</i> , 2000
HCMV	US28	homologue de récepteur à β -chimiokines (RANTES, MIP et MCP-1) et à fractalkine	Bodaghi <i>et al.</i> , 1998 Kledal <i>et al.</i> , 1998
	cmvIL-10	homologue de l'IL-10 inhibe prolifération de PBMC	Spencer <i>et al.</i> , 2002
HHV-8	vMIP-I	homologue de chimiokine se liant au récepteur CCR8	Endres <i>et al.</i> , 1999
	vMIP-II	idem que vMIP I	Sozzani <i>et al.</i> , 1998
	vMIP-III	homologue de chimiokine se liant au récepteur CCR4	Stine <i>et al.</i> , 2000
EBV	BCRF1	homologue de l'IL-10 altère la production d'IFN γ	Moore <i>et al.</i> , 1990
Vaccinia	VCP	inhibe le complément en s'associant aux sous-unités C3 et C4 du complément	Howard <i>et al.</i> , 1998
	B29R (C23L)	protéine soluble se liant à chimiokines	Alcami <i>et al.</i> , 1998
	vIL-18BP	homologue soluble du récepteur pour l'IL-18	Smith <i>et al.</i> , 2000
	A53R	homologue du récepteur TNF	Alcami <i>et al.</i> , 1998
Cowpox	vIL-18BP	homologue soluble du récepteur pour l'IL-18	Smith <i>et al.</i> , 2000
	CrnE	homologue récepteur TNF	Saraiva et Alcami, 2001
Myxoma virus	M-T7	homologue récepteur IFN γ et protéine soluble se liant à chimiokine	Upton <i>et al.</i> , 1992 Lalani <i>et al.</i> , 1997
	M-T1	protéine soluble se liant à chimiokines et module la migration de leucocytes	Graham <i>et al.</i> , 1997
	M-T2	homologue du récepteur à TNF	Xu <i>et al.</i> , 2000

Tel qu'il en a été fait mention à la section 4.0, les interférons ont un rôle primordial dans la défense antivirale en général et lors d'une infection par le VSV en particulier (Samuel, 2001). Le Tableau 2 qui suit, entre autre inspiré de Garcia-Sastre (2002), illustre des exemples de virus ayant élaboré des stratégies pour contrer la production d'IFN ou la machinerie y étant associée, en particulier les mécanismes associés à PKR, à l'intérieur même des cellules. Sachant que PKR peut jouer un rôle important dans la prévention d'infection virale persistante (Yeung *et al.*, 1999), la modulation à la baisse de cette kinase lors d'infections virales souligne l'importance d'une production adéquate d'IFN dans la réponse antivirale.

Tableau 2. Exemples de virus altérant la réponse cellulaire liée à la production d'IFN

VIRUS	PROTÉINES	FONCTION	RÉFÉRENCE
Vaccinia	E3L	lie l'ARN bicaténaire et inhibe la PKR	Chang <i>et al.</i> , 1992
		inhibe la OAS	Rivas <i>et al.</i> , 1998
	K3L	homologue de eIF2 α inhibe la PKR	Davies <i>et al.</i> , 1993
	B18R	homologue soluble du récepteur à l'IFN type I	Symons <i>et al.</i> , 1995 Alcami <i>et al.</i> , 2000
	B8R	homologue soluble du récepteur à l'IFN γ	Alcami <i>et al.</i> , 1995 Mossman <i>et al.</i> , 1995
Influenza	NS1	lie l'ARN bicaténaire et inhibe la PKR	Lu <i>et al.</i> , 1995
		inhibe l'auto-phosphorylation de PKR	Bergmann <i>et al.</i> , 2000
VIH-1	Complexe Tat et ARN TAR	PKR lie TAR puis Tat lie ce complexe et inactive la capacité kinase de PKR et/ou Tat se lie à et inhibe directement PKR	Cai <i>et al.</i> , 2000
HCV	NS5A	Inhibe l'homodimérisation de PKR et son activation	Gale <i>et al.</i> , 1998
	E2	Inhibe l'activation de PKR	Taylor <i>et al.</i> , 1999
HBV	Core antigen	Inhibe la production d'IFN β	Whitten <i>et al.</i> , 1991
HPV	E6	Se lie au facteur de transcription IRF-3 et réprime la production d'IFN I	Ronco <i>et al.</i> , 1998
		S'associe à la tyrosine kinase Tyk2 et inhibe la voie de réponse liée à l'IFN I	Li <i>et al.</i> , 1999
	E7	S'associe au facteur de transcription IRF-1 et réprime la production d'IFN β	Park <i>et al.</i> , 2000
HSV	ICP34.5	Recrute la phosphatase cellulaire I α pour déphosphoryler eIF2 α agissant donc en aval de PKR	He <i>et al.</i> , 1997
Adénovirus	E1A	Interagit avec le facteur de transcription Stat 1 et bloque la production d'IFN γ	Look <i>et al.</i> , 1998
	VAI RNA (Virus associated type I RNA)	S'associe avec et inhibe PKR	Ghadge <i>et al.</i> , 1994

La majorité des virus présentés dans les tableaux précédents sont des virus à ADN contenant souvent plus d'une centaine de gènes, voire même jusqu'à environ 200 pour certains Poxvirus. Parmi tous ces gènes, ce type de virus possède, on l'a vu à l'aide des multiples exemples cités, plusieurs gènes encodant des protéines permettant d'élaborer, comme le disent si bien Lucas et collaborateurs, des stratégies de camouflage et de sabotage pour déjouer le système immunitaire pour faciliter l'établissement d'une persistance (Lucas *et al.*, 2001). Cependant, même si certains virus à ARN possèdent des facteurs leur permettant de moduler le système immunitaire, la majorité des virus à ARN ont très peu d'espace dans leur génome et ne portent pas de gènes encodant des protéines immunomodulatrices efficaces. Pourtant, même parmi les plus petits virus à ARN qui ne possèdent pas autant de «technologie» que les virus à ADN, plusieurs réussissent à établir une persistance. Contrairement aux virus à ADN, qui possèdent des mécanismes de contrôle de la réplication, le génome des virus à ARN subit beaucoup plus de mutations dans le temps, ce qui, jusqu'à un certain point, leur permet d'évoluer dans leur hôte et dans bien des cas, de parvenir à y persister. Les principales stratégies de ces virus sont souvent basées sur la rapidité de réplication et d'adaptation au changement occasionné par la pression sélective du milieu (Lucas *et al.*, 2001). Ces mutants peuvent représenter des populations de quasi-espèces qui sont en fait des variants potentiellement très utiles pour un type viral donné. En effet, parmi les formes les plus utiles de variants associés aux quasi-espèces, on retrouve entre autre la capacité réduite à induire la production d'IFN ainsi que la capacité à échapper aux anticorps ou aux lymphocytes T; toutes des caractéristiques pouvant aider à la mise en place d'une persistance virale en déjouant le système immunitaire. La caractérisation de la dynamique de maintien des quasi-espèces compte aujourd'hui sur le concept révolutionnaire de mémoire moléculaire évolutive, retrouvée chez une minorité des mutants potentiels dans une population (Ruiz-Jarabo *et al.*, 2000). En bref, il appert que, un peu à l'instar de la mémoire immunitaire, l'existence de cette mémoire moléculaire permet à une quasi-espèce donnée de réagir très rapidement à une pression sélective à laquelle la population virale a déjà été exposée (Domingo, 2000). Le virus LCMV représente un exemple particulièrement efficace d'adaptation. En effet, ce virus réussit à échapper à l'immunité

humorale en modifiant continuellement sa protéine d'enveloppe au niveau d'épitopes habituellement visés par les anticorps neutralisants (Ciurea *et al.*, 2001). De plus, la très vaste majorité des virus, qu'ils soient à ADN ou à ARN, visent, à l'intérieur d'un organisme, des sites où les défenses de l'hôte, en particulier celles attribuables aux cellules immunitaires comme telles, sont moins efficaces.

5.3 Persistance virale: quelques exemples

Le Tableau 3, est adapté de Ahmed et collaborateurs (Ahmed *et al.*, 1997) et présente des exemples de virus pouvant établir une infection persistante chez l'animal.

Tableau 3. Virus pouvant établir une infection persistante chez l'animal

VIRUS	ANIMAL HÔTE	PATHOLOGIE(S) ASSOCIÉE(S)
<i>ADN</i>		
Parvovirus félin	chat	ataxie cérébrale, panleucopénie
Herpès B	singe	encéphalite
Cytomégalovirus	souris	maladie d'inclusion du cytomégalovirus
virus du polyome	souris	tumeurs multiples
SV40	singe	Leucoencéphalopathie multifocale progressive chez sujet immunosupprimé
hépatite du canard	canard	hépatite, hépatocarcinome
hépatite de la marmotte	marmotte	hépatite, hépatocarcinome
<i>ARN</i>		
Virus de Theiler (TMEV)	souris	démyélinisation au SNC
Coronavirus murin (MHV)	souris	démyélinisation au SNC
Virus du Distemper canin	chien	démyélinisation au SNC
Virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV)	souris	glomérulonéphrite chronique
Virus Visna	mouton	pneumonie, démyélinisation au SNC
Virus de l'encéphalite et de l'arthrite caprin	chèvre	Arthrite chronique, encéphalomyélite
Virus de l'anémie infectieuse équine	cheval	Anémie hémolytique récurrente
Virus de la leucose aviaire	poulet	Leucémie
Virus du sarcome aviaire	poulet	sarcome
Virus de la leucémie murine	souris	Leucémie

Certains virus humains semblent également être impliqués dans l'établissement de maladies dont l'étiologie serait, au moins en partie, reliée à une infection virale persistante. Le Tableau 4 qui suit est également adapté de Ahmed et collaborateurs (Ahmed *et al.*, 1997) et présente une liste d'exemples bien documentés de virus pouvant établir une infection persistante chez l'humain et étant associés au développement de pathologie particulière.

Tableau 4. Virus pouvant établir une infection persistante chez l'humain

VIRUS	SITE DE PERSISTANCE	PATHOLOGIE(S) ASSOCIÉE(S)
<i>ADN</i>		
Adénovirus	glandes adénoïdes, amygdales, lymphocytes	possibilité de leucémie lymphoblastique aiguë
Cytomégalovirus	reins, glandes salivaires, lymphocytes, macrophages	pneumonie, rétinite
Virus Epstein-Barr	cellules épithéliales du pharynx, lymphocytes B	mononucléose infectieuse, lymphome de Burkitt, carcinome nasopharyngien, lymphome non-Hodgkinien
HSV-1 et 2	neurones dans ganglions sensitifs	feu sauvage, herpès génital, encéphalite, kératite
HHV-6	monocytes/macrophages	roséole
HHV-8	cellules endothéliales/ lymphocytes B	sarcome de Kaposi, lymphome
Varicella zoster	neurones dans ganglions sensitifs	varicelle, zona
Hépatite B	hépatocytes, lymphocytes, macrophages	hépatite, hépatocarcinome
Hépatite D	hépatocytes	exacerbation de l'Hépatite B
Papillomavirus	cellules épithéliales de la peau	papillome, carcinome
Parvovirus B19	progéniteur érythroïde dans la moelle osseuse	Anémie hémolytique, déficience chronique de la moelle osseuse
Polyomavirus BK	rein	cystite hémorragique
Polyomavirus JC	rein, oligodendrocytes du SNC	Leucoencéphalopathie multifocale progressive

Tableau 4 (suite). Virus pouvant établir une infection persistante chez l'humain

VIRUS	SITE DE PERSISTANCE	PATHOLOGIE(S) ASSOCIÉE(S)
<i>ARN</i>		
Hépatite C	hépatocytes, lymphocytes, macrophages	hépatite, hépatocarcinome
Rougeole	neurones et cellules gliales (SNC)	Panencéphalite subaiguë sclérosante (PESS)
Rubéole	SNC	Panencéphalite progressive du virus de la rubéole
Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)	lymphocytes T CD4, monocytes/macrophages, microglies	SIDA
Virus T-lymphotrope humain de type 1 (HTLV-1)	lymphocytes T	leucémie lymphoïde T, paraparésie spastique tropicale
Virus T-lymphotrope humain de type 2 (HTLV-2)	lymphocytes T	aucune connue
HCoV	SNC	aucune confirmée à ce jour

5.4 Le Système Nerveux Central : un site de choix pour la persistance virale

Le SNC représente un site de choix où plusieurs virus peuvent s'établir pour persister et l'implication potentielle de virus est suggérée dans un nombre grandissant de neuropathologies apparemment liées à une infection persistante. En effet, la présence de divers virus demeurant dans un état de persistance à l'intérieur de certains types cellulaires semble être impliquée dans certaines maladies neurodégénératives.

Le HCoV (*human coronavirus*) représente un des virus fort intéressant à étudier dans le contexte de la persistance au SNC chez l'humain. En effet, bien qu'aucune pathologie n'ait à ce jour été associée hors de tout doute à la persistance du HCoV au niveau du SNC, plusieurs faits reliés à son neurotropisme (Bonavia *et al.*, 1997; Arbour *et al.*, 1999a; 1999b) et à son pouvoir neuroinvasif (Arbour *et al.*, 2000) rendent très intéressante l'étude de ce virus. Qui plus est, la capacité d'établir une infection

persistante à l'intérieur des lignées cellulaires humaines issues du SNC a aussi été mise en évidence (Arbour *et al.*, 1999a; 1999b). L'activation de lignées de cellules gliales en culture a également été mise en évidence suite à l'infection par la souche HCoV-OC43 (Edwards *et al.*, 2000). Bien qu'il convienne d'être prudent sur les conclusions à tirer de toutes ces études, il appert que l'infection de cellules représentatives du SNC par le coronavirus humain peut survenir et que chez certains types cellulaires, l'infection mène à la production de molécules pro-inflammatoires ayant déjà été associées à certaines pathologies neurodégénératives.

De plus, au moins deux virus humains, cités dans le Tableau 4, sont clairement associés à des pathologies neurologiques démyélinisantes. Le virus de la rougeole peut établir une infection persistante au niveau du SNC et, dans de rares cas, induire la panencéphalite subaiguë sclérosante (PESS ou SSPE en anglais), une encéphalite progressive à développement lent qui survient entre 5 et 10 ans après que les symptômes caractéristiques de la rougeole aient disparus. Des inclusions intranucléaires et cytoplasmiques caractéristiques sont observables à l'intérieur d'oligodendrocytes et de certains types de neurones. La pathologie est invariablement fatale et s'accompagne de zones de démyélinisation plus ou moins importantes au niveau de la matière blanche du cerveau. On observe aussi une importante astrogliose ainsi qu'une infiltration chronique de lymphocytes et de plasmocytes. (Stohlman et Hinton, 2001). La leucoencéphalopathie multifocale progressive est associée au polyomavirus JC, et comme la PESS, est une maladie démyélinisante progressive et fatale. Les cellules infectées par le virus sont les oligodendrocytes et les astrocytes et, contrairement à la PESS, il n'y a pas de réponse inflammatoire chronique associée. Même si la pathologie touche le SNC, il appert qu'avant le déclenchement des premiers symptômes, le virus établit son site de persistance en périphérie, probablement au niveau du rein, et qu'il migre vers le SNC lors d'épisodes particuliers chez les personnes immunosupprimées. (Stohlman et Hinton, 2001)

5.4.1 Immunité antivirale et auto-immunité au SNC

À part les neurones, le SNC se compose de plusieurs autres types cellulaires. Ces cellules gliales remplissent des fonctions très importantes mais bien différentes de celles

des neurones. Les oligodendrocytes représentent un type cellulaire important au niveau du SNC. Elles ne semblent pas jouer de rôle immunitaire mais sont très importantes en produisant la gaine de myéline autour des axones neuronaux. Ces cellules sont également des cibles de choix pour certains virus (Bilzer et Stitz, 1996).

Les microglies représentent une population vraisemblablement de même origine que les macrophages et sont donc considérées comme leur équivalent au SNC (Bilzer et Stitz, 1996). En réponse à une infection virale, elles produisent plusieurs des mêmes cytokines que les macrophages mais également certaines substances pouvant devenir toxiques pour les neurones. Ce sont les cellules qui remplissent le plus adéquatement la fonction de CPA au SNC (Aloisi *et al.*, 1998).

Les astrocytes sont les cellules les plus abondantes du SNC et jouent plusieurs fonctions majeures au niveau du cerveau (Sun *et al.*, 1997). Ils sont impliqués dans la régulation de l'eau et des ions de même que dans le métabolisme des acides aminés et de l'apport d'énergie et de nutriments pour les neurones (Cox *et al.*, 1997). Ce sont aussi des cellules qui peuvent répondre fortement à l'infection virale. L'astroglie est d'ailleurs une réponse immunitaire caractéristique où les astrocytes se gonflent et migrent vers le site infectieux (Bilzer et Stitz, 1996; Cox *et al.*, 1997).

Un processus complexe de régulation réciproque existe entre le SNC et le système immunitaire. D'un côté, le SNC envoie des signaux au système immunitaire par l'entremise d'hormones dont certains glucocorticoïdes, d'un autre le système immunitaire communique avec le SNC à l'aide de cytokines dont l'IL-1 β , le TNF α et l'IL-6, principalement relarguées par les macrophages et certains types de lymphocytes (Rivest, 2001; Rivest *et al.*, 2000). La principale voie utilisée par le SNC pour réguler le système immunitaire est connue sous le nom d'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien, en Anglais; *hypothalamic-pituitary-adrenal axis* ou HPA (Webster *et al.*, 2002). En altérant le métabolisme normal de certaines cellules gliales ou de neurones infectés et avoisinants, on peut penser qu'une infection virale persistante pourrait avoir une influence sur la bonne marche d'un mécanisme aussi important et complexe et occasionner divers types de problèmes, entre autres d'ordre auto-immunitaire.

Le SNC est un environnement très particulier de l'organisme où, la plupart du temps, les cellules effectrices du système immunitaire conventionnel ne sont pas les bienvenues lorsqu'elles sont activées. Les méninges, le liquide céphalorachidien (LCR), la barrière hémato-LCR au niveau du plexus choroïdien, l'absence de réseau lymphatique conventionnel et la fameuse barrière hémato-encéphalique proprement dite, représentent autant de barrières naturelles qui protègent le SNC contre les infections virales (Bilzer et Stitz, 1996).

Pourtant, le système n'est pas parfait puisque des infections virales peuvent survenir au SNC et engendrer une réaction inflammatoire, première étape d'une bonne réponse immunitaire conventionnelle. Comme mentionné plus avant, des cellules immunitaires peuvent ainsi passer les barrières naturelles, parmi celles-ci des lymphocytes T cytotoxiques activés. Le SNC est un site où les antigènes du soi risquent malencontreusement d'être reconnus comme étant étrangers par les lymphocytes T cytotoxiques, puisque certaines de ces cellules peuvent réagir contre des épitopes retrouvés sur les cellules. Une réaction auto-immunitaire importante peut s'en suivre et causer des dommages au tissu nerveux environnant. C'est ce qui semble l'explication la plus plausible dans l'apparition de maladies comme la sclérose en plaques par exemple (Poser, 1993).

Comme préalablement mentionné, diverses études tendent en effet à montrer l'implication d'infections virales persistantes en tant qu'agent étiologique partiel de pathologies neurodégénératives. Celles-ci impliqueraient peut-être un volet d'ordre auto-immunitaire; i-e où le système immunitaire, trompé par l'infection virale, devient lui-même cause de la maladie en s'attaquant au soi (Talbot *et al.*, 2001). Le Tableau 5, adapté de Talbot et collaborateurs (2001), résume bien les différentes situations où infection virale au SNC et pathologie auto-immunitaire peuvent être liées. Il devient donc primordial de bien caractériser les facteurs permettant au VSV d'établir une infection persistante au niveau de cellules issues du SNC si, comme il est présenté à la dernière section du chapitre I, on entend éventuellement utiliser le VSV pour détruire des cellules tumorales situées au niveau du SNC ou même ailleurs dans l'organisme, étant donné le pouvoir neuroinvasif du virus.

Tableau 5. Implication possible d'infections virales dans le développement de pathologies auto-immunitaires au système nerveux central

	Effet systémique sur la réponse immunitaire	Effet au niveau du SNC
Induction ou maintien de la réponse immunitaire spécifique	Induction possible de réaction immunitaire croisée entre Ag viral et Ag du SNC (mimétisme moléculaire)	Réponse immunitaire contre Ag viral exprimé au niveau des cellules neurales
	Réponse immunitaire contre Ag du soi provenant du SNC et transportés vers les ganglions lymphatiques périphériques	Augmentation du niveau d'expression ou libération d'Ag neural libéré par cellules infectées Sensibilisation aux auto-Ag et induction d'un bris de tolérance immunitaire Propagation de déterminants Présentation antigénique par CPA du SNC à des lymphocytes présensibilisés
Augmentation de réponse immunitaire non spécifique	Activation des CPA	Au niveau de la BHE : Induction de chimiokines et de molécules d'adhésion
	Modification dans l'équilibre entre les différentes cellules immunitaires et le patron de cytokines	Activation de CPA périvasculaires
	Induction de molécules impliquées dans la migration lymphocytaire	Au niveau du parenchyme : Activation des microglies comme CPA et cellules productrices de cytokines Augmentation des fonctions effectrices des cellules gliales en général : -Production de NO, -Cytokines, protéases -capacité ADCC

Ag: antigène CPA: cellule présentatrice d'antigène NO: oxydes nitriques
ADCC : *Antibody Dependent Cell Cytotoxicity* BHE: Barrière Hémato-encéphalique

Bien que certains virus et des co-facteurs associés (notamment génétiques) soient déjà identifiés de façon plus ou moins formelle comme agents étiologiques possibles de certaines maladies neurologiques, il reste encore beaucoup à connaître à propos des mécanismes précis régissant le tout. Nombre de virus ont été utilisés comme modèle, autant *in vitro* que *in vivo*, pour tenter de comprendre comment l'infection persistante pourrait jouer un rôle pour mener à de telles pathologies.

5.4.2 Virus et persistance : modèles animaux de neuropathologies associées

Quelques modèles d'infection virale persistante existent chez l'animal et sont utilisés afin de tenter d'élucider, au moins en partie, comment ce type de pathologie peut survenir. Le coronavirus MHV et le virus de Theiler (TMEV; *Theiler's murine encephalomyelitis virus*) sont deux modèles murins étudiés depuis longtemps et sont de mieux en mieux caractérisés et compris.

5.4.2.1 Le virus de Theiler : TMEV

Le virus de Theiler de la famille des *Picornaviridae*, est un pathogène entérique naturel de la souris. Étant donné la filiation avec le virus de la poliomyélite qui est aussi un picornavirus avec un cycle vital très similaire, Max Theiler a, au cours des années 30, surtout utilisé « son virus » comme modèle pour comprendre le virus de la poliomyélite. Toutefois, en virologie moderne, l'infection de souris SJL/J génétiquement susceptibles par le TMEV est devenu l'un des modèles animaux de la sclérose en plaques humaine les plus utilisés (Brahic, 2002). Les souches virulentes GDVII et FA ont la capacité d'induire une encéphalomyélite monophasique généralement fatale (Stohlman et Hinton, 2001). Les souches virales moins virulentes, DA (*Daniel's*) et BeAn peuvent également induire une encéphalomyélite aiguë suivie de l'établissement d'une infection persistante associée à une phase démyélinisante chronique chez la souris (Talbot, 1995; Stohlman et Hinton, 2001). Il s'agit d'un des modèles les plus pertinents de la sclérose en plaques humaine à cause de nombreuses similarités d'ordre pathologique et immunologique (Miller et Gerety, 1990) En effet, dans ce modèle, la gaine de myéline abimée par une

réaction auto-immunitaire peut se reformer entre des crises, ce qui représente une des formes de sclérose en plaques chez l'humain (Miller *et al.*, 1995).

La capacité du virus à établir et maintenir une infection persistante semble en partie liée à la présence d'une protéine particulière, la protéine L*, issue d'un ORF alternatif à l'intérieur du gène VP2 du virus (van Eyll et Michiels, 2000; Ghadge *et al.*, 1998).

5.4.2.2 Le coronavirus murin : MHV

Le *Mouse Hepatitis Virus* (MHV) fait partie de la famille des *Coronaviridae*. La plupart des souches de MHV sont d'abord, comme leur nom l'indique, des virus ayant un tropisme pour les cellules hépatiques (Matthews *et al.*, 2002), pourtant certaines souches, en particulier MHV-A59 et JHM (MHV-4), peuvent aussi infecter les neurones ainsi que les cellules gliales (Matthews *et al.*, 2002). Ces 2 souches neurotropes du MHV, peuvent créer une infection persistante au niveau du SNC chez la souris. Habituellement, lors d'une infection aiguë, le MHV entraîne une encéphalomyélite où toutes les cellules du SNC peuvent être infectées (Stohlman et Hinton, 2001). Suite à une infection aiguë au cerveau par la souche JHM, seulement un très faible pourcentage des souris infectées survivent et développent une pathologie chronique et démyélinisante (Lampert *et al.*, 1973; Weiner, 1973), c'est pourquoi plusieurs des études sur la pathologie démyélinisante liée à une infection persistante se font aujourd'hui à l'aide de mutants dont la capacité à infecter les neurones est altérée (Perlman, 1998; Stohlman et Hinton, 2001). En fait, la souche MHV-JHM peut, après inoculation intranasale, engendrer une maladie démyélinisante plusieurs semaines plus tard et à ce point, la moelle épinière devient un site où l'ARN viral demeure (Perlman *et al.*, 1990). Dans des conditions similaires d'infection, l'ARN de la souche MHV-A59 est retrouvé dans le cerveau jusqu'à 12 mois post-infection (Lavi *et al.*, 1984a). De plus, la souche MHV-A59 injectée par voie intracrânienne ou intranasale, engendre une courte encéphalite aiguë dans certaines régions du SNC suivie d'une maladie démyélinisante chronique associée à une persistance du génome viral (Lavi *et al.*, 1984a; 1984b; 1984c). Il est tout à fait clair que le système immunitaire, particulièrement par l'entremise des lymphocytes

T, est impliqué dans la pathologie démyélinisante associée à la persistance du MHV au SNC (Wu et Perlman, 1999; Wu *et al.*, 2000).

5.4.2.3 Virus mutants et persistance au SNC

On l'a vu, certaines mutations virales peuvent altérer la capacité d'infection des virus en modifiant partiellement leur tropisme; c'est notamment le cas de la souche MHV-JHM (Perlman, 1998). D'autre part, certains virus ne persistent que lorsque des mutations rendent les virions moins virulents. Le tropisme des virus ou leur capacité à interagir avec certaines protéines cellulaires peuvent être modifiés, de même que leur capacité de réplication. Il existe un type particulier de mutation relié à la température ou plutôt à une sensibilité accrue à celle-ci. Il semble établi depuis déjà un bon moment que des mutants thermosensibles (ts) apparaissent à l'intérieur d'une population virale donnée lors des cycles réplcatifs successifs en conditions de croissance semi ou non permissives. *In vitro* et *in vivo*, un processus de sélection de ce type de mutants jouerait certainement un rôle dans l'établissement et/ou la maintenance d'une infection persistante. (Preble et Youngner, 1975)

Le virus de la rougeole est un type de virus dont la biologie favorise l'apparition de mutants ts. Une étude menée chez le hamster nouveau-né, afin de vérifier le potentiel "encéphalitogène" de neuf mutants ts de ce virus, a démontré que la réplication de ceux-ci pouvait être inhibée lors d'une infection par injection intracrânienne. Le virus de type sauvage entraîne une encéphalite aiguë chez les hamsters nouveau-nés alors que les différents mutants ts sont plus ou moins fortement atténués au niveau de leur potentiel de neurovirulence selon la nature de leur mutation ts. En fait, il semble que si la mutation ts altère le cycle réplcatif de façon précoce, le mutant sera atténué. Inversement, si la perturbation survient vers la fin du cycle, le virus mutant gardera en bonne partie son potentiel de virulence. (Haspel *et al.*, 1975)

Il semble toutefois clair que des facteurs cellulaires au niveau du SNC participent au processus d'atténuation virale en engendrant une altération dans l'expression de certains gènes viraux, ce qui favorise la mise en place d'une infection non-lytique et persistante (Schneider-Schaulies *et al.*, 1999). Quoiqu'il en soit, il est également clair

que de nombreuses mutations ont été identifiées au niveau du gène M d'isolats cliniques de virus de la rougeole associés à des cas de panencéphalite subaiguë sclérosante (PESS) (Ayata *et al.*, 1998), une maladie rare associée à une persistance du virus de la rougeole au niveau du SNC. Le *canine distemper virus* (CDV) représente un autre exemple intéressant de virus pouvant persister au SNC. Comme dans le cas de la rougeole, des mutations dans le gène codant pour la protéine matricielle ont été mises en évidence chez des souches virales pouvant persister au SNC (Stettler *et al.*, 1997).

Malgré tous les exemples de virus déjà connus pour leur potentiel à causer une infection persistante reliée ou non à l'apparition de divers types de mutants, certains éléments manquent pour bien expliquer le portrait global. Un outil supplémentaire pour tenter de comprendre encore mieux l'infection persistante, et du même coup les neuropathologies qui pourraient y être reliées, est certes le Virus de la Stomatite Vésiculaire (VSV).

6. VSV : Le Virus de la Stomatite Vésiculaire

Le VSV fait partie d'une des plus grandes familles de virus connues, les *Rhabdoviridae*, nom dont l'étymologie est grecque, le terme *rhabdos* signifiant bâtonnet. On compte deux genres de *Rhabdoviridae*. Les *Lyssavirus*, dont fait partie le virus de la rage, forment le premier, alors que VSV représente le second, nommé *Vésiculovirus*. Ces virus peuvent s'attaquer à un grand nombre d'espèces vivantes, autant animales que végétales. Parmi cette myriade d'hôtes possibles, certains *Rhabdoviridae* dont le VSV, vont même pouvoir infecter des mammifères, incluant l'humain. (Wagner, 1991; Letchworth *et al.*, 1999)

Les sérotypes New Jersey et Indiana représentent les deux souches ou sérotypes majeurs de VSV. Ils sont principalement présents dans la partie ouest de la planète. Le sérotype Indiana compte quelques sous-groupes et bien que les deux sérotypes soient considérés virulents, Indiana semble l'être beaucoup plus que New Jersey (Fultz et Holland, 1985). L'exercice de comparaison des génomes indique que les sérotypes Indiana et New Jersey sont passablement différents. En effet, l'homologie de séquences en acides aminés des protéines majeures des deux souches varie de 32% pour la protéine

P, à 68% pour la protéine N. Entre ces extrêmes, l'homologie entre les protéines M présente 62%, celle des deux protéines G est de 51% (Gill et Banerjee, 1986) et celle des protéines L est de 65,3% (Feldhaus et Lesnaw, 1988).

Plusieurs sérotypes moins répandus sont retrouvés à travers le monde. Le Tableau 6 qui suit, adapté de Rose et Whitt (2001) et de Letchworth et collaborateurs (1999), présente une liste exhaustive des différents sérotypes de VSV à travers le monde. Les souches portant un astérisque (*) sont celles pour lesquelles une capacité à infecter l'humain, en causant une maladie apparentée à une grippe sévère mais non fatale, a été démontrée (Letchworth *et al.*, 1999). Du côté économique-agricole, il est à noter que le VSV engendre habituellement une stomatite vésiculaire, d'où son nom. La pathologie ressemble en fait aux symptômes attribués à la fièvre aphteuse et se traduit la plupart du temps par l'apparition de lésions vésiculaires et érosives sous la langue souvent accompagnée d'apparition de grosses vésicules sur les gencives, les lèvres, et même sur les trayons au niveau du pis ou encore sur le prépuce. Des symptômes plus sévères, impliquant entre autres une gliose au niveau du SNC, peuvent être observés suite à une injection intradermique dans la langue. Les conséquences économiques peuvent facilement se chiffrer à 100-250 dollars US par vache dans un troupeau (Letchworth *et al.*, 1999).

TABLEAU 6. Membres des deux principaux sérotypes du Virus de la Stomatite Vésiculaire et autres *Vesiculovirus* retrouvés dans la nature

VIRUS	ISOLATION	SOURCE EN NATURE
VSV-New Jersey*	New Jersey, USA 1926 bestiaux, chevaux (Cotton 1927)	mammifères, moustiques, mouches noires, mouches à cheval
VSV-Indiana*	Indiana, USA 1925 bestiaux (Cotton, 1926)	mammifères, moustiques, mouches des sables
VSV-Indiana 2* (Cocal)	Trinidad, Brésil, 1964 insectes, rongeurs (Jonkers <i>et al.</i> , 1964)	mammifères, moustiques, mites
VSV-Indiana 3* (Alagoas)	Brésil, 1964 chevaux, bestiaux, humains (Federer <i>et al.</i> , 1967)	mammifères, mouches des sables
<u>Autres vesiculovirus apparentés</u>		
Chandipura*	Indes, 1965 humains (Bhatt et Rodrigues, 1967)	mammifères, mouches des sables
Piry*	Brésil, 1973 opossum (Theiler et Downs, 1973)	mammifères
Isfahan*	Iran, 1975 Humains (Tesh <i>et al.</i> , 1977)	mouches des sables, tiques
Calchaqui*	Argentine, 1982 Insectes (Calisher <i>et al.</i> , 1987)	moustiques
Jurona		moustiques
Carajas		mouches des sables
Maraba		mouches des sables
Yug Bogdanovac		mouches des sables
Perinet		moustiques, mouches des sables
Porton-S		moustiques

* souches virales pouvant infecter les animaux domestiques et l'humain

Comme tous les *Rhabdoviridae*, VSV possède une forme caractéristique en balle de fusil, rappelant le bâtonnet ou *rhabdos* déjà mentionné. Il est composé de deux constituants structuraux majeurs, soit une nucléocapside ou ribonucléoprotéine et une enveloppe constituée d'une double couche lipidique recouvrant de très près la nucléocapside. Cette dernière est en fait constituée du génome d'ARN monocaténaire à polarité négative associé à 1258 molécules de la nucléoprotéine N arrangées comme les perles d'un chapelet autour du génome, à raison d'une molécule N par 9 nucléotides. Dans l'enveloppe, 1205 molécules de la glycoprotéine G ayant une portion transmembranaire forment des spicules trimériques à l'extérieur de l'enveloppe pour permettre une meilleure adsorption aux cellules cibles. On évalue donc à environ 400, le nombre de ces trimères à la surface d'un virion typique. De plus, 1826 molécules de protéine matricielle M sont situées à l'intérieur de l'enveloppe virale et forment ni plus ni moins qu'un pont permettant de rattacher la nucléocapside à l'enveloppe. Deux autres composantes structurales importantes du virion sont les protéines P et L. La protéine P est en fait une phosphoprotéine associée à L (*large protein*) pour former un complexe qui représente la ARN polymérase dépendante de l'ARN. On retrouve 50 molécules de L et 466 molécules de P par virion. (Rose et Whitt, 2001)

Le virus de la stomatite vésiculaire possède un génome d'ARN monocaténaire non-segmenté à polarité négative de 11 161 nucléotides (Figure 1) où cinq gènes, codant pour les protéines structurales.

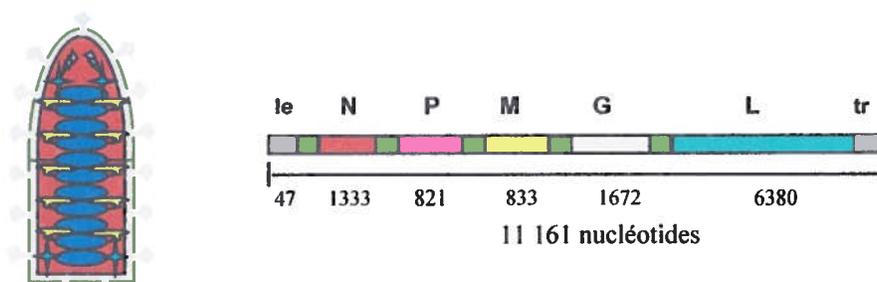


Figure 1. Représentation schématique d'un virion du virus de la stomatite vésiculaire et de l'organisation de son génome monocaténaire à polarité négative.
le : *leader*, tr : *trailer*

Les gènes viraux sont présents de l'extrémité 3' vers 5' selon l'ordre dans lequel leur transcription s'effectue (Wagner, 1987). En amont de ces cinq gènes est retrouvé une séquence de tête (*leader*) de 47 nucléotides, transcrite mais non coiffée ni polyadénylée et non traduite. Cette région du génome a déjà été associée à une possible fonction d'inhibition de transcription chez la cellule hôte (Weck et Wagner, 1979; Weck *et al.*, 1979; McGowan *et al.*, 1982). Certaines études ont toutefois démontré que la séquence de tête n'avait pas de rôle essentiel dans ce processus (Dunnigan *et al.*, 1986). Quoiqu'il en soit, la séquence de tête sert principalement de promoteur pour les processus de transcription et de réplication du génome par l'ARN polymérase dépendante de l'ARN (Emerson, 1992; Whelan et Wertz, 1999a). Une étude plus pointue a permis de mettre en évidence que les 24 premiers nucléotides de la séquence de tête servaient à la fois pour la réplication et la transcription, alors que les nucléotides 25 à 47 ne servaient que pour rendre optimal le processus de transcription (Li et Pattnaik, 1999). Un modèle alternatif suggère que la polymérase peut aussi débiter la transcription à un site interne dans le génome en amont du gène N (Chuang et Perrault, 1997). Trois nucléotides (AAA) séparent la séquence de tête du premier gène N, correspondant au gène de la nucléoprotéine (1333 nucléotides), puis viennent ensuite les quatre autres gènes, toujours séparés entre eux par les 2 nucléotides GA ou CA. Dans l'ordre, on retrouve d'abord le gène P (anciennement NS), codant pour la phosphoprotéine du complexe polymérase, qui doit être phosphorylée pour être fonctionnelle (821 nucléotides). Deux petites protéines de 55 et 65 acides aminés respectivement appelée C et C', sont également encodées dans le gène P. Ces deux protéines n'ont aucun rôle identifié ni dans la réplication, ni dans la synthèse d'ARN et de protéines virales, ni dans la fonction de *shutoff* cellulaire engendré lors d'une infection par VSV. Toutefois, elles sont conservées chez tous les *vesiculovirus* et il est suggéré qu'elles pourraient avoir un rôle dans la pathogenèse (Rose et Whitt, 2001). En continuant sur le génome, viennent ensuite les gènes M, qui encode la protéine de la matrice (833 nucléotides), G, la glycoprotéine de surface (1672 nucléotides) et enfin L, qui code en fait pour la protéine principale du complexe polymérase viral (6380 nucléotides). Tous les ARN messagers débutent par la séquence coiffée AACAG et se terminent par UAUG-polyA (Rose et Whitt, 2001).

Complètement en aval, une queue de 59 nucléotides non traduits est également présente et un rôle dans la réplication, pour cette région nommée *trailer* (Tr), est aujourd'hui connu. Elle contient des séquences nucléotidiques importantes pour initier une réplication efficace de nouvelles molécules génomiques à polarité négative à partir de molécules antigénomiques (aussi appelées intermédiaires génomiques) à polarité positive. Le rôle du Tr est essentiellement attribué à la réplication du génome, contrairement à la séquence de tête qui est également importante pour une transcription efficace des ARNm viraux (Whelan et Wertz, 1999a). Le Tr contient également des séquences liées à l'encapsidation des génomes viraux (Whelan et Wertz, 1999b).

Le VSV possède donc sa propre ARN polymérase qui est en fait un complexe "ARN polymérase-ARN dépendante" afin de transcrire les cinq ARN messagers (ARNm) correspondants aux cinq protéines incluses dans le virion. Le génome est associé à la protéine N, pour former le *core* RNP ou ribonucléoprotéine. Les protéines L et P font également partie du *core* et l'association de toutes ces protéines semble nécessaire pour amorcer et entretenir la transcription. La transcription du *leader* en brin positif semble requise pour que le complexe associé à la polymérase puisse atteindre le gène N et vraiment initier la transcription d'ARNm. Les cinq ARNm correspondant aux cinq gènes sont coiffés et polyadénylés et la quantité de transcrit de chacun dépend de sa position sur le génome. Le *leader* est synthétisé en quantité plus grande que le gène N, qui lui l'est plus que P, et ainsi de suite. La traduction des cinq ARNm en protéines correspondantes se fait par la machinerie cellulaire, immédiatement après la transcription (il y a même chevauchement entre les deux processus) et la quantité relative de chaque protéine est à peu près proportionnelle à celle des ARNm correspondants (Wagner, 1987; Rose et Whitt, 2001). Les courtes régions intergéniques (en vert sur la Figure 1) semblent également importantes dans la régulation de la transcription des différents ARNm (Barr *et al.*, 1997).

Le mécanisme de réplication du virus doit aussi être mis en place. Il implique le même complexe de polymérisation mais en association avec des facteurs cellulaires tels la caséine kinase II (une protéine kinase) impliquée dans la phosphorylation de la protéine virale P ou encore un facteur d'élongation nécessaire à la synthèse protéique, le

EF-1 (Banerjee, 1997). La traduction se fait ici en parallèle au processus de réplication. Les mêmes protéines virales impliquées dans la formation du complexe servant à la transcription des messagers sont nécessaires. En fait, l'interaction entre l'ARN *leader* et la protéine N contrôle la réplication. Les protéines N, L et P, dans l'ordre, s'associent toutes trois à l'ARN *leader* et le tout forme un complexe ribonucléoprotéique résistant aux RNAses pour permettre la polymérisation et la réplication du génome entier (Wagner, 1987; Rose et Whitt, 2001). En fait, N agirait comme agent "anti-terminateur" en empêchant le clivage au site intercistronique (entre chaque gène) lors du processus de réplication du génome (Peluzo et Meyer, 1988). Il est aussi à noter qu'au moins trois types de protéines P existent à l'intérieur d'une cellule infectée; P-0, P-1 et P-2, qui diffèrent par leur niveau de phosphorylation (Banerjee, 1997). Lorsque P-2 se lie au complexe, le tout est dirigé vers la transcription alors que la réplication est inhibée. P-2 aurait en quelque sorte un rôle complémentaire à M qui elle, inhibe la transcription (Chang *et al.*, 1994). La dite protéine M est très importante pour VSV au niveau structural mais elle possède également d'importantes fonctions permettant au VSV de rapidement prendre le contrôle de la cellule infectée.

6.2 La protéine M de VSV : beaucoup plus qu'une protéine structurale

Les travaux de différentes équipes de recherche ont depuis longtemps démontré que la protéine M du VSV pouvait jouer de multiples rôles. La structure de la protéine M du sérotype Indiana a été passablement étudiée et révèle des domaines relativement bien définis auxquels peuvent être associés certaines fonctions particulières. La protéine M participe entre autre à la régulation de la transcription virale (Clinton *et al.*, 1978; Carrol et Wagner, 1979) et à l'assemblage des particules virales (Chong et Rose, 1994; 1993). Les domaines fonctionnels associés à l'assemblage du virion à la membrane plasmique sont situés entre les acides aminés 1 à 51 et 89 à 119. En effet, la région amino-terminale (acides aminés 1 à 10) forme une structure en hélice alpha et permet l'ancrage de la protéine à la membrane plasmique (Barge *et al.*, 1996; Rigault *et al.*, 1991). De plus, une interaction directe de M avec la membrane plasmique semble attribuable à la formation de liens électrostatiques entre cette membrane et le domaine 1 à 51 de M de même qu'à

une association hydrophobe créée entre le domaine 89-119 de M et la membrane plasmique (Ye *et al.*, 1994). À l'intérieur de cellules infectées par VSV, on distingue environ 10% de la quantité totale de la protéine associée à la membrane plasmique (Chong et Rose, 1994; 1993).

La région amino-terminale de la protéine M contient également des domaines importants pour l'assemblage et le bourgeonnement des virions. Un premier motif particulier PPPY, situé entre les acides aminés 24 à 27 (Craven *et al.*, 1999) est très important pour l'exocytose des virions. Un second motif, PSAP, situé entre les acides aminés 37 à 40 (Harty *et al.*, 1999) semble avoir un rôle à jouer dans le déroulement adéquat du bourgeonnement des virions. Le domaine PPPY peut interagir avec diverses protéines cellulaires possédant des domaines WW dont une ubiquitine ligase localisée à la membrane plasmique et ayant un rôle dans l'endocytose et influençant le bourgeonnement de VSV (Harty *et al.*, 2001)

Le domaine permettant l'association de M à la ribonucléoprotéine est quant à lui situé entre les acides aminés 17 et 43 et est aussi responsable de l'inhibition de la transcription virale (Coulon *et al.*, 1990). La protéine M interagit également directement avec la glycoprotéine d'enveloppe (G) pour en stabiliser les sous-unités (Lyles *et al.*, 1992).

En plus des différentes fonctions attribuées à M en rapport au cycle viral lui-même, en particulier dans l'assemblage éventuel des virions, on connaît plusieurs rôles joués par la protéine lors de l'infection pour aider le virus à prendre possession de la machinerie cellulaire. La protéine M peut entre autre inhiber la synthèse protéique cellulaire (Francoeur *et al.*, 1987) en causant la déphosphorylation du facteur eIF4E et de la eIF4E *binding protein*, occasionnant un arrêt de la machinerie de synthèse protéique cellulaire tout en maintenant, au moins temporairement, la traduction des ARN viraux en protéines (Connor et Lyles, 2002). Depuis plusieurs années, on sait également que la transcription des gènes cellulaires (Lyles *et al.*, 1996; Paik *et al.*, 1995; Black et Lyles, 1992), entre autre au niveau du gène de l'interféron β (Ferran et Lucas-Lenard, 1997), est affectée de façon importante par M. Toutefois, cette fonction semble très peu spécifique puisque la quantité de plusieurs ARN dont la transcription dépend des trois différentes

ARN polymérase cellulaires est diminuée suite à l'expression ectopique de M seule ou lors d'une infection par VSV (Ahmed et Lyles, 1998). De plus, cette inhibition d'expression du gène de l'IFN β est clairement attribuable à une capacité de M à inhiber l'expression génique et la synthèse protéique de façon généralisée chez l'hôte (Ahmed *et al.*, 2003).

La protéine M de VSV peut se retrouver au noyau (Lyles *et al.*, 1988) entre autre par l'entremise de deux NLS (*Nuclear Localisation Signals*) (Glodowski *et al.*, 2002). De plus, il a été montré que M pouvait bloquer le système de régulation de transport des ARN et des protéines entre le noyau et le cytoplasme (Her *et al.*, 1997). Ce système de transport requiert la GTPase *RAN* (*Ras related nuclear protein*), une protéine G pouvant être couplée au GTP (au niveau du noyau durant l'interphase) ou au GDP (dans le cytoplasme, particulièrement au moment de la mitose) (Moore, 1998; Pennisi 1998). On sait maintenant que le processus implique une localisation de la protéine au niveau de pores nucléaires (Petersen *et al.*, 2000). En fait une interaction directe de M avec la nucléoporine Nup98 a été mise en évidence pour expliquer le phénomène (von Kobbe *et al.*, 2000). Lors d'une infection par le VSV la cellule abritant le virus meurt après avoir subi des changements morphologiques menant à un arrondissement caractéristique lié à un effet de M (Blondel *et al.*, 1990). Une partie de l'explication du phénomène d'arrondissement provient probablement de l'interaction directe de M avec la tubuline du cytosquelette cellulaire (Melki *et al.*, 1994). De plus, le gène M de VSV possède deux codons AUG supplémentaires qui codent pour des méthionines aux positions 33 et 51 de la protéine M mature. Jayakar et Whitt (2002) ont récemment montré que deux polypeptides supplémentaires, M2 et M3, peuvent être produits lors de l'infection par VSV et il appert que leur fonction principale serait liée à l'induction de l'arrondissement cellulaire caractéristique. En effet, sans la présence de ces deux peptides, cet effet cytopathique survient plus tardivement dans certains types cellulaires (Jayakar et Whitt, 2002).

Toutefois, des travaux plus récents (Kopecky et Lyles, 2003a) indiquent que l'arrondissement cellulaire est une conséquence directe de l'induction d'apoptose induite par la protéine M. Cependant, bien que la protéine M puisse être associée à l'induction

d'apoptose lorsqu'exprimée seule sans aucun autre composant viral (Kopecky et Lyles, 2003a; 2003b; Kopecky *et al.*, 2001) ou lors d'une infection virale (Kopecky et Lyles, 2003b; Desforges *et al.*, 2002; Kopecky *et al.*, 2001), il appert qu'un autre composant viral est impliqué d'une quelconque façon dans l'induction d'apoptose par VSV (Kopecky et Lyles, 2003b; Kopecky *et al.*, 2001). Le processus exact par lequel la protéine M induit l'apoptose n'est pas connu et les chapitres II et III de cette thèse visent à en donner un aperçu. Toutefois, il semble tout à fait clair que la fonction d'inhibition d'expression génique de la cellule hôte attribuée à M se fasse par l'intermédiaire des fonctions d'inhibition de transcription directe et de blocage de transport bidirectionnel entre le cytoplasme et le noyau dont il a été fait mention plus avant. Le phénomène d'inhibition d'expression des gènes de la cellule hôte semble être la cause d'une induction d'apoptose subséquente, qui elle engendre l'arrondissement cellulaire (Kopecky et Lyles, 2003a). Toutefois, un bémol doit être apporté à cette dernière conclusion. En effet, il semble que la protéine M induise rapidement l'apoptose dans les cellules où l'induction d'apoptose ne nécessite pas la transcription de nouveaux gènes. Dans les cellules où l'induction d'apoptose nécessite l'expression de nouveaux gènes ou l'augmentation d'expression de certains gènes, M agirait plutôt en retardant l'apoptose induit par un autre facteur viral non identifié, par son effet d'inhibition de transcription des gènes de la cellule-hôte (Kopecky et Lyles, 2003b). Les chapitres II et III de la présente thèse font d'ailleurs mention de l'importance d'une induction d'apoptose adéquate chez la cellule infectée pour prévenir le processus d'établissement d'une infection persistante en partie liée à la protéine M lors de l'infection par VSV (Desforges *et al.*, soumis juin 2003; Desforges *et al.*, 2002)

6.3 VSV : Divers types d'infections possibles

Comme il a été brièvement mentionné auparavant, VSV peut, de façon naturelle, infecter certains ruminants par l'entremise de vecteurs arthropodes (Wagner, 1991; Letchworth *et al.*, 1999) en produisant des lésions au niveau des muqueuses à l'intérieur de la bouche des animaux. La plupart du temps, ces ulcères guérissent et l'animal s'en

remet bien. Lors d'infection chez les bestiaux, il arrive cependant que le génome viral puisse être détecté plusieurs mois après que l'infection ait été diagnostiquée (Letchworth *et al.*, 1996).

Diverses équipes ont de plus montré que des rongeurs tels le hamster (Stanners *et al.*, 1975; Fultz *et al.*, 1982; Barrera et Letchworth, 1996) ou la souris (Plakhov *et al.*, 1995; Bi *et al.*, 1995a) pouvaient adéquatement servir de modèles animaux afin de permettre l'étude de l'infection liée à VSV et de chercher à comprendre comment peut survenir une pathologie neurologique impliquant ce type de virus. Ces faits permettent de compléter des études en culture cellulaire, qui ont entre autres permis de mettre en évidence que VSV pouvait infecter des cultures primaires de neurones de souris (Dubois-Dalcq *et al.*, 1982). Pourtant, ni les processus impliqués, ni le type précis d'infection comme tel, ne sont bien connus, d'où la pertinence de viser à comprendre de façon plus détaillée les mécanismes impliqués lors de l'infection.

VSV est aussi capable d'infecter l'humain (Hanson *et al.*, 1950; Reif *et al.*, 1987; Tesh *et al.*, 1987; Quiroz *et al.*, 1988). Les symptômes reliés à une infection par le VSV chez l'humain ressemblent en général à ceux que peut induire le virus influenza, responsable de la grippe. Pourtant dans un cas au moins, Quiroz et ses collaborateurs (1988) ont mis en évidence une relation entre l'infection par le VSV (Indiana) et le développement d'une encéphalite chez un jeune garçon panaméen. Enfin, un autre fait intéressant en rapport à une infection humaine provient d'une étude réalisée par l'équipe de Hardgrave (1993) qui montre que des anticorps anti-VSV sont retrouvés chez des patients atteints de lupus érythémateux, une maladie auto-immune répandue.

D'un autre côté, il convient de s'arrêter ici à un phénomène nouveau concernant le VSV. En effet, des études récentes ont montré que certains virus, dont le VSV, présentaient un potentiel intéressant dans la lutte contre le cancer. Lorsque utilisé en combinaison avec les interférons de type 1, le VSV semble infecter et tuer de manière préférentielle les cellules tumorales sans trop affecter les cellules saines à l'intérieur d'un organisme. Des travaux de deux équipes de recherche (Stodjl *et al.*, 2000; Barber, 2001) laissent présager que VSV pourrait éventuellement être administré chez l'humain afin de tester son véritable pouvoir en tant qu'agent anti-tumoral. Chercher à

comprendre quels facteurs cellulaires ou viraux peuvent contribuer à transformer une infection aiguë en infection persistante est donc d'une grande importance afin de contrer d'éventuels effets secondaires néfastes qui pourraient résulter d'un traitement anti-cancer utilisant le VSV. La section 8 discute de façon plus détaillée du concept de virus oncolytique et présente de façon plus complète comment et pourquoi plusieurs virus, en particulier le VSV, suscitent un véritable intérêt dans le domaine des traitements contre le cancer.

6.3.1 VSV : mutants et persistance

Tous les virus à ARN, surtout ceux possédant une ARN polymérase-ARN dépendante ne possédant pas d'activité de correction d'épreuve (*proof reading*), ont un taux de mutation très élevé. Il n'est donc pas rare de retrouver parmi une population, plusieurs mutants capables de se multiplier lorsque les conditions leur sont favorables. Beaucoup de ces mutants sont qualifiés de thermosensibles (*ts*) alors qu'une mutation sur une des protéines engendre une sensibilité accrue aux températures non-permissives. Le taux d'apparition de mutants VSV peut atteindre $1,1 \times 10^{-3}$. Comme VSV possède cinq protéines, cinq groupes principaux de mutants *ts*, appelés groupe de complémentation, existent. Le groupe I représente les mutants dont la thermosensibilité est causée par une mutation sur la protéine L, où se retrouvent 90% des mutants *ts*. Les groupes II, III, IV et V sont respectivement à relier aux protéines P, M, N et G. Un groupe VI semble relié à P (peut-être P2) et certains mutants demeurent à ce jour "inclassifiables" (Wagner, 1987).

Dans le cas du sérotype Indiana, plusieurs mutants *ts* existent et nos études antérieures ont montré que six de ces mutants *ts*, tous issus d'un variant particulier nommé HR, pouvaient persister dans des cultures de cellules murines L-929 et simiennes VERO. Il a par la suite été démontré que tous, sans exception, portaient une seconde mutation sur la protéine matricielle M (Charron, 1996; Desforges *et al.*, 2001). Les mutations de M sont identifiées (Beausoleil, 1994; Desforges *et al.*, 2001) et toutes semblent altérer la fonction reliée à l'inhibition de synthèse protéique et de transcription génique. Cependant, les mutations induisant le phénotype *ts* à l'intérieur de cette série de

variants demeurent pour la plupart inconnues à ce jour. On sait toutefois qu'elles ne touchent pas la protéine M puisque tous les révertants conservent la mutation dans M.

Un mutant *ts* particulier de VSV-Indiana, G31 (groupe de complémentation III, protéine M), peut engendrer une infection persistante *in vitro*, lorsque l'infection est accompagnée de particules défectives. Dans ces conditions particulières, ce mutant persiste sur trois différents types cellulaires; soit la lignée L-929 (fibroblastes de souris), une lignée issue d'un oligodendrogliome humain ainsi qu'une lignée gliale de rat (Huprikar *et al.*, 1986). Holland et Villareal (1974) avaient préalablement montré le même phénomène sur des cellules BHK-21 durant au moins 150 jours. Le même mutant *ts*, injecté par voie intracrânienne à des souriceaux nouveau-nés, entraîne une pathologie plus lente et progressive que ne le fait la souche sauvage. Une paralysie des membres inférieurs survient assez tôt puis la mort suit après environ une semaine. Un second mutant, *ts* 41, (groupe de complémentation IV, portant donc la mutation *ts* sur la protéine N), a été étudié de façon similaire mais aucun symptôme neurologique n'a cependant été observé (Rabinowitz *et al.*, 1976).

Stanners et Goldberg (1975) avaient déjà démontré que le mutant *ts* T1026, issu de VSV Indiana-HR, pouvait induire une infection persistante *in vitro* en condition restrictive à 39°C. *In vivo*, le même mutant *ts*, engendre une paralysie des membres inférieurs et acquiert un pouvoir neuroinvasif accru par rapport à HR lorsqu'il est injecté de façon intra péritonéale (Stanners et Goldberg, 1975; Stanners *et al.*, 1975). Les travaux réalisés par Charron (1996) ont confirmé les résultats *in vitro* établis par Stanners et Goldberg et ont également identifié au moins trois mutants *ts* supplémentaires, issus de la même souche sauvage HR-Indiana (Francoeur *et al.*, 1987), pouvant induire la persistance *in vitro* sur des cellules L-929 et VERO. Ces mutants, TP-2, 3 et 4, possèdent également une protéine M mutée qui entraîne la perte de capacité d'inhibition de la synthèse protéique (PSI) et d'inhibition de transcription génique, fonction importante dans l'induction de l'infection aiguë accompagnée d'un important effet cytopathique. Ces deux caractéristiques doivent exister de façon concomitante pour que l'infection persistante puisse s'établir et demeurer au niveau des types cellulaires susmentionnés. Au moins deux mutants de la même série ne montrent qu'une sensibilité

accrue à la chaleur (donc *ts*), TP-5 et TP-6, et ne réussissent pas à établir une infection persistante sur les deux lignées fibroblastiques, pas plus d'ailleurs que ne le peut le mutant TP-1, également issu du virus HR, et portant une mutation sur M mais n'étant pas *ts* (Charron, 1996). Une mutation consensus à l'acide aminé 163 a aussi été mise en évidence dans la protéine M d'une population virale hétérogène issue d'une infection persistante de cellules L (Ahmed et Lyles, 1997).

Des cultures primaires de neurones d'embryons de 12-13 jours de souris C57BL/6 ont aussi été étudiées en relation avec une infection possible par le sérotype Indiana de VSV. Dans ce cas, il semble que des neurones différents sont affectés de façon variable. Les neurones sensitifs sont les premiers atteints alors qu'on y voit rapidement des antigènes viraux de même qu'une réplication plus ou moins active. Lorsque des particules défectives (DI) sont ajoutées, l'infection se modifie et devient persistante. Dans ces circonstances, aucune particule virale n'est retrouvée dans le milieu mais il est possible d'observer la formation du complexe ribonucléoprotéique (RNP) de VSV au niveau de la membrane cytoplasmique des cellules infectées (Faulkner *et al.*, 1979). Le VSV de sérotype Indiana peut persister de façon systémique pour plusieurs mois chez la souris (Cave *et al.*, 1985) ou le hamster (Fultz *et al.*, 1982) lorsque des particules défectives ou des mutants *ts* (Doll et Johnson, 1988) sont présents lors de l'infection.

Pour expliquer la mise en place d'une infection persistante induite par VSV-Indiana, il semble donc important de considérer la formation de particules virales défectives interférentes (DI). Celles-ci peuvent jouer un rôle important pour contrer la virulence d'une souche de type sauvage (Cave *et al.*, 1985) mais aussi dans certains cas, pour atténuer une souche considérée *ts* (Holland et Villareal, 1974). Ainsi, on peut croire qu'au moins *in vitro* une des façons dont la thermosensibilité pourrait en bout de ligne s'exprimer, serait par la tendance d'un mutant *ts* à produire des particules DI. Selon le gène affecté par la mutation *ts*, le virus produira une quantité variable de virions (nécessairement plus faible que celui d'une souche non *ts* à température non permissive) et une proportion de ces virions seront incomplets ou défectifs. Une des façons de

concevoir le pouvoir infectieux atténué d'un mutant ts, serait donc relié à sa capacité plus ou moins altérée à former des particules complètes

6.3.2 Infection persistante par VSV; autres cas

Des anticorps anti-VSV, ajoutés à des cultures primaires de neurones de souris, permettent de contenir l'infection et même d'établir une infection persistante pour au moins 2 semaines. En présence d'anticorps, il semble y avoir protection contre l'infection aiguë. Certaines cellules non neuronales, présentes dans la culture primaire, éliminent efficacement la proportion de neurones infectés qui produisent des particules virales. La plupart des neurones ne produisent pas de virions mais plusieurs d'entre eux contiennent bel et bien le génome viral sous une forme latente sans qu'on y retrouve d'antigènes viraux et encore moins de particules virales (Dubois-Dalcq *et al.*, 1979).

Plus récemment, Barrera et Letchworth ont réussi à démontrer la persistance de VSV au niveau du SNC chez des hamsters en mettant en évidence la persistance d'ARN viral au niveau du SNC, plusieurs mois après l'infection intra péritonéale par la souche sauvage New Jersey (Barrera et Letchworth, 1996). Moins de 10% des animaux sont morts suite à l'infection aiguë et aucun virion n'est détecté chez les animaux qui survivent. L'ARN génomique viral est détecté de façon systémique 2 mois après l'infection chez la majorité des animaux de même que chez 2 animaux au niveau du SNC après 10 mois et chez un seul après 1 an.

La problématique générale, concernant l'étiologie de maladies neurologiques en est une qui semble fort complexe. Même si la cause demeure encore obscure aujourd'hui, l'implication possible des virus semble de plus en plus plausible. Plusieurs hypothèses sont mises de l'avant pour expliquer au moins en partie ce phénomène et parmi celles-ci, une infection persistante liée à une modulation de l'apoptose par certains facteurs viraux pourrait être impliquée.

7. Apoptose et infection virale

Dans la dynamique de mise en place et d'entretien d'une infection virale, l'apoptose peut entrer en jeu. Dans le cas où les virus sont impliqués, il convient de parler de modulation de l'apoptose puisqu'il peut y avoir autant induction qu'inhibition du processus, dépendant du virus en cause ainsi que des cellules qu'il infecte. L'interaction virus-cellule est donc, encore une fois, primordiale. (Teodoro et Branton, 1997a)

Comme on l'a vu plus avant, plusieurs niveaux d'intervention existent pour que le système immunitaire puisse arriver à contrer une infection virale. Le processus évolutif a permis à l'hôte de développer un formidable réseau de défense intégré où les réponses immunitaires naturelle et adaptative se complètent. Au cours des dernières années, plusieurs travaux importants ont permis de mettre en lumière l'importance de la bonne mise en place du processus apoptotique pour que les divers éléments du système immunitaire puisse efficacement combattre les virus. La réplication et la propagation virale de même que l'établissement d'infection persistante des cellules infectées représentent différents niveaux d'intervention où l'apoptose entre en jeu. (Barber, 2001)

7.1 L'apoptose : un processus complexe de destruction cellulaire régulée

Avant de s'aventurer plus avant dans une discussion sur l'importance de l'apoptose en réponse à une infection virale, une présentation de ce phénomène complexe est de mise puisqu'il est au coeur de nos travaux.

De façon très générale, le processus peut être réduit à trois étapes principales. D'abord, le stimulus, étape nécessaire pouvant être due à différents événements dont l'infection virale. La seconde étape de l'apoptose est la phase d'exécution, où l'on observe un changement morphologique plus ou moins marqué des cellules infectées, avec une vacuolisation de leur cytoplasme, une condensation de la chromatine puis une fragmentation de l'ADN. À noter que de nombreux organites demeurent longtemps intacts et que les mitochondries sont actives très longtemps. Enfin, la formation de corps apoptotiques, (soit des structures de chromatine extrêmement condensée), qui s'associent à la membrane avant d'être phagocytés par d'autres cellules, représente la troisième

étape. C'est le bourgeonnement, souvent caractéristique, observé en microscopie. (Teodoro et Branton, 1997a)

Le processus apoptotique, souvent nommé mort cellulaire programmée, sert à plusieurs fins dans l'organisme. L'élimination de cellules en excès lors du développement embryonnaire, de lymphocytes lors des processus de sélection au niveau du thymus et de cellules devenues dangereuses parce qu'infectées ou transformées chez un organisme mature, résume de façon globale, les situations où il est extrêmement important de pouvoir compter sur la bonne mise en place de l'apoptose (Hengartner, 2000).

7.1.1 Perspective historique

La première publication faisant état d'une possibilité de mort programmée décrit les observations de Carl Vogt travaillant sur le développement du système nerveux chez les amphibiens dès 1842. Plusieurs années plus tard, en 1951, l'embryologiste Gluksmann parle d'une mort cellulaire induisant des changements morphologiques particuliers. Par la suite, Lockshin et Williams décrivent la mort cellulaire survenant lors de la morphogenèse chez les insectes et en 1966, J.R. Tata démontre que la perte de la queue chez les têtards dépend d'un processus de mort cellulaire nécessitant une synthèse protéique active (Vaux et Korsmeyer, 1999).

Cependant, la véritable reconnaissance d'un processus actif de mort cellulaire programmée différent de la nécrose, date officiellement de 1972. C'est au Royaume-Uni, dans la revue *British Journal of Cancer* que Kerr, Willie et Currie propose que le terme Apoptose (du Grec pour décrire la perte des pétales chez une fleur) soit utilisé pour décrire le mécanisme qui régit la mort cellulaire faisant contrepoids au processus de mitose pour réguler le développement cellulaire chez les animaux supérieurs (Kerr *et al.*, 1972).

Pendant longtemps, les processus de prolifération et de différenciation cellulaire présentaient un grand intérêt pour de très nombreux chercheurs alors que le processus de mort cellulaire, que l'on croyait invariablement nécrotique et passif, n'attirait l'attention d'à peu près personne. Pourtant, la publication de Kerr et collaborateurs, en 1972, et de

nombreuses autres au cours des années 70, ont rapidement contribué à changer la façon de voir les choses à propos de la mort des cellules. À partir de ce moment, on prenait conscience et on avait la preuve que la mort des cellules pouvait être très intéressante à étudier parce qu'elle représentait un processus actif, contrôlé, voire même programmé sur lequel il serait peut-être possible d'intervenir (Wyllie *et al.*, 1980).

7.1.2 Les caspases : des protéases particulières

La vaste majorité des changements morphologiques observés chez une cellule en apoptose sont à relier d'une façon ou d'une autre à une classe particulière de protéases à cystéines; les *cysteine-dependent aspartate-specific proteases* ou caspases. Il existe au moins 14 caspases différentes divisées en 3 groupes. Le groupe I contient les caspases impliquées dans la maturation de cytokines. Le groupe II est composé des principales caspases effectrices; les caspases 2, 3 et 7 et les membres du troisième et dernier groupe comprend les caspases initiatrices 6, 8, 9,10 et 12. Même si leur rôle principal est associé à la maturation de cytokines (caspases du groupe I) ou à l'apoptose (groupe II et III), certaines études ont démontré que ces protéases pouvaient avoir d'autres fonctions dans la cellule (Algeciras-Schimnich *et al.*, 2002a). En effet, des rôles ont été attribués à la caspase-1 dans la migration cellulaire (Antonopoulos *et al.*, 2001), à la caspase-8 dans l'internalisation de récepteur (Algeciras-Schimnich *et al.*, 2002b), la prolifération cellulaire (Kennedy *et al.*, 1999) et la survie cellulaire, par un mode d'action impliquant un domaine différent de celui responsable de sa fonction pro-apoptotique (Chaudhary *et al.*, 2000). Finalement, des rôles ont également été suggérés pour la caspase-3 dans l'inactivation de voie de survie cellulaire liée au facteur NF-kB pour favoriser l'induction d'apoptose (Tang *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2001). Il semble que la compartimentalisation des caspases à l'intérieur des cellules, au moins dans certaines situations particulières, puisse expliquer comment ces protéases peuvent jouer leur rôle accessoire sans nécessairement entraîner le processus d'apoptose (Algeciras-Schimnich *et al.*, 2002a).

Les caspases sont synthétisées dans la cellule sous forme de zymogène, et sont en général composées de quatre domaines différents. Un prodomaine de taille variable selon

la caspase se retrouve en portion amino-terminale. Une grande et une petite sous-unité sont également présentes dans cette forme inactive et sont séparées par une région charnière. Lors du processus d'activation, il y a clivage protéolytique entre les domaines et élimination de la région charnière et du prodomaine. Les grandes et petites sous-unités s'assemblent alors pour former un complexe actif hétérodimérique. En fait, la forme active des caspases comprend habituellement deux hétérodimères interagissant au niveau de la petite sous-unité et représente donc un tétramère où l'on retrouve deux sites catalytiques et chaque site actif est formé par des interactions précises entre acides aminés se retrouvant à la fois dans la grande et la petite sous-unité (Nunez *et al.*, 1998). Bien qu'elles reconnaissent toutes des séquences où se retrouve un acide aspartique en position P1 et qu'elles puissent la plupart du temps cliver à plus d'une site de reconnaissance, les caspases présentent toutes une préférence de substrat optimal. La spécificité de substrat est en bonne partie déterminée par des séquences de quatre acides aminés incluant l'acide aspartique P1; en général, l'acide aminé en P4 est le plus critique car il interagit avec une séquence particulière d'une petite sous-unité du complexe caspase (Thornberry *et al.*, 1997; Nunez *et al.*, 1998).

Lors d'un stimulus pro-apoptotique, plusieurs caspases sont habituellement activées en cascade. Basé sur leur hiérarchie chronologique d'activation dans cette cascade protéolytique, les caspases sont divisées en caspases initiatrices (en amont de la cascade) et caspases effectrices (en aval dans la cascade). Dans de très nombreux cas, le clivage engendré par une caspase mène à l'inactivation de protéines-cibles. Cependant, il peut également mener à une activation; deux exemples très probants sont représentés par (1) l'inter-clivage de plusieurs molécules de caspase 8 menant à leur propre activation lors de l'induction d'apoptose par la voie extrinsèque liée aux récepteurs de mort de la famille *TNF receptor* et (2) le clivage de la caspase 3 soit par la caspase 8 (voie extrinsèque d'apoptose) soit par la caspase 9 comprise dans l'apoptosome, un phénomène lié à la voie apoptotique mitochondriale (Hentgartner, 2000).

7.1.3 Différents stress et différents organites

Il existe différentes voies métaboliques impliquées dans la bonne marche du processus apoptotique. La voie extrinsèque, utilisant différents récepteurs de la famille des récepteurs de mort situés à la membrane cytoplasmique dont les six membres actuellement bien caractérisés sont le récepteur TNF-R1 *TNF-Receptor1* (CD120a), Fas (CD95), DR-3 *Death Receptor3* (APO-3, TRAMP), TRAIL-R1 *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor1* (APO-2, DR4), TRAIL-R2 *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor2* (DR5, KILLER) et DR6 *Death Receptor6* (Sartorius *et al.*, 2001). Au moins dans les cas du TNF-R1 et de Fas, il y a trimérisation des récepteurs suite à leur ligation avec leur ligand trimérique. La suite des événements permet de recruter plusieurs molécules adaptatrices, ce qui en bout de ligne favorise la proximité de molécules de caspase-8 qui interagissent ensemble pour s'activer (Sartorius *et al.*, 2001; Hengartner, 2000).

Selon les plus récentes avancées en matière d'apoptose, la voie intrinsèque menant à la perturbation de l'homéostasie intracellulaire, longtemps assimilée à la seule mitochondrie, pourrait plutôt être associée à plusieurs mécanismes impliquant plusieurs organites cellulaires. Il semble en effet, que différents organites d'une cellule soient capables de détecter certains stress et d'induire une réponse locale pour s'adapter ou un processus menant vers la mort cellulaire, si le stress est trop fort et les altérations qui s'en suivent dépassent un certain seuil de tolérance (Ferri et Kroemer, 2001).

La Figure 2, adaptée de Hengartner (2000), Eldadah et Faden (2000) et Sartorius et collaborateurs (2001), présente de façon succincte les voies principales connues impliquant les caspases. Pour fin de simplification, certaines composantes des différentes voies n'ont pas été incluses dans le schéma afin de ne pas surcharger d'avantage une figure déjà fort complexe.

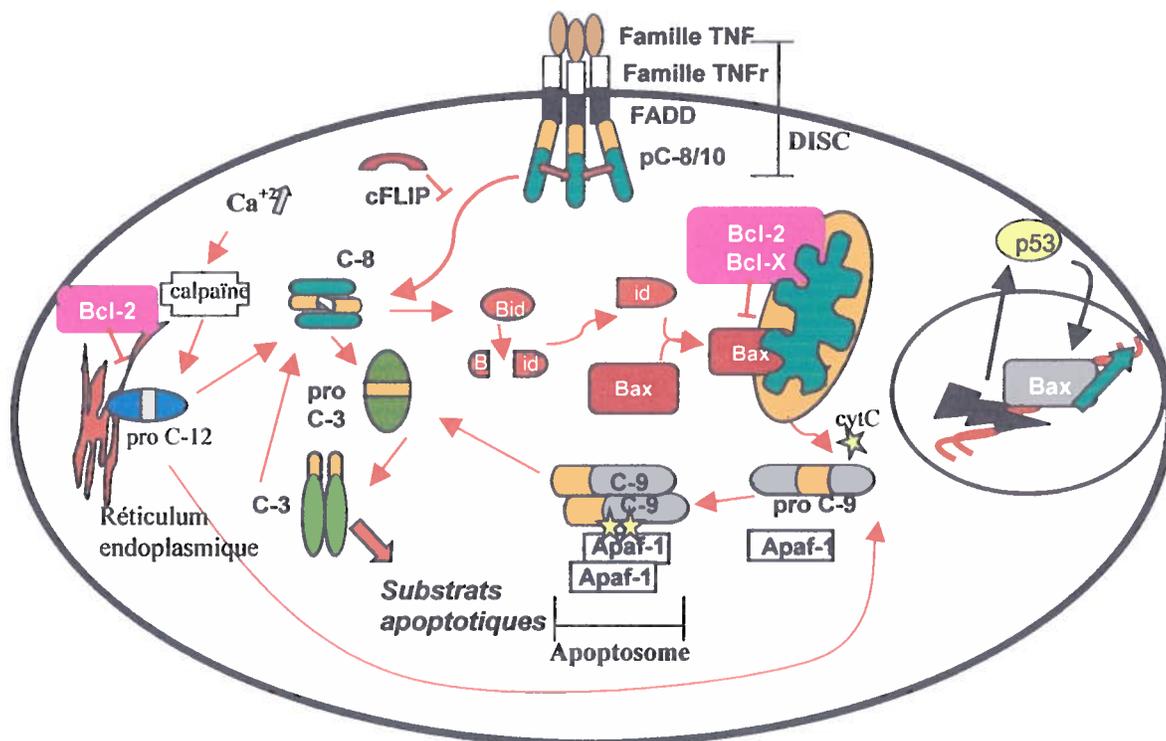


Figure 2. Représentation schématique des principales voies apoptotiques faisant intervenir les caspases.

La voie extrinsèque fait intervenir les récepteurs de mort de la famille TNF. Dans le cas du récepteur TNF-1, la molécule adaptatrice TRADD (*TNFR-associated death domain*) forme le pont entre les récepteurs à la surface cellulaire et FADD (*Fas-associated death domain*). Cette voie permet de recruter plusieurs molécules de caspase-8 dans la même région. L'association de toutes ces molécules entre elles mène à la formation du DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*) et active habituellement la caspase-8 (parfois la caspase-10) qui pourra directement aller activer la caspase-3 dans les cellules de type I. Dans les cellules de type II, une quantité moindre de DISC est formée et l'activation de la caspase-8 mène plutôt au clivage de Bid qui s'associe à Bax et l'entraîne vers la mitochondrie pour activer la voie mitochondriale. La caspase-8 peut-être inhibée par cFLIP, un inhibiteur cellulaire naturel. Il arrive que la caspase-8 soit activée en aval de la caspase-3.

La voie mitochondriale intrinsèque plus classique peut aussi être activée suite à un stimulus venant de l'intérieur de la cellule. Dans cette voie, le facteur transcriptionnel p53 peut être impliqué en augmentant l'expression de Bax qui sera relocalisé vers la mitochondrie où il participe à la formation de pore menant à la libération de facteurs apoptogènes dont le cytochrome C. En présence d'ATP, ce dernier s'associe au facteur Apaf-1 et à la procaspase-9 pour former l'apoptosome qui peut activer la procaspase-3 en caspase-3. La voie impliquant le réticulum endoplasmique est aussi reliée à la voie intrinsèque et implique l'activation de la caspase-12, qui peut être activée par la calpaïne suite à une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire. La caspase-12 peut jouer un rôle pour activer les caspases –8 et –9.

Dans tous les cas, la voie finale d'activation de la caspase-3 peut avoir des intermédiaires mais mène inévitablement à l'apoptose suite au clivage de nombreux substrats et à la fragmentation de l'ADN. Les facteurs antiapoptotiques Bcl-2 et Bcl-X inhibent l'activation de la voie mitochondriale et Bcl-2 peut aussi altérer l'activation de la caspase-8.

Quel que soit le type de stress occasionné, les symptômes de changements morphologiques et biochimiques ultimes lié à l'apoptose sont souvent les mêmes. Cet état de fait a mené à l'élaboration du concept « d'exécuteur central » par lequel sont intégrés les diverses voies initiatrices d'apoptose pour ultimement mener à l'activation des caspases et à la perméabilisation des membranes interne et externe de la mitochondrie (Ferri et Kroemer, 2001).

Le noyau représente le premier organite où l'on a pu mettre en évidence une machinerie capable de sentir un stress pouvant mener à l'apoptose. Certaines kinases, dont la protéine kinase dépendante de l'ADN ou *DNA-PK* (*DNA-dependent protein kinase*) et l'ATM (*Ataxia teleangiectasia mutated*) détectent les brisures dans l'ADN et démarrent une cascade de réactions menant à la phosphorylation et la stabilisation du facteur transcriptionnel p53 (Ashcroft et Vousden, 1999). En situation normale, p53 est présent en très faible quantité principalement dans le cytosol. Suite à sa phosphorylation, la demi-vie de p53 passe de 20-30 minutes à environ 5-6 heures et la protéine passe du cytosol vers le noyau (Jimenez *et al.*, 1999; May et May, 1999). Cette situation pourra contribuer à induire un processus apoptotique qui mènera à la perméabilisation éventuelle de la mitochondrie en activant entre autre l'expression du facteur pro-apoptotique Bax et en inhibant l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-2 (Vogelstein *et al.*, 2000).

Le réticulum endoplasmique (RE) peut également participer à l'induction d'apoptose dans une cellule par deux mécanismes différents. Le premier de ces mécanismes, nommé *Unfolded Protein Response* (UPR), est en fait une réponse liée à une accumulation trop importante de protéines souvent mal repliée à l'intérieur du RE. Ces protéines mal repliées peuvent entre autre s'associer à la chaperone Bip/Grp78, ce qui mènera éventuellement à une induction d'apoptose en favorisant entre autre l'expression du facteur transcriptionnel CHOP/GADD-153 qui inhibe l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-2. Une perméabilisation éventuelle possible de la mitochondrie surviendra et mènera à l'activation de plusieurs caspases (Ferri et Kroemer, 2001). Le second mécanisme d'induction d'apoptose passant par le RE est lié à l'activation de la caspase-12. Suite à une accumulation importante de calcium, cette

caspase, située du côté cytoplasmique du RE, est clivée et activée par la calpaïne I et pourra par la suite aller activer les caspase-8 et 9 (Jimbo *et al.*, 2003). Comme le système UPR, ce second mécanisme de signalisation pouvant mener à une induction d'apoptose contrôlée par le RE est contrôlé par des chaperones dont la Bip/Grp78. C'est donc dire qu'il y a chevauchement dans le contrôle des deux voies de régulation de l'apoptose liée au RE (Oyadomari *et al.*, 2002; Ferri et Kroemer, 2001).

L'appareil de Golgi est actuellement « sous observation » quant à sa possible participation à la régulation de l'apoptose. Plusieurs facteurs connus pour leur implication dans la régulation de l'apoptose se retrouvent en effet en grande quantité à la membrane de cet organite. Parmi ceux-ci, on retrouve la caspase-2, le récepteur à TNF 1, Fas, les récepteurs pour TRAIL 1 et 2, ainsi que la GD3 synthétase, une enzyme impliquée dans la transformation des céramides en gangliosides avant leur translocation vers la mitochondrie où ils peuvent participer à la perméabilisation de la membrane (Ferri et Kroemer, 2001).

Les lysosomes peuvent également être associés à la régulation de l'apoptose (Brunk *et al.*, 2001). Les cathepsines représentent une famille de protéases se retrouvant en bonne partie à l'intérieur de ces lysosomes. On compte au moins une douzaine de membres divisés, comme les caspases, en trois groupes distincts. Les cathepsines A et G représentent le groupe des sérine protéases, les cathepsines B, C, H, K, L, S et T, celui des cystéines protéases, et les cathepsines D et E forment le groupe des aspartate protéases. Toutes les cathepsines ont aussi en commun avec les caspases le fait d'être synthétisées sous forme de zymogène et d'être activées par clivage protéolytique. Le lien entre apoptose et lysosomes paraît surtout probable par l'entremise des cathepsines B et D (Johnson, 2000). Il appert que suite à un stress provenant de l'intérieur de la cellule ou suite à la liaison d'un ligand de la famille TNF à son récepteur au niveau de la membrane cellulaire, ces deux protéases (cathepsines B et D) peuvent être transloquées de l'intérieur des lysosomes vers le cytoplasme (Johnson, 2000; Leist et Jäättelä, 2001). De là, elles semblent pouvoir cliver certains facteurs régulateurs d'apoptose dont la protéine Bid, habituellement clivée par la caspase-8 dans de nombreux modèles (Stoka *et al.*, 2001). Les cathepsines pourraient toutefois aussi agir en utilisant d'autres voies

(Houseweart *et al.*, 2003). D'autres facteurs lysosomiaux semblent aussi pouvoir agir dans la régulation de l'apoptose sans que les cathepsines soient directement impliquées même si elles sont rapidement transloquées vers le cytoplasme lors du processus (Boya *et al.*, 2003a; 2003b).

7.1.4 La mitochondrie : Un organe central dans la régulation de l'apoptose

Tel que présenté auparavant, de très nombreux signaux pro-apoptotiques convergent au niveau de la perméabilisation de la mitochondrie et affectent différemment les deux membranes mitochondriales. En général, la membrane externe devient perméable à une multitude de protéines alors que la membrane interne, bien que continuant de retenir les protéines de la matrice mitochondriale, peut subir des modifications menant à une modulation du potentiel transmembranaire. Un nombre impressionnant de facteurs, pour la plupart protéiques, impliqués dans divers mécanismes de régulation de l'apoptose liée à la mitochondrie peuvent (1) être transloqués vers la mitochondrie, (2) résidés dans les membranes mitochondriales ou (3) être expulsés hors de cet organe, en général vers le cytosol ou même le noyau, suite à un stimulus proapoptotique (Ferri et Kroemer, 2001).

Différents facteurs peuvent directement être relocalisés vers la mitochondrie ou tout au moins avoir un effet sur cet organe. Les céramides représentent le squelette hydrophobe des sphingolipides complexes, tels la sphingomyéline, les cérébrosides et les gangliosides. Ils sont générés lors de différents stimuli pro-apoptotiques, dont certaines infections virales, soit par hydrolyse de la sphingomyéline par 7 différentes sphingomyélinases, ou encore par synthèse *de novo* par la céramide synthétase (Tomassini et Testi, 2002). La voie extrinsèque d'induction d'apoptose liée aux récepteurs de mort représente un cas classique menant à la formation de céramides et à leur transformation possible en ganglioside GD3, une molécule reconnue pour son pouvoir pro-apoptotique important (DeMaria *et al.*, 1998) lorsque relocalisé au niveau de la membrane interne de la mitochondrie où il peut causer l'ouverture du *permeability transition pore* PTP (Tomassini et Testi, 2002).

Plusieurs des facteurs relocalisés vers la mitochondrie lors d'un stimulus pro-apoptotique sont toutefois de nature protéique. Parmi ces facteurs, la protéine Bax, un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2, est transloqué vers la mitochondrie lors de l'induction d'apoptose (Goping *et al.*, 1998; Wolter *et al.*, 1997). En condition normale, Bax est une protéine cytosolique qui, suite à une modification conformationnelle exposant certains domaines particuliers, passe du cytosol à la mitochondrie de façon rapide et importante (Roucou et Martinou, 2001). Une interaction avec le facteur Bid, un autre membre de la famille Bcl-2 des régulateurs d'apoptose, préalablement clivé, représente un mécanisme dépendant des caspases menant à la translocation de Bax (Li *et al.*, 1998). D'autre part, la modification du pH cytoplasmique (Tafani *et al.*, 2002; Khaled *et al.*, 1999), la présence de céramides (von Haefen *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2001) ou les deux phénomènes à la fois (Belaud-Rotureau *et al.*, 2000) ou encore l'accumulation d'un métabolite important des céramides, le ganglioside GD3, sont tous des mécanismes pouvant mener à la modification conformationnelle et à la translocation de Bax du cytosol vers la mitochondrie sans nécessiter l'action de caspases. De plus, la protéine Akt, une kinase impliquée dans des voies de survie cellulaire liées aux facteurs de croissance, peut également avoir un rôle à jouer dans la prévention de la translocation de Bax vers la mitochondrie (Karpinich *et al.*, 2002) en prévenant le changement de conformation de Bax (Yamaguchi et Wang, 2001).

Une fois à la mitochondrie, il est suggéré que Bax peut former des oligomères, avec lui-même et avec le facteur Bak (Sundararajan et White, 2001) qui lui réside dans la membrane externe de la mitochondrie. Il semble que ce processus d'oligomérisation survienne en une deuxième phase distincte de la simple translocation de Bax à la mitochondrie et seulement lorsque Bax n'est plus présent au cytosol (Capano et Crompton, 2002).

En plus de recevoir plusieurs facteurs en provenance des autres compartiments cellulaires et d'avoir plusieurs facteurs anti-apoptotiques intégrés dans sa membrane externe, la mitochondrie semble être un réservoir pour une multitude de protéines apoptogènes résidant dans l'espace intermembranaire. Certains de ces facteurs pourront être expulsés lors d'un stress pro-apoptotique. Le cytochrome C, la protéine

Smac/Diablo (*second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein*), le facteur AIF (*Apoptosis Inducing Factor*), l'endonucléase G, Omi/HtrA2, et même, dans certains types cellulaires, les procaspases 2, 3, 8 et 9, sont autant de ces protéines. De ce point de vue, il est aisé d'attribuer à la mitochondrie un rôle de plaque-tournante, intégrant de nombreux différents stimuli pro-apoptotiques pour relayer en aval les signaux adéquats afin de mettre en oeuvre la bonne marche de l'apoptose lorsque cela est nécessaire. (Mayer et Oberbauer, 2003; Parone *et al.*, 2002)

De façon générale, la perméabilité de la membrane externe de la mitochondrie est contrôlée par les différents membres de la famille Bcl-2. Les facteurs anti-apoptotiques tel Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1 et Bcl-B (Mayer et Oberbauer, 2003), se retrouvent habituellement intégrés aux membranes de la mitochondrie, du RE ainsi que du noyau par leur domaine hydrophobe situé dans leur portion carboxy-terminale. En contrepartie, plusieurs facteurs pro-apoptotiques de la grande famille Bcl-2, dont Bax et les protéines Bid, Bad et Bim sont plutôt présentes sous forme soluble dans le cytosol ou très lâchement associées aux membranes. Après un stress, les facteurs pro-apoptotiques subissent des changements conformationnels et peuvent être transloqués vers la mitochondrie. (Martinou et Green, 2001)

La façon précise dont les protéines apoptogènes résidentes de l'espace intermembranaire mitochondrial sont relarguées hors de la mitochondrie demeure inconnue. Bien que plusieurs questions demeurent, il existe différents modèles non mutuellement exclusifs pour expliquer ce processus complexe. En fait, il semble logique de penser que la séquence d'événements ou la mise en place des événements menant à la perméabilité membranaire de la mitochondrie (*mitochondrial membrane permeabilization; MMP*) eux-mêmes, varie selon les différents stimuli proapoptotiques et peut-être selon le type cellulaire.

Le modèle des canaux, décrit la formation de canaux autonomes dans la membrane mitochondriale externe par des membres proapoptotiques de la famille Bcl-2, en particulier Bax et Bak, qui peuvent s'oligomériser et former des pores assez gros pour laisser passer le cytochrome C vers l'extérieur de la mitochondrie (Parone *et al.*, 2002). Certaines protéines de la famille Bcl-2 peuvent également recruter d'autres protéines

mitochondriales capables de s'associer pour former des pores. Ici Bax semble jouer un rôle proapoptotique en s'associant au *voltage-dependent anion channel* (VDAC) (Shimizu *et al.*, 2000a), alors que Bcl-2 peut prévenir l'apoptose en empêchant l'ouverture du canal formé de Bax et du VDAC (Shimizu *et al.*, 2000b).

La formation du fameux PTP (*permeability transition pore*) peut éventuellement aussi survenir au niveau de la membrane externe mitochondriale. Cette structure complexe est en fait un mégacanal formé par l'association du VDAC, du *adenine nucleotide translocator* (ANT) et de la cyclophiline D ainsi que de plusieurs autres protéines dont certaines de la famille Bcl-2 (Parone *et al.*, 2002). Suite à la formation du PTP, il y aurait entrée massive d'eau et de solutés au niveau de la matrice mitochondriale (Crompton, 1999) ce qui entraîne un gonflement de la matrice mitochondriale et une expansion excessive de la membrane interne pouvant même entraîner une rupture de la membrane externe (Parone *et al.*, 2002; Martinou et Greene, 2001). En bout de compte, les facteurs apoptogènes présents dans l'espace intermembranaire peuvent être libérés vers le cytosol (Mayer et Oberbauer, 2003; Parone *et al.*, 2002). Même s'il demeure possible, le modèle suggérant une rupture véritable de la membrane externe est toutefois questionné par des études morphologiques (Martinou *et al.*, 1999; Kluck *et al.*, 1999) où la membrane externe n'est pas rompue. Il est aussi suggéré que les facteurs apoptogènes puissent passer vers le cytosol par les mégacanaux que forme le PTP (Mayer et Oberbauer, 2003).

De plus, à l'aide d'un système simplifié acellulaire utilisant des membranes mitochondriales, il a été démontré que Bax pourrait, lorsque associé à la forme tronquée de Bid, s'insérer dans la membrane de la mitochondrie riche en cardiolipine, un lipide spécifique à cet organite, et former des pores pouvant aisément laisser passer diverses molécules de grande taille de l'espace intermembranaire vers le cytosol sans rupture de membrane; un modèle peut-être plus prêt de la réalité (Zamzani et Kroemer, 2003; Kuwana *et al.*, 2002).

L'intégrité membranaire de la mitochondrie préservée par certains membres antiapoptotiques de la famille Bcl-2 dont entre autre Bcl-XL, pourrait aussi participer de façon importante à empêcher l'induction d'apoptose reliée à la mitochondrie. En effet, il

appert qu'un des rôles importants de BclXL soit d'assurer que le VDAC demeure dans une conformation où il peut assurer un transport d'ATP de la matrice mitochondriale vers le cytosol (Vander Heiden *et al.*, 2001). Si un membre proapoptotique de la famille Bcl-2 s'associe au VDAC, il pourra y avoir accumulation d'ATP à l'intérieur de la mitochondrie ce qui mènera à un mauvais fonctionnement de ANT et à l'entrée d'eau et de solutés avec les mêmes conséquences élaborées plus avant (Mayer et Oberbauer, 2003).

Des changements de pH cellulaire et de potentiel membranaire au niveau de la membrane mitochondriale interne peuvent aussi mener à une apoptose reliée à la voie mitochondriale (Mayer et Oberbauer, 2003). Les mitochondries maintiennent habituellement un gradient électrochimique ($\Delta\psi$) à travers leur membrane interne en pompant des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. La dépolarisation de la membrane interne mitochondriale et la perte du gradient ($\Delta\psi$) ou l'hyperpolarisation associée à une alcalinisation de la matrice mitochondriale et à une acidification du cytosol représentent des phénomènes pouvant être associés à l'induction d'apoptose. Ce dernier point paraît toutefois paradoxal puisque, comme mentionné auparavant, l'insertion au niveau de la membrane externe mitochondriale de certains membres proapoptotiques de la famille Bcl-2, dont Bax, semble facilitée par une alcalinisation du milieu cytosolique (Mayer et Oberbauer, 2003; Matsuyama et Reed, 2000).

Enfin, un nouveau mécanisme potentiel pouvant peut-être mener à la MMP fait référence à une co-localisation au niveau de la membrane externe mitochondriale (Karbowski *et al.*, 2002) de Bax et des protéines Drp-1 (*Dynamaminrelated protein 1*), impliquée dans la fission du réseau mitochondrial en conditions physiologiques lors de la mitose et lors de processus pathologiques lors de l'induction d'apoptose (Frank *et al.*, 2001) et Mfn2 (*mitofusin 2*), responsable du processus de fusion des mitochondries en réseau lors de l'interphase (Santel et Fuller, 2001). De plus, la surexpression de Bax favorise la fission mitochondriale associée à l'apoptose et l'expression ectopique d'une protéine Drp-1 mutante (*dominant negative*) protège les cellules contre l'apoptose. Toutefois, la fonction de Drp-1 et de Mfn 2 demeure spéculative quant à la capacité de Bax à s'insérer dans la membrane pour y former des pores, puisque le rôle direct de la

fission du réseau mitochondrial dans le phénomène d'induction d'apoptose reste à prouver (Newmeyer et Ferguson-Miller, 2003).

Quoiqu'il en soit, la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et la libération des facteurs apoptogènes nommés plus avant, mène la plupart du temps à l'activation de la machinerie des caspases qui sera suivi de l'apparition de changements morphologiques caractéristiques de l'apoptose dont il a été fait mention au début de cette section.

Malgré le rôle central que jouent les caspases dans la phase d'exécution de l'apoptose, il existe des voies métaboliques où l'apoptose se met parfois en branle sans que ces protéases soient impliquées ou alors qu'elles le sont en conjonction avec d'autres facteurs. L'exemple des cathepsines lysosomiales, décrit auparavant, est assez éloquent. Les calpaïnes, représentent un autre groupe de protéases à cystéine formé d'une douzaine de membres. Les plus connues sont la μ -calpaïne ou calpaïne I, activée par de faible concentration (μM) de calcium libre dans la cellule et la m-calpaïne ou calpaïne II, activée par des concentration plus élevée (mM) de calcium libre. Toutes deux sont exprimées de façon ubiquitaire (Huang et Wang, 2001; Johnson, 2000). Lors de certains traumatismes cérébraux, les calpaïnes I et II peuvent participer au processus apoptotique et agir en synergie avec la caspase-3 (Blomgren *et al.*, 2001; Wang, 2000). De plus, il a été démontré que les calpaïnes peuvent jouer un rôle important dans l'induction d'apoptose lors d'infections virales (DeBiasi *et al.*, 2001; 1999)

Comme la caspase-3, les calpaïnes sont activées par clivage et peuvent cliver une panoplie de substrat. Les deux types de protéases clivent souvent les mêmes substrats mais à des sites spécifiques différents. De nombreuses protéines du cytosquelette, dont en particulier l' α -spectrine, subissent souvent les foudres de la caspase-3 et des calpaïnes simultanément (Wang, 2000). Suite à une activation liée à une importante augmentation de la concentration intracellulaire de calcium dans la cellule, les calpaïnes I et II peuvent également cliver la caspase-12 et initier un processus apoptotique suite à un stress lié au RE (Nakagawa et Yuan, 2000). Il a également été démontré que les calpaïnes pouvaient être redistribuées vers la mitochondrie suite à l'exposition de cellules à la camptothécine (CPT), un inhibiteur de la topoisomérase I impliqué dans la réplication de l'ADN, et

utilisé comme agent chimiothérapeutique (Wood *et al.*, 1998). Au niveau de la membrane mitochondriale, les calpaïnes peuvent cliver le facteur Bax, augmentant ainsi son pouvoir pro-apoptotique de façon importante (Wood et Newcomb, 2000)

En plus des différentes familles de protéases décrites jusqu'ici, certains autres facteurs ont un pouvoir apoptogène important. Parmi ceux-ci, AIF (*Apoptosis Inducing Factor*), l'endonucléase G, ainsi que les protéines Smac/Diablo et HtrA2/Omi, deux protéines pouvant inactiver les inhibiteurs cytosoliques naturels de caspases que sont les IAP (*Inhibitors of Apoptosis Proteins*), représentent des facteurs issus de la mitochondrie ayant un rôle dans l'induction de l'apoptose (Ravagnan *et al.*, 2002). Smac/Diablo et HtrA2/Omi fonctionnent en collaboration avec les caspases -3 et -9. D'autre part, AIF est une oxidoréductase qui passe de la mitochondrie au noyau suite à la perméabilisation mitochondriale. Une fois au noyau, AIF induit un processus apoptotique indépendant des caspases en engendrant une condensation de la chromatine ainsi qu'un clivage de l'ADN en fragment d'environ 50 kpb (Candé *et al.*, 2002; Ravagnan *et al.*, 2002). Comme le facteur AIF, l'endonucléase G peut passer de la mitochondrie vers le noyau suite à un stimulus pro-apoptotique. Au noyau, cette nucléase est capable de couper l'ADN en fragments oligonucléosomals caractéristiques, même en présence d'inhibiteurs de caspases (Ravagnan *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2001).

D'autre part, p53 et Nur77, deux protéines plutôt connues pour leur rôle en tant que facteur transcriptionnel, peuvent être relocalisées à la mitochondrie. Il semble en effet possible de retrouver la protéine p53 au niveau de la mitochondrie où elle peut participer à l'induction d'apoptose. Toutefois, il appert que cette situation ne survient que lors d'induction d'apoptose dépendante de p53; soit lorsque p53 agit également comme facteur de transcription. Une accumulation de p53 à la membrane mitochondriale semble participer directement à l'activation de la cascade des caspases en aval et il semble clair que cette fonction ne dépend pas de son rôle classique de facteur transcriptionnel (Parone *et al.*, 2002; Marchenko *et al.*, 2000). Ce rôle de p53 semble plus important pour le variant naturel dont l'acide aminé 72 est une arginine plutôt qu'une proline (Dumont *et al.*, 2003). La protéine Nur77 (TR3) peut également se retrouver à la mitochondrie. Suite à un dommage induit à l'ADN, ce récepteur nucléaire

peut effectivement passer de la membrane nucléaire à celle de la mitochondrie, où il engendre la libération de cytochrome c vers le cytosol (Parone *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2000). Nombreuses sont donc les molécules qui peuvent se voir relocalisées à la mitochondrie et participer au déroulement de l'apoptose, la protéine kinase C δ en est une autre (Majumder *et al.*, 2000).

La Figure 3, adaptée de Brenner et Kroemer (2000) et de Parone et collaborateurs (2002), donne un aperçu bref et concis de tous les facteurs pouvant influencer l'apoptose régulée par la mitochondrie.

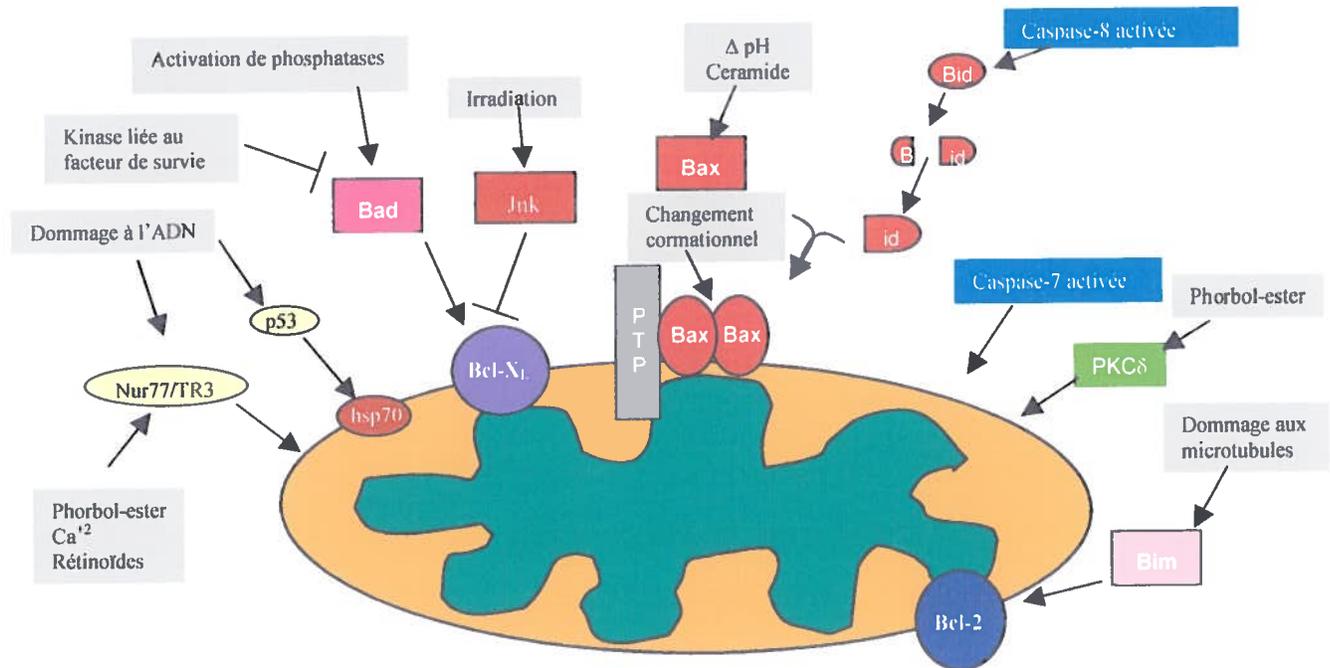


Figure 3. Les différentes molécules relocalisées vers la mitochondrie durant l'apoptose

De nombreuses et différentes molécules peuvent être relocalisées à la mitochondrie suite à une panoplie de stimuli pro-apoptotiques et avoir un effet sur la régulation de la voie apoptotique mitochondriale.

7.2 Importance de l'apoptose dans l'organisme

À l'intérieur d'un organisme, les cellules en processus d'apoptose, peuvent être phagocytées par différentes cellules possédant cette capacité, et dans cette tâche les macrophages semblent être passés maîtres. Ce processus de phagocytose de cellules apoptotiques survient de façon assez rapide et sans induction de réponse inflammatoire (Krieser et White, 2002). Des interactions entre molécules particulières à la surface de la cellule apoptotique et de la cellule phagocytaire sont essentielles lors du processus. Par

exemple, le récepteur CD14, présent à la surface de macrophages, peut interagir avec la molécule d'adhésion ICAM-3 (*Intercellular adhesion molecule -3*) modifiée présente à la surface des leucocytes apoptotiques (Moffatt *et al.*, 1999). Le récepteur MER, un membre de la famille des tyrosines kinases exprimé à la surface des macrophages, joue également un rôle pour reconnaître les thymocytes en apoptose en interagissant probablement avec la molécule Gas-6, qui elle, lie la phosphatidylsérine (PS) à la surface des cellules en apoptose (Scott, *et al.*, 2001; Krieser et White, 2002). La PS est un phospholipide demeurant habituellement du côté intracellulaire de la membrane plasmique d'une cellule grâce à une enzyme, l'aminophospholipide translocase, qui génère et maintient l'assymétrie membranaire d'une cellule (Bever *et al.*, 1998; 1999). Suite à une induction d'apoptose, la translocase cesse de fonctionner et il y a translocation importante de PS vers le côté extracellulaire de la membrane plasmique. Les cellules arborant cette PS à leur surface sont reconnues par un récepteur particulier à la surface des phagocytes (Fadok *et al.*, 2000). Cette voie, impliquant directement la PS, semble particulièrement importante dans tout le processus car elle est associée à l'inhibition de production de cytokines pro-inflammatoires (Fadok *et al.*, 1998; Huynh *et al.*, 2002).

Le portrait du processus de reconnaissance et de phagocytose des cellules en apoptose *in vivo*, continue de se préciser et il apparaît maintenant qu'il nécessite plusieurs joueurs dont l'action est coordonnée. Il est maintenant reconnu que le complément peut opsoniser les cellules apoptotiques et permettre leur phagocytose plus rapide et plus efficace afin d'éliminer tout risque de réponse inflammatoire due à une nécrose secondaire (Fishelson *et al.*, 2001). De plus, le récepteur CD36 (*Scavenger receptor B1*) principalement exprimé à la surface des macrophages, mais aussi à la surface de certaines cellules en apoptose, permet d'augmenter la capacité phagocytaire (Ren *et al.*, 1995) et joue également un rôle de reconnaissance réciproque entre les phagocytes et leur proie (Moodley *et al.*, 2003). La thrombospondine (TSP1) sécrétée entre autres par des fibroblastes apoptotiques afin de recruter des macrophages et faciliter leur phagocytose est également associée à ce processus complexe de reconnaissance impliquant le récepteur CD36 (Moodley *et al.*, 2003). En bout de ligne,

la reconnaissance spécifique des cellules apoptotiques est donc assurée et leur phagocytose permet à l'organisme de s'en débarrasser tout en empêchant la mise en place d'une réponse inflammatoire complexe lorsque ce n'est pas nécessaire.

Toutefois, il peut y avoir induction d'apoptose lors d'une réponse inflammatoire. En effet, comme mentionné dans une section précédente, les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et les cellules NK peuvent tuer les cellules infectées par un virus en utilisant ce mécanisme. D'une part, la stimulation de la cascade apoptotique initiée par les récepteurs de mort, en particulier la voie utilisant Fas, peut être utilisée par les cellules effectrices (Barry et Bleackley, 2002; Johnson, 2000). Néanmoins, un second système semble plus utilisé par les CTL et les NK afin d'induire l'apoptose chez les cellules infectées. Ce mécanisme « d'exocytose de granules » implique le transfert des molécules apoptogènes, que sont la perforine et certains granzymes, contenues dans des granules cytoplasmiques des cellules effectrices à l'intérieur des cellules cibles (Barry et Bleackley, 2002).

Bien qu'il soit clair que la perforine serve à faciliter l'entrée de granzymes, en particulier les A et B, elle semble jouer ce rôle de diverses façons. En effet, on a longtemps cru que la perforine, en se polymérisant, pouvait former des pores dans la membrane des cellules cibles afin de laisser passer les granzymes à l'intérieur (Smyth *et al.*, 2001). Cette fonction demeure vraisemblable mais un second mécanisme semble possible. En bref, le récepteur pour le mannose-6-phosphate a été récemment identifié comme un récepteur utilisé par le granzyme B afin de pénétrer dans les cellules cibles par endocytose (Trapani et Smyth, 2002). Dans cette situation, la perforine semblerait plutôt agir en formant des pores dans la membrane des endosomes où se retrouve les granzymes B suite à leur endocytose. D'autre part, en induisant des dommages à la membrane, la perforine pourrait aussi aider à l'entrée du granzyme B dans les cellules cibles (Barry et Bleackley, 2002; Trapani et Smyth, 2002). Une fois à l'intérieur des cellules cibles, le granzyme B peut jouer un rôle très similaire aux caspases en clivant plusieurs substrats au niveau d'un résidu d'acide aspartique à l'intérieur d'une séquence particulière de reconnaissance. Les caspases -3 et -8 représentent des substrats

importants du granzyme B dans le processus d'induction d'apoptose (Barry et Bleackley, 2002).

Bien qu'essentielle dans la régulation de plusieurs processus importants visant l'homéostasie générale de l'organisme, l'apoptose représente aussi un phénomène particulièrement répandu lors de l'infection par bon nombre de virus.

7.3 Infection virale et déclenchement de l'apoptose

Un très grand nombre de virus induisent le déclenchement de l'apoptose chez les cellules qu'ils infectent (Roulston *et al.*, 1999). Dans de rares cas, il semble que ce processus, s'il est induit tardivement dans le cycle de réplication virale, puisse mener à une meilleure propagation de particules virales, ce qui est à l'avantage du virus; cette situation particulière est entre autre suggérée pour le VIH (Teodoro et Branton, 1997a; Strack *et al.*, 1996). De plus, l'apoptose pourrait entre autre servir à limiter la réaction inflammatoire, ce qui serait, au moins dans certains cas, bénéfique pour le virus (Teodoro et Branton, 1997a). Dans de plus nombreux cas, l'apoptose se présente plutôt comme un processus primitif de défense antivirale (Allsopp *et al.*, 1998), permettant de limiter la propagation du virus (Barber, 2001) ou au mieux que les cellules infectées soient adéquatement et rapidement éliminées avec un minimum de dommage dans les tissus environnants (Koyama *et al.*, 2000).

7.3.1 Infection virale du SNC et induction d'apoptose

Plusieurs virus peuvent atteindre le SNC et parmi ceux-ci, certains, dont VSV, sont habituellement hautement cytopathiques. Dans beaucoup de cas où un virus cytopathique détruit directement des cellules du SNC, il le fait par apoptose (Anderson, 2001). L'utilisation de modèles animaux a d'ailleurs permis de mettre en évidence la capacité de quelques virus à ADN, en particulier les herpesvirus, et de plusieurs virus à ARN d'au moins 9 familles différentes à induire ce processus dans les neurones. Dans la majorité des cas, des types bien particulier de neurones sont visés et font partie de régions bien circonscrites. L'induction d'apoptose y est habituellement directement associée à l'infection par le virus de même que la neurovirulence et la neuropathologie

(Levine, 2001b). C'est d'ailleurs le cas pour VSV lorsque le virus est administré par voie intranasale chez la souris (Sur *et al.*, 2003).

L'apoptose de cellules du SNC peut toutefois avoir un rôle de protection dans l'organisme, notamment en évitant qu'un virus puisse établir une infection persistante. Bien que la perte de neurones puisse engendrer des conséquences très néfastes pour l'organisme, l'incapacité de certains neurones à induire un mécanisme d'apoptose efficace peut faire de même (Levine, 2001b). Plusieurs problèmes reliés au développement d'infections virales persistantes au SNC demeurent encore à ce jour hypothétiques. Toutefois, comme il a été mentionné à plusieurs reprises dans le présent texte, de plus en plus d'études laissent sérieusement envisager que la persistance virale au SNC puisse être associée à de nombreuses pathologies neurodégénératives, dont certaines sont démyélinisantes, comme la sclérose en plaques. En fait la perte d'une quantité limitée de neurones engendrera très probablement des problèmes à court terme mais il est aussi établi qu'une infection à long terme mènera vraisemblablement vers différents problèmes. Parmi ceux-ci, la mort ou la dysfonction neuronale, des pathologies d'ordre immunitaire et, si des régions vitales du cerveau sont touchées de façon trop importante, la mort de l'individu (Liebert, 2001).

Donc, il est largement admis que l'apoptose soit un mécanisme de défense pour l'organisme. Il est connu que certains virus réussissent à la manipuler à leur avantage. Dans cette vision des choses, selon le type cellulaire ou le tissu où il se retrouve, il peut être profitable au virus de réprimer l'apoptose, par exemple pour maintenir une infection persistante, alors que dans certains cas, le déclenchement de l'apoptose par le même virus, servira à sa meilleure propagation (Roulston *et al.*, 1999; Miller et White, 1998).

Au même titre que les différents mécanismes permettant d'échapper au système immunitaire, la capacité de moduler l'apoptose, représente un mécanisme que plusieurs virus ont élaboré et raffiné de plusieurs façons afin de leur permettre d'établir et de maintenir une infection persistante.

7.4 Virus régulateurs d'apoptose

Un nombre important de virus peuvent moduler l'apoptose. Tous possèdent des protéines spécifiques qui peuvent être classées en catégorie selon leur type de fonctionnement. Une liste de quelques virus connus pour induire ou inhiber l'apoptose par l'entremise de certaines de leurs protéines, peut être établie et permet d'entrevoir la complexité de la chose. Le Tableau 8.A qui suit, inspiré de Roulston et collaborateurs (1999) et de Hay et Kannourakis (2002), et remis à jour, présente des exemples choisis de virus induisant l'apoptose en indiquant le facteur viral impliqué dans le mécanisme ainsi qu'une brève description du mécanisme cellulaire perturbé. Le Tableau 8.B présente plutôt des exemples de virus pouvant inhiber le processus apoptotique de diverses façons. Le facteur viral impliqué dans cette altération et le mécanisme par lequel il y a interférence avec l'induction d'apoptose sont brièvement décrits.

Tableau 7.A- Virus et protéines virales impliqués dans l'induction d'apoptose

VIRUS	PROTÉINE	FONCTION	RÉFÉRENCE
Adénovirus	E1A	Active p53	Debbas et White, 1993
		Augmente sensibilité à l'apoptose liée au TNF	Duerksen-Hughes <i>et al.</i> , 1989
	E4orf4	Active PP2A et induit directement l'apoptose	Marcellus <i>et al.</i> , 1998
Papillomavirus	E7	Active p53	Howes <i>et al.</i> , 1994
EBV	EBNA3C	Se lie pRb et induit progression du cycle cellulaire	Parker <i>et al.</i> , 1996
	EBNA1	Lorsque exprimé sans aucun autre facteur viral en latence	Gregory <i>et al.</i> , 1991
Hépatite B	HBx	Augmente activité de p53 et c-myc	Chirillo <i>et al.</i> , 1997
		Interagit avec VDAC	Rahmani <i>et al.</i> , 2000
VIH-1	Tat	Augmente l'expression de Fas-L	Westendorp <i>et al.</i> , 1995
	Vpr	Induit arrêt du cycle cellulaire (G2) Interagit avec ANT	Stewart <i>et al.</i> , 1997 Jacotot <i>et al.</i> , 2000
	gp160	Augmente la concentration de Ca ²⁺ intracellulaire	Sasaki <i>et al.</i> , 1996
Virus forêt Semliki	NS	Non déterminé	Scallan <i>et al.</i> , 1997
Virus Sindbis	E1, E2	Augmente l'activité de NF-kB (neurones)	Ubol <i>et al.</i> , 1994 Joe <i>et al.</i> , 1998
Hépatite C	Core	S'associe au domaine cytoplasmique du récepteur de TNF	Zhu <i>et al.</i> , 1998
NDV	HN	Induit production d'IFN et expression de TRAIL	Zeng <i>et al.</i> , 2002
Influenza	Non identifiée	Augmente l'expression de Fas	Takizawa <i>et al.</i> , 1996
Réovirus	σ1 et M2	Active JNK et phosphoryle c-Jun	Clarke <i>et al.</i> , 2001
Rage	glycoprotéine G	Non déterminé	Faber <i>et al.</i> , 2002
VSV	M	Non déterminé	Kopecky <i>et al.</i> , 2001 Desforges <i>et al.</i> , 2002
	Non identifiée	Non déterminé	Kopecky et Lyles, 2003

Tableau 7.B- Virus et protéines virales impliqués dans l'inhibition d'apoptose

VIRUS	PROTÉINE	FONCTION	RÉFÉRENCE
Vaccinia	E3L	Inhibe PKR et RNase L dans voie de réponse à l'IFN	Davies <i>et al.</i> , 1997
	K3L	Inhibe PKR dans voie de réponse à l'IFN	Davies <i>et al.</i> , 1997
	B13R	Serpine : Inhibiteur de caspase	Kettle <i>et al.</i> , 1997
Cowpox	CrmA	Serpine : Inhibiteur de caspase	Tewari <i>et al.</i> , 1995
	CrnB	Homologue de récepteur TNF	Hu <i>et al.</i> , 1994
	CrnC	Homologue de récepteur TNF	Upton <i>et al.</i> , 1991
Myxoma virus	MT-2	Homologue de récepteur TNF	Schreiber <i>et al.</i> , 1996
	Serp-2	Serpine : Inhibiteur de caspase	Messud-Petit <i>et al.</i> , 1998
HSV-1	γ 134.5	Déphosphoryle eIF2 α	Chou et Roizman., 1992
	US3	Phosphoryle et inhibe Bad	Munger et Roizman, 2001
EBV	LMP-1	Interfère dans voie des des récepteurs de mort en s'associant à TRAF et TRADD et augmente expression de Bcl-2	Devergne <i>et al.</i> , 1996 Kaye <i>et al.</i> , 1996
	EBNA4	Augmente expression de Bcl-2	Sillins et Sculley, 1995
	BHRF-1	Homologue de Bcl-2	Henderson <i>et al.</i> , 1993
HHV-8	K13	vFLIP : homologue de cFLIP inhibiteur de caspase-8	Sturzl <i>et al.</i> , 1999
	KSbcl-2	Homologue de Bcl-2	Cheng <i>et al.</i> , 1997
HCMV	IE1 et IE2	S'associe à p53 et l'inactive Séquestre p53 dans le cytoplasme	Zhu <i>et al.</i> , 1995
	vICA	Prévient l'activation de caspase-8	Skaletskaya <i>et al.</i> , 2001
	vMIA	Forme un complexe avec ANT et bloque la formation du PTP	Goldmacher <i>et al.</i> , 1999
Adénovirus	E1B-19K	Interfère dans voie des des récepteurs de mort en s'associant avec FADD et homologue de Bcl-2	Perez et White., 1998
	E1B-55K	S'associe à p53 et l'inactive	Teodoro et Branton, 1997b
	E4orf6	S'associe à p53 et l'inactive	Dobner <i>et al.</i> , 1996
	E1B-55K+E4orf6	Dégrade p53	Querido <i>et al.</i> , 1997
	RID	Bloque apoptose par TNF Bloque phospholipase A2	Gooding <i>et al.</i> , 1991 Dimitrov <i>et al.</i> , 1997

TABLEAU 7.B (suite)- Virus et protéines virales impliqués dans l'inhibition d'apoptose

VIRUS	PROTÉINE	FONCTION	RÉFÉRENCE
Papillomavirus	E6	Induit dégradation de p53 par le protéasome	Scheffner <i>et al.</i> , 1990
Polyomavirus	MT	Mime signalisation par facteur de survie : active PI-3K et inactivation de Bad via Akt	Dahl <i>et al.</i> , 1998
VIH	Tat	Augmente expression de Bcl-2	Zauli <i>et al.</i> , 1993
		Mime signalisation par facteur de survie : active PI-3K	Borgatti <i>et al.</i> , 1997
HTLV-1	Vpr	Inhibe NF-kB dans lymphocyte T	Ayyavoo <i>et al.</i> , 1997
	Tax	Inhibe transcription dépendante de p53	Mulloy <i>et al.</i> , 1998
Hépatite B	HBx	S'associe à p53 et l'inactive	Wang <i>et al.</i> , 1995
Hépatite C	Core	Interagit avec domaine cytoplasmique du récepteur TNF	Ray <i>et al.</i> , 1998
Réovirus	$\sigma 3$	Inhibe PKR dans voie de réponse à l'IFN	Denzler et Jacobs, 1994
Influenza	NS1	Inhibe PKR dans voie de réponse à l'IFN	Lu <i>et al.</i> , 1995
Baculovirus AcNPV	p35	Substrat et inhibiteur de caspases -1, -3, -6, -7, -8, 10	Bertin <i>et al.</i> , 1996 Zhou <i>et al.</i> , 1998
		OpNPV	IAP

L'apoptose est donc un mode d'induction de mort cellulaire fréquent lors d'infections virales et sa modulation par autant de différents types de protéines virales suggère que le processus est important pour contrer une infection virale ou tout au moins de se transformer en infection persistante. Les formidables avancées de la biologie moléculaire ont permis au cours des deux dernières décennies de mieux comprendre le processus apoptotique en tant que tel et a permis d'accroître de façon importante notre compréhension du lien hôte-virus lors d'infections virales. La recherche fondamentale en virologie a évidemment bénéficiée de cette accumulation de nouvelles connaissances. Toutefois, les recherches à visées plus appliquées, de plus en plus populaires depuis le

début des années 90, ont aussi pu profiter du volet fondamental de la recherche. Aujourd'hui, certaines utilisations de virus inducteurs d'apoptose, permettent finalement d'espérer de nouvelles avancées dans le domaine fort complexe du traitement du cancer. Il importe donc plus que jamais de bien comprendre comment peut survenir le dérèglement de l'apoptose, afin d'identifier les principaux facteurs qui pourront influencer la mise en place d'une infection persistante indésirable suite à un traitement clinique utilisant des virus.

8. Virus oncolytiques : utilisation thérapeutique potentielle de vieux ennemis

Malgré plusieurs améliorations majeures dans sa détection précoce et son traitement au cours des dernières années, le cancer demeure toujours une cause majeure de décès, surtout en Amérique du Nord. Bien que la biologie moléculaire ait permis des avancées extraordinaires dans la compréhension du développement et du maintien de plusieurs types de cancer, les applications thérapeutiques réelles ne sont pas toujours au rendez-vous encore aujourd'hui. Harnacher certains virus pour en faire des armes efficaces et actives contre certains types de tumeurs pourrait devenir une voie intéressante à moyen terme (Bell *et al.*, 2002).

L'idée de pouvoir utiliser des virus comme traitement anti-cancer potentiel n'est pas complètement nouvelle. En effet, dès le début du XX^e siècle, certains auteurs avaient rapporté une régression spontanée de tumeurs chez certains patients suite à une vaccination anti-rabique ou un accès de fièvre lié à une infection virale. De plus, les premières expériences bien documentées réalisées sur des souris, dès les années 20 et jusqu'à la fin des années 50, ont permis de confirmer le potentiel oncolytique de certains virus, dont en particulier le virus de NewCastle (NDV) et le virus Influenza (Mullen et Tanabe, 2002). Toutefois, c'est en 1956 que sont publiés les premiers résultats notables à propos du pouvoir oncolytique des virus. Dans cette étude, Smith et ses collaborateurs démontrent le pouvoir oncolytique d'un adénovirus chez l'humain. L'expérience s'étant toutefois avérer peu fructueuse puisque la régression tumorale observée chez plus de 50% des patients, est malheureusement temporaire et est suivie d'une nouvelle progression des cellules tumorales (Smith *et al.*, 1956). Jusqu'au début des années 70,

plusieurs études débouchent sur ce type de résultats ambigus et finissent par miner les premiers espoirs autour du réel pouvoir oncolytique des virus. Le traitement par oncolyse virale du cancer est donc plus ou moins mis de côté jusqu'au début des années 90 (Mullen et Tanabe, 2002; Chiocca, 2002). En effet, depuis le début de la dernière décennie les recherches ont repris de plus belle afin de développer de nouveaux traitements basés sur l'utilisation rationnelle de virus dans l'incessante lutte contre le cancer.

Une des caractéristiques principales d'un virus oncolytique est qu'il se réplique beaucoup plus efficacement dans les cellules tumorales que dans les cellules des tissus sains environnants et, plus important encore, il détruit les dites cellules cancéreuses tout en affectant pas ou très peu les cellules normales. Pour ce faire, un virus oncolytique utilise la plupart du temps certaines anomalies génétiques propres aux cellules tumorales (Bell, 2002; Chiocca, 2002). Certaines approches visent également à utiliser les virus en tant que vecteur de gènes ayant des propriétés anti-tumorales; dans ces cas, le virus sera ou non lytique en lui-même (Markert *et al.*, 2001; Mullen et Tanabe, 2002; Ring, 2002). Ce dernier volet sur l'utilisation des virus comme agent anti-tumoral n'est toutefois pas traité de façon détaillée ici. Qu'il suffise de dire que certaines approches visent à intégrer des transgènes, codant pour des facteurs pro-apoptotiques ou encore certaines cytokines, dans le génome viral afin de rendre le virus encore plus efficace à détruire les cellules tumorales (Mullen et Tanabe, 2002; Ring, 2002). Plusieurs virus différents présentent un potentiel intéressant quant à leur utilisation contre le cancer.

8.1 Virus à ADN

Le virus HSV-1 de la famille des *Herpesviridae* (Stanziale et Fong, 2003; Markert *et al.*, 2001), et le virus de la vaccine (*Vaccinia*), un *Orthopoxvirus* de la famille des *Poxviridae*, (McCart *et al.*, 2000; Puhmann *et al.*, 2000) sont deux virus à ADN possédant un potentiel anti-tumoral très intéressant. Toutefois, les adénovirus de type 2 et 5 (Biederer *et al.*, 2002; Nemunaitis *et al.*, 2001; 2000; Fueyo *et al.*, 2000; Heise *et al.*, 2000; Ganly *et al.*, 2000; Khuri *et al.*, 2000; Alemany *et al.*, 1999; Bischoff *et al.*, 1996; Barker et Berk, 1987) représente en ce moment le prototype viral le plus étudié pour son

potentiel oncolytique. Cependant, même si les résultats sont extrêmement encourageants, plusieurs équipes visent en ce moment à modifier le tropisme du virus pour faciliter l'infection de cellules tumorales *in vivo* (Shayakhmetov *et al.*, 2002; Douglas *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001; Li *et al.*, 1999). Les trois virus ont jusqu'à présent été utilisés avec un certain succès dans des modèles animaux et des études cliniques impliquant des sujets humains (Mullen et Tanabe, 2002).

8.2 Virus à ARN

Malgré le développement d'outils tels que ceux décrits plus haut, la plupart des virus à l'étude pour leur potentiel oncolytique sont des virus à ARN (Russell, 2002).

Le virus de la poliomyélite (Gromeier *et al.*, 2000; 1999; 1996) de la famille des *Picornaviridae*, le virus des oreillons (Shimizu *et al.*, 1988; Asada, 1974), celui de la rougeole (Peng *et al.*, 2002; 2001; Grote *et al.*, 2001; Pasquinucci, 1971; Gross, 1971; Bluming et Ziegler, 1971) et le virus de la maladie de Newcastle (Newcastle disease virus; NDV) (Pecora *et al.*, 2002; Reichard *et al.*, 1992; Lorence *et al.*, 1988) de la famille des *Paramyxoviridae* sont à l'étude en rapport à leur pouvoir oncolytique. Plusieurs études, utilisant le concept de VPC (*Vector Producer Cells*), décrivent également l'injection de fibroblastes produisant des rétrovirus à proximité de tumeurs (Alavi et Eck, 2001; Floeth *et al.*, 2001; Shand *et al.*, 1999; Ram *et al.*, 1997; Culver *et al.*, 1992). Le réovirus, un membre de la famille des *Reoviridae*, a comme hôte naturel l'humain où, bien qu'il ait été isolé à partir des voies respiratoires et du tractus entérique, il ne cause aucun symptôme clinique; d'où son nom de *reovirus* pour *Respiratory Enteric Orphan virus* (Sabin, 1959). Les capacités oncolytiques du réovirus de type 3 ont déjà été mises en évidence il y a 35 ans (Bennette *et al.*, 1967). De plus, on sait, depuis près de 25 ans, que les cellules transformées sont souvent très susceptibles au réovirus alors que les cellules normales sont plutôt réfractaires au virus (Hashiro *et al.*, 1977; Duncan *et al.*, 1978). L'équipe dirigée par Patrick Lee travaille depuis quelques années déjà à développer l'utilisation rationnelle du réovirus T3 Dearing (T3D) en tant qu'agent anti-cancer (Wilcox *et al.*, 2001; Norman et Lee, 2000; Coffey *et al.*, 1998; Strong *et al.*, 1998). Finalement, au moins une équipe travaille à la mise au point d'un virus influenza

recombinant avec une délétion dans NS1 pour tenter de favoriser sa réplication dans les cellules tumorales. Ce virus ne se réplique efficacement que dans les cellules possédant un oncogène Ras constitutivement actif et avec une activité PKR très faible ou inexistante, deux caractéristiques fréquemment retrouvées chez les cellules transformées (Bergmann *et al.*, 2001). Parmi tous les virus à ARN étudiés en rapport à leur pouvoir oncolytique, à cause de certaines caractéristiques particulières, VSV apparaît comme un candidat très intéressant.

8.3 VSV : une arme oncolytique

Les travaux des équipes de John C. Bell (Stodjl *et al.*, 2000; Bell *et al.*, 2002) au *Ottawa Cancer Center* et de Glen N. Barber (Balachandran *et al.*, 2000b; 2001; Barber, 2001) à l'Université de Miami, ont montré que VSV-Indiana peut infecter et tuer de manière préférentielle les cellules tumorales sans trop affecter les cellules saines à l'intérieur d'un organisme, ce qui laisse présager que VSV pourrait devenir membre du club des virus employés dans la lutte contre le cancer chez l'humain.

L'IFN β semble important dans l'utilisation que l'on voudrait faire de VSV en tant qu'agent anti-tumoral. Même si certains virus ont développé diverses stratégies pour contrer l'effet des interférons de type 1, VSV demeure quant à lui, très sensible à l'interférence induite par ces cytokines. Lors de la réponse anti-VSV d'une cellule normale, PKR est fortement activée, suggérant que cette kinase est importante dans la mise en place de l'état antiviral. Il a d'ailleurs été démontré qu'une très faible dose de VSV-Indiana tuait rapidement des souris PKR $-/-$ (Stodjl, *et al.*, 2000a, Balachandran *et al.* 2000c) et que des fibroblastes embryonnaires issus de ces souris étaient beaucoup plus susceptibles à l'infection par le VSV et à l'induction du processus apoptotique, que des fibroblastes embryonnaires de souris normales (Balachandran *et al.* 2000c). De plus, une panoplie de lignées cellulaires humaines provenant de divers types de tumeurs, infectées en présence d'IFN de type 1 sont rapidement détruites et produisent beaucoup plus de virus infectieux que des cellules normales fibroblastiques et épithéliales ou que des cellules normales provenant de la moelle osseuse (Stodjl *et al.*, 2000b). Balachandran et collaborateurs ont aussi démontré que l'infection de sept différentes

lignées de cellules humaines tumorales produisait une quantité importante de virus infectieux et que l'ajout d'IFN β altérait de façon seulement partielle cette production de virions. Sans la présence d'IFN, les cellules étaient très susceptibles à l'induction d'apoptose et l'ajout de cette cytokine engendrait un taux de survie significativement plus élevé suite à l'infection par VSV. L'absence de protection complète contre la mort cellulaire en présence d'IFN β suggérerait, selon les auteurs, une anomalie dans la voie métabolique reliée à l'IFN dans les cellules tumorales testées et qu'un défaut d'activation de PKR serait en cause (Balachandran *et al.*, 2000b). Or, bien que cette voie demeure véridique, le portrait pourrait être plus complexe puisqu'il semble possible que VSV puisse infecter et détruire des cellules tumorigènes C6 issues d'un glioblastome de rat et déficiente pour le facteur pro-apoptotique p53, mais où PKR est activée suite à l'infection. Il semble donc que VSV puisse utiliser d'autres déficiences génétiques des cellules tumorales pour s'y répliquer efficacement et détruire les dites cellules (Balachandran *et al.*, 2000b; 2001). Les auteurs ont également induit la transformation de cellules BALB/3T3 spontanément immortalisées en y transfectant les oncogènes *c-myc* ou *K-ras*. Ces nouvelles cellules transformées ont ensuite été inoculées à des souris nues et les tumeurs formées ont par la suite été injectées par une dose de VSV. Comme les cellules C6, ces cellules tumorales ont été détruites par apoptose et il a été démontré que le phénomène était directement attribuable à l'infection par VSV et non au système immunitaire (Balachandran *et al.*, 2001). Ces derniers résultats font de VSV un candidat encore plus intéressant pour détruire divers types de cellules cancéreuses. Les résultats observés par Stojdl et collaborateurs chez des souris nues (*nude*) où l'on avait inoculé des cellules tumorigènes issues de mélanome humain (Stojdl *et al.*, 2000b) confirme ce potentiel anti-tumoral de VSV. Selon les deux équipes qui travaillent à l'élaboration de protocole d'utilisation de VSV, la principale conclusion à tirer est que VSV a un potentiel certain pour traiter les tumeurs (Balachandran *et al.*, 2000b; Stojdl *et al.*, 2000b), en particulier celles qui ne répondent pas à des traitements à l'IFN (Stojdl *et al.*, 2000b).

L'équipe de Glen Barber (Fernandez *et al.*, 2002) a réussi à fabriquer des virus recombinants portant soit le gène codant pour l'IL-4, une cytokine pouvant favoriser

l'immunité anti-tumorale, soit le gène codant pour une thymidine kinase (TK) qui phosphoryle le ganciclovir (GCV) et altère la réplication virale, permettant d'augmenter l'effet cytotoxique du virus par un effet paracrine sur les cellules avoisinantes (Elshami *et al.*, 1996). L'injection par voie intraveineuse chez des souris BALB/c immunocompétentes, chez qui on avait préalablement implanté des cellules d'adénocarcinome mammaire, a démontré que les virus recombinants engendraient une régression tumorale plus importante que le virus de type sauvage (Fernandez *et al.*, 2002). De nouveaux VSV recombinants où l'on a inséré les gènes de l'IFN β murin ou humain présentent également un intéressant pouvoir oncolytique tout en affectant très peu diverse cultures primaires murines et humaines respectivement (Obuchi *et al.*, 2003).

L'apoptose est le principal mode de mort cellulaire induit lors de l'infection par le VSV (Desforges *et al.*, 2002; Kopecky *et al.*, 2001; Koyama, 1995) et comme mentionné plus avant, la protéine M semble, au moins en partie, responsable (Desforges *et al.*, 2002; Kopecky *et al.*, 2001). Des travaux présentement en cours au laboratoire, tentent d'identifier les domaines importants pour l'induction d'apoptose et de développer l'utilisation éventuelle de la protéine M seule comme agent anti-tumoral.

9. Conclusion

Bien que le virus de la stomatite vésiculaire soit habituellement un virus hautement cytopathique, des circonstances surviennent où il lui est permis d'établir une infection persistante. En effet, certaines mutations spécifiques peuvent participer à l'induction d'une infection persistante *in vitro* et *in vivo*. Au moins un mutant thermosensible et altéré au niveau de sa protéine M, est connu pour sa capacité à induire une infection persistante *in vivo* au niveau du SNC chez le hamster. C'est la raison pour laquelle l'étude décrite dans les prochains chapitres utilise certains mutants de la protéine M de VSV-Indiana, ainsi que la souche moins virulente New Jersey, pour infecter la lignée de cellules H4 issue du SNC. Ayant déjà établi que ces cellules pouvaient être infectées par nos différents mutants, chercher à comprendre comment l'infection peut y devenir persistante représente l'objectif premier du projet. Les résultats de notre étude, présentés dans les prochains chapitres, corroborent la possibilité d'établir une infection persistante à l'intérieur de cellules du SNC, rapportée par certains auteurs auparavant dans des modèles animaux et dans quelques cas sporadiques chez l'humain. Dans notre modèle il appert que les variants moins cytopathiques de VSV induisent moins efficacement l'apoptose et qu'ils réussissent par le fait même à persister. Étant donné l'implication possible d'infections virales persistantes dans certaines pathologies neurodégénératives, il est essentiel de chercher à comprendre les raisons et d'expliquer les mécanismes qui font qu'une persistance virale puisse survenir. L'utilisation éventuelle possible de VSV en tant que traitement antitumoral chez l'humain ajoute encore à l'intérêt de bien comprendre les facteurs associés à l'établissement d'une persistance par ce virus, en particulier à l'intérieur de cellules du SNC.

10. Approche générale et Objectifs

Le sérotype VSV-New Jersey et certains mutants de la protéine M du virus de la stomatite vésiculaire peuvent induire une infection persistante sur des cellules immortalisées provenant du système nerveux central. Puisque ce type d'infection virale peut être relié à des neuropathologies, il va de soi d'en étudier l'apparition sur des cellules issues du tissu nerveux, pour éventuellement tenter d'en comprendre le mécanisme d'induction et de maintien. De plus, des études suggérant l'utilisation éventuelle de VSV en tant qu'agent antitumoral, se poursuivent. Tenter de comprendre les mécanismes d'induction de mort cellulaire et d'identifier quels facteurs pourraient être modulés et mener à l'établissement possible d'une persistance virale à l'intérieur de cellules immortalisées devient donc d'autant plus essentiel aujourd'hui. Le contexte de notre étude se restreint à la culture de cellules issues du système nerveux central (SNC), où le virus limite son attaque et permet à la cellule de réagir. Ainsi, un équilibre se crée afin que chaque partie puisse rester minimalement fonctionnelle et viable. À l'aide de ce modèle d'étude *in vitro*, il est possible de caractériser directement l'interaction virus-hôte au niveau cellulaire afin d'identifier quels facteurs participent à ou empêchent l'établissement d'une persistance virale par le VSV.

AVANT-PROPOS AUX CHAPITRES II et III

Les articles présentés dans les prochains chapitres de cette thèse décrivent l'établissement d'une infection persistante par divers variants du Virus de la Stomatite Vésiculaire (VSV) de même qu'une caractérisation partielle des mécanismes reliés au phénomène d'apoptose, puisqu'il semble qu'une induction inefficace de ce processus soit potentiellement reliée à l'établissement d'une persistance par VSV.

Le travail qui y est présenté est de façon prévalente celui de Marc Desforges et celui des quelques personnes dont le nom apparaît dans les différents titres. La rédaction de ces manuscrits est d'abord le fruit d'efforts déployés par Marc Desforges mais aussi la mise en commun du travail concerté de Pierre Talbot, Laurent Poliquin et de Marc Desforges. D.S. Lyles et M.O. McKenzie ont fourni les vecteurs d'expression permettant une expression adéquate de la protéine M à l'intérieur de cellules transfectées et G. Despars a effectué les expériences de transfections d'ARN messager. M. Gosselin et S. Bérard ont pour leur part participé à la mise au point de certaines techniques pour mettre en évidence l'apoptose induite lors de l'infection de VSV.

CHAPITRE II : *Matrix protein mutations contribute to inefficient induction of apoptosis leading to persistent infection of human neural cells by vesicular stomatitis virus.*

Paru dans *Virology* (2002) vol. 295, p. 63-73

Matrix Protein Mutations Contribute To Inefficient Induction of Apoptosis Leading To
Persistent Infection Of Human Neural Cells By Vesicular Stomatitis Virus

Marc Desforges^{1,3}, Geneviève Despars¹, Stéphane Bérard¹
Myriam Gosselin¹, Margie O. McKenzie², Douglas S. Lyles², Pierre J. Talbot³ and
Laurent Poliquin^{1*}

Running title: Apoptosis and persistent infection by Vesicular Stomatitis Virus

¹Department of Biological Sciences, Université du Québec à Montréal, Montréal,
Québec, Canada H3C 3P8

² Department of Microbiology and Immunology, Wake Forest University School of
Medicine,
Winston-Salem, North Carolina 27157, USA.

³Human Health Research Center, INRS-Armand Frappier Institute, Laval, Québec,
Canada H7V 1B7

*corresponding author : Département des sciences biologiques,
Univ. du Québec à Montréal,
P.O. box 8888, Station Centre-ville,
Montreal, Qc
Canada H3C 3P8
Phone : 514-987-3000, ext. 6192
Fax : 514-987-4647

Email : poliquin.laurent@uqam.ca

ABSTRACT

In a model system to study factors involved in the establishment of a persistent viral infection that may lead to neurodegenerative diseases, Indiana and New Jersey variants of Vesicular Stomatitis Virus (VSV) with different capacities to infect and persist in human neural cells were studied. Indiana matrix (M) protein mutants and the wild type New Jersey strain persisted in the human neural cell line H4 for at least 120 days. The Indiana wild type virus (HR) and a non M mutant (TP6), both unable to persist, induced apoptosis more strongly than all the other variants tested, as indicated by higher levels of DNA fragmentation and caspase-3-like activity. Transfection of H4 cells with mRNA coding for the VSV M protein confirmed the importance of this protein in the induction of apoptosis. Furthermore, the pan-caspase inhibitor ZVAD-fmk maintained cell survival to about 80%, whereas inhibition of either caspase-8, caspase-9 or both, only partially protected the cells against death consistent with the fact that anti-apoptotic molecules from the Bcl-2 family also protect cells from death only partially. These results suggest that VSV activates many pathways of cell death and that an inefficient induction of caspase-3-related apoptosis participates in the establishment of a persistent infection of human neural cells by less virulent VSV variants.

INTRODUCTION

Neurodegenerative diseases may be linked to persistent viral infections of the central nervous system (CNS). Indeed, viral induction of long term neuropathology is well described for subacute sclerosing panencephalitis and measles virus (Haase *et al.*, 1985; Schneider-Schaulies and ter Meulen, 1999), Theiler's murine encephalitis virus (TMEV) induced demyelination disease in mice (Miller *et al.*, 1997; Tsunoda *et al.*, 1997) and subtle neurological deficit associated with lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) (Oldstone, 1989). The murine coronavirus mouse hepatitis virus (MHV) also provides a useful model for demyelinating diseases such as multiple sclerosis (MS) (Castro *et al.*, 1994; Houtman and Fleming., 1996; Wege *et al.*, 1998; Buchmeier and Lane, 1999) and can persist in neural cells (Lavi *et al.*, 1987; Chen et Baric, 1996). Furthermore, the human counterparts of MHV, Human Coronavirus (strains HCoV-229E and HCoV-OC43) present a special interest in relation to persistent viral infection of the CNS as viral RNA was detected by RT-PCR in human brain tissue (Arbour *et al.*, 2000), and both strains can persistently infect human neural cells (Arbour *et al.*, 1999a, 1999b).

A viral infection is one of several factors that, taken together, can lead to a chronic neuropathology (Talbot *et al.*, 2001). In several of these pathologies, a persistent infection, whereby a virus has elaborated a strategy of non-lytic replication in the infected cells, often seems to be a key factor in the triggering of illness (de la Torre and Oldstone, 1996). Among the various viruses that have been studied for viral and cellular functions involved in the initiation of a persistent infection is the Vesicular Stomatitis Virus (VSV), a member of the *Rhabdoviridae* family from the *Mononegavirales* order.

This virus is usually highly cytopathic, but has also been shown to persist in cell culture (Stanners *et al.*, 1975; Huprikar *et al.*, 1986; Desforges *et al.*, 2001) and to infect the CNS (Huneycutt *et al.*, 1994; Plakhov *et al.*, 1995) where at least viral RNA can persist (Fultz *et al.*, 1982; Barrera *et al.*, 1996).

The cytopathic effect (CPE) caused by VSV usually leads rapidly to cell death. One important mechanism that may be involved in virus mediated cell death is apoptosis, which appears to be induced by various DNA and RNA viruses (see reviews by Razvi and Welch, 1995; Teodoro and Branton, 1997; Griffin and Hardwick, 1999). It has also been shown that wild type Indiana (Bi *et al.*, 1995; Balachandran *et al.*, 2000; 2001) and New Jersey (Koyama, 1995) strains of VSV can induce apoptosis.

Apoptosis is a complex and highly regulated mechanism that usually results in the activation of a special type of cystein proteases called the caspases (cystein-dependent aspartate specific proteases). By initiating a complex cascade of reactions that usually involve these caspases, the cell finally kills itself (Nunez *et al.*, 1998; Earnshaw *et al.*, 1999; Hengartner, 2000). In the situation of a viral infection, apoptosis may have various consequences. The first is to limit the inflammatory response (Teodoro and Branton, 1997; Marcellus *et al.*, 1998), a situation which can be beneficial to the virus for evading the immune system of the host more efficiently. In some cases, apoptosis may even enable virus spread, as it has been suggested for HIV (Strack *et al.*, 1996). Nevertheless, apoptosis may also represent a potent defense mechanism for the host, limiting viral proliferation in the infected organism (Tsunoda *et al.*, 1997; Allsopp *et al.*, 1998). However, cell death itself may contribute to and enhance pathogenesis (Jelachich

and Lipton, 1996; Ubol *et al.*, 1998). In the end, the modulation of this complex mechanism can sometimes be profitable to the virus and deleterious to the host. If apoptosis is not induced correctly or not induced at all in a context where it should, it may allow the establishment of a persistent infection by a virus that should have been eliminated otherwise. In the present study we used an *in vitro* system to investigate factors that could be associated with inefficient regulation of virus-induced apoptosis at the cellular level and thereby with the initiation of a persistent infection in neural cells.

We report that VSV induces apoptosis in human neural cells in culture and that this is at least in part related to the viral matrix (M) protein. Indeed, the Indiana strain of VSV induced apoptosis very rapidly with more than 90% of all cells killed by 48 hours post-infection. On the other hand, a series of M protein mutants of the Indiana strain (Francoeur *et al.*, 1987; Desforges *et al.*, 2001) and the less cytopathic wild type New Jersey strain, induced cell death by apoptosis but to a lesser extent, thereby allowing the establishment of a persistent infection of the neural cells. Thus, VSV may provide a good model to characterize the importance of the regulation of apoptosis as a mechanism involved in the control of viral persistence in cells of the central nervous system.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and viruses

The simian kidney fibroblast Vero cells (ATCC-CCL-81) used for virus titration experiments were grown to 100% confluence before infection at 37°C in a 5% (v/v) CO₂ atmosphere, in MEM α medium supplemented with 10% (v/v) calf serum, penicillin G (100 units/ml), streptomycin sulfate 100 μ g/ml and fungizone (2.5 μ g/ml amphotericin B and 2.5 μ g/ml sodium deoxycholate). The human neural cell line H4 (ATCC-HTB-148) was grown the same way except that DMEM supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS) was used. The wild-type HR strain of VSV Indiana has been described elsewhere, as were the M mutants derived from it (Francoeur *et al.*, 1987 ; Desforges *et al.*, 2001). The New Jersey Hazelhurst strain was a gift from Dr. Yong Kang (University of Western Ontario). Experimental infections were performed at m.o.i. ranging from 0.01 to 1. For the infection of the H4 cells, all viruses were diluted in PBS containing 2% (v/v) FCS and incubated with the cells in a minimal volume for 1 hour at 37°C to allow adsorption and penetration into the cells, before washing once with PBS and adding complete DMEM (all cell culture products were from Canadian Life Technologies).

Indirect immunofluorescence

H4 cells (1.5×10^4) persistently infected were seeded on 12-well multitest slides (ICN Biomedicals) and fixed the next day with cold acetone. Detection of viral antigen was performed the next day using a rabbit polyclonal antibody against VSV antigen (1/500) as primary antibody and secondary antibody was F(ab')₂ anti-rabbit coupled to FITC

(1/100). After detection of viral antigen with specific antibody, cells were counterstained with Evans Blue dye to allow the visualization of all the cells in the culture.

Cell viability

Viability of the cells was estimated by Trypan blue dye exclusion. Briefly, after a 2 minute treatment with 0.25% trypsin (w/v), cells were resuspended in 2 ml of complete DMEM. An aliquot was then mixed with one volume of 0.4% (w/v) Trypan blue and the viability of the cells was estimated by microscopic observation on an hemacytometer.

Metabolic activity of the cells in presence of apoptosis inhibitors

The MTS/PMS tetrazolium assay (Cory et al 1991) was used to measure the survival of the culture after infection. MTS (Promega) was added to the culture medium (final concentration of 0.6 mM) with PMS (Sigma-Aldrich) (final concentration of 0.014 mM). The reduction of MTS, a measure of mitochondrial respiration, and therefore a direct indication of cell viability and viral cytotoxicity is monitored by optical density reading at 540 nm. The cells were preincubated for 2 hours with complete DMEM high glucose alone or with medium containing either 0.2% (v/v) DMSO, 100 μ M ZFA-fmk or 100 μ M ZVAD-fmk (Enzyme System Products). The infection was performed as described earlier at an m.o.i. of 1 for 1 hour and then complete DMEM was added, either alone or with 0.2% (v/v) DMSO, 100 μ M ZFA-fmk (inhibitor of cystein proteases other than caspases) or 100 μ M ZVAD-fmk (pan-caspases inhibitor), 70 μ M Z-IETD-fmk (inhibitor of caspase-8) or 70 μ M Z-LEHD-fmk (inhibitor of caspase-9) (Enzyme System Products).

Establishment of cell lines and clones overexpressing Bcl-2 and Bcl-XL

Transfection of 1 µg of DNA from pRSV-HA-Bcl-2-neo or pcDNA-HA-Bcl-XL-neo (kind gift from Dr. Gordon Shore, McGill University) or pRSV-neo as control (gift from Dr. Éric Rassart, University of Quebec in Montreal) was performed using 10 µl of Lipofectamine (Invitrogen Life Technologies) on 2×10^5 H4 cells at 2/3 confluence in 6-well plates (Falcon cat no. 3046). Selection of H4 cells sub-populations and isolated clones overexpressing either Bcl-2 or Bcl-XL was performed with G418 (Invitrogen Life Technologies) at 1 mg/ml and then kept under selection at 500 µg/ml of this selecting agent. Viability of sub-populations composed of 50 different clones overexpressing Bcl-2 was evaluated by Trypan Blue dye exclusion and metabolic activity of isolated clones overexpressing either Bcl-2 or Bcl-XL was evaluated by the MTS/PMS tetrazolium assay.

Infectious viral particles production

Aliquots of medium were taken at different times during the course of the infection and titrated to evaluate whether or not the infection was productive. The plaque assay was performed by infecting confluent Vero cells grown in 6-well plates (Falcon cat no. 3046) using serial dilutions in PBS supplemented with 2% (v/v) FCS. After a 1 hour incubation in a minimal volume, complete MEM α medium containing 0.2% (w/v) agarose was added (Desforges *et al.*, 2001). Infectious virus titers were expressed as pfu/ml.

DNA fragmentation and TdT-dUTP-Nick-End-Labeling (TUNEL)

After infection, DNA was extracted from 4×10^6 cells as described elsewhere (Appel *et al.*, 2000). Briefly, detached and adherent cells were collected, washed with cold PBS and lysed on ice for one hour in 1 ml of cold lysis buffer (10 mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA and 0.2% (v/v) Triton X-100). Lysates was centrifuged at 10,000xg, 20 min at 4°C and low-molecular-weight DNA was extracted by conventional phenol, phenol-chloroform, and chloroform extractions and precipitated with ethanol. The pellet was resuspended in 25 μ l of water and treated 30 min with RNase A (10 μ g/ μ l) at 37°C. Samples were then run on a 1.8% (w/v) agarose gel in Tris Borate EDTA buffer (TBE) stained with ethidium bromide (0.5 μ g/ml).

For TUNEL staining, 1.5×10^4 cells were infected on 16-well glass slides (Nunc), fixed with freshly prepared 4% (v/v) paraformaldehyde in PBS at room temperature and permeabilized with 0.2% (v/v) Triton X-100 : 0.2% (w/v) sodium citrate for 3 min on ice. Labeling was performed according to the manufacturer's instruction (Roche Diagnostics) except that the labeling solution was previously diluted by 50% with a solution containing 30 mM Tris pH 7.2, 140 mM sodium cacodylate and 1 mM CoCl_2 .

Measurement of Caspase-3-like activity

Induction of caspase-3-like activity in cells was measured with a Caspase-3 colorimetric assay (R&D Systems) as described by the manufacturer. Briefly, 4×10^6 cells were infected at an m.o.i. of 1 and floating and adherent cells were recovered together at indicated times post-infection. After two washes in cold PBS, cells were

counted, lysed in buffer (25 μ l per 1×10^6 cells) and left on ice for 10 min. Lysates were cleared by a 1 minute centrifugation at 10,000xg and kept at -80°C until analysis. Caspase-3-like activity was measured by optical density reading at 405 nm after a two hour incubation period at 37°C .

Fifty micrograms of total cell extract proteins were migrated on a 12.5% (w/v) acrylamide gel and transferred to a PVDF membrane (Millipore) using a semi-dry apparatus (BioRad). Western blotting was performed using anti-caspase3 rabbit antiserum (Kind gift from Dr. Michele Barry, University of Alberta), diluted 1/5000 in TBS-0.1% (v/v) Tween -20 containing 5% (w/v) of non fat dry milk. Secondary antibody was anti-rabbit-HRP (Amersham Biosciences) diluted 1/5000 in TBS-0.1% (v/v) Tween-20. Revelation was performed using ECL detection kit (Amersham Biosciences).

Cloning and transfection of viral M gene in neural cells

The M gene cDNAs (wild type MTP6 and N-terminal mutant MT1026R1) were prepared as described elsewhere (Desforges *et al.*, 2001) and cloned in pSD4, a plasmid derived from vector pSP65 (Invitrogen-Life Technologies) which contain the Sp6 phage promoter for *in vitro* transcription. The mRNAs were synthesized *in vitro* using mMessage mMachine Sp6 kit (Ambion). The quantity and quality of mRNAs were double-checked by optical density reading at 260 nm and by electrophoresis on agarose gel.

The day before transfection, H4 cells were seeded at 3×10^4 cells/well in 4 well slides (Nunc). Cells were transfected with 0.15 μg of mRNA transcribed *in vitro* and 2.5 μl of Lipofectamine according to manufacturers instruction (Invitrogen-Life Technologies). Cells were then fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde 18 hours post-transfection. The TUNEL reaction was performed as indicated for VSV infections.

RESULTS

Human neural cells sustain persistent infection

The human H4 neural cell line sustained a persistent productive infection by the M protein mutants of the Indiana serotype and by the wild type New Jersey for at least 120 days (Fig. 1a, Table 1). A representative series of microscopic immunodetection of viral proteins during persistence in neural cells is shown in Fig. 1b. VSV Indiana variants induced a high level of viral antigen production in a small number of cells, whereas VSV New Jersey induced the production of a low level of viral antigen in the majority of cells. Figure 1a shows that the end result in either case was similar levels of production of infectious particles through 120 days. On the other hand, cells infected by Indiana variants without any mutation in the M gene (HR-Ind and TP6) could not sustain long term infection, even when low m.o.i. (0.01) was used to start the infection (data not shown). In fact, all cells were killed between 48 and 72 hours p.i. when the infection was initiated at an m.o.i. of 1 by these viruses (Fig 2a). In comparison, cell cultures remained viable throughout infection by Indiana M protein mutants or wild type New Jersey (Fig. 2a) even though there was no significant difference in production of infectious virus (Fig. 2b) except for mutant T1026 which has a thermosensitive mutation in the L gene and for TP6 at 72 hours p.i..

Short term events show that infected cells die by several pathways of apoptosis

To identify mechanisms that are important in the establishment of the persistent infection, the induction of cell death in short term infections of human neural cells was

analyzed. All viruses studied induced apoptosis of neural cells as seen by TUNEL positive reaction at 16 hours p.i. (Fig. 3a) and DNA fragmentation (Fig. 3b). It is notable that the percentage of TUNEL-positive cells was higher and the characteristic DNA laddering was stronger and observed earlier in cells infected with HR-Indiana and TP6 than in cells infected with M mutant T1026R1 and New Jersey wild type viruses. Caspase activity in extracts from virus-infected H4 cells was measured using a chromogenic substrate for caspase-3 as an additional test for the induction of apoptosis. This enzymatic activity was clearly induced to a lower extent by infection with the Indiana M protein mutants and wild-type New Jersey serotype viruses compared to HR and TP6 viruses (Fig. 4A). These results were confirmed by analysis of cleavage of procaspase-3 by western blots (Fig. 4B). More of the activated 17-19 kDa caspase-3 fragments were generated in H4 cells infected with HR-Indiana and TP6 viruses than in cells infected with M mutant T1026R1 and New Jersey wild type viruses. Thus, although hallmarks of apoptosis could be observed for all VSV variants, they appeared weaker in Indiana M mutants and wild type New Jersey infections, correlating with the differences in cell viability (Fig.2a).

To further determine the apoptotic pathways induced by the different VSV variants, neural cells were infected in the presence of various apoptosis inhibitors. Infection in the presence of a pan-caspase inhibitor of apoptosis, ZVAD-fmk, protected H4 neural cells. Indeed, even at 2 days p.i., cells retained up to 80% of their mitochondrial metabolic activity depending on the virus (Fig. 5a). On the other hand, cells infected in the presence of 70 μ M of inhibitors of caspase-8 (Z-IETD-fmk) or

caspase-9 (Z-LEHD-fmk) did not sustain infection as well, as neither inhibitor was able to protect the cells from death as efficiently as ZVAD-fmk for more virulent non persisting viruses. The ZFA-fmk is the negative control for ZVAD-fmk, as it does not inhibit any known caspases. It protected the cells to a much weaker extent (Fig. 5a). Moreover, stable overexpression of antiapoptotic molecule Bcl-2 and to a lesser extent Bcl-XL was correlated with an increased survival of infected cells (Fig. 5b and 5c) and did permit the establishment of a long term infection for at least two weeks by VSV-HR-Indiana when infection was initiated at an m.o.i. of 0.01 or less (data not shown). On the other hand, neither of these antiapoptotic molecules led to VSV-TP6 persistence in H4 cells (data not shown).

Inhibition of caspase-related apoptosis allows a more effective production of virus

As ZVAD-fmk protected cells from VSV-induced caspase-associated apoptosis, we wished to determine whether this protection had any effect on viral replication. Measurement of infectious virus titers (pfu) indicated that inhibition of caspases allowed production of infectious virus for a longer period of time (Fig. 6a). As shown in Fig. 6b, inhibition of caspases using ZVAD-fmk led to an increased production of infectious virus by up to -2 logs for all Indiana variants. Thus inhibition of apoptosis appears to participate in a better propagation of infectious VSV between 45 and 72 hours p.i., with the exception of wild type New Jersey (Fig. 6b).

M protein participates to DNA fragmentation

Recent results (Despars et al, unpublished; Kopecky *et al.*, 2001) point to the involvement of the matrix (M) protein in the apoptosis induction process. Thus, we

tested whether production of M protein in the absence of other viral components was sufficient to induce apoptosis in H4 cells. In view of the inhibitory effect of M protein on host transcription, M protein was expressed from transfected mRNA rather than plasmid DNA, since M protein inhibits its own expression from DNA vectors that depend on host transcriptional activity (Black et Lyles, 1992; Black *et al.*, 1994). Expression of either wild type or T1026R1 mutant M protein alone in H4 neural cells induced DNA fragmentation at 18 hours post-transfection as shown in Fig. 7 which is a field that is representative of two different experiments. In both experiments, it appeared that wild type M protein led to a stronger positive TUNEL reaction than the T1026R1 mutant and vehicle (lipofectamine alone), in agreement with DNA fragmentation observed during whole virus infection (fig 3a and 3b).

DISCUSSION

Given the observation that several viruses induce or modulate apoptosis, it appears that this process is a key factor in the complex regulation that takes place to control the infection, including modulation from an acute infection to viral persistence. The central nervous system represents a privileged site for viral persistence and this could imply relevance to the development of neurological disorders. Therefore, we wished to study how a viral infection can become persistent in a neural cell model. For that purpose, we used VSV, a usually highly cytopathic virus that has been shown to induce apoptosis (Bi *et al.*, 1995; Balachandran *et al.*, 2000; 2001; Koyama, 1995) as

well as to persist in the nervous system (Fultz *et al.*, 1982; Barrera *et al.*, 1996) and for which we possess a series of attenuated mutants.

Induction of DNA fragmentation and activation of caspase-3-like proteases are usually important hallmarks of apoptosis, and their extent is correlated with the degree of apoptosis. The fact that a reduced activation of these markers occurs in cells infected by Indiana M protein mutants and wild type New Jersey compared to Indiana wild type (Fig. 3 and 4) is crucial as it correlated with a limited induction of cell death, thereby allowing survival of a large portion of the infected cells (Fig. 2a), and providing the virus a reservoir to maintain itself (Fig. 1). Expression of the M protein alone in H4 cells induced apoptosis, as seen by DNA fragmentation (Fig. 7). The apparent difference in the degree of apoptosis induced by wild type and the T1026R1 mutant M protein is very interesting as it correlates with results observed during viral infection (Fig. 3a and 3b) and with the fact that the only difference between wild type virus HR-Ind and mutant T1026R1 genome is in the M gene, as we have previously shown (Desforges *et al.*, 2001; see Table 1). Furthermore, this difference in induction of apoptosis between wild type and mutant M protein is supported by recent results which indicate that expression of a similar mutant M protein expressed alone in HeLa or BHK cells activates little if any caspase-3 (Kopecky *et al.*, 2001).

Overexpression of Bcl-2 has already been shown to be associated with persistent infection of cells by other cytopathic viruses such as Sindbis virus (Levine *et al.*, 1993), Semliki Forest Virus (Scallan *et al.*, 1997) and Japanese encephalitis virus (Liao *et al.*, 1998). In our system, cells overexpressing Bcl-XL and especially Bcl-2 survived

significantly better to infection (Fig. 5b and 5c) especially when infection was done at a low m.o.i. This ectopic expression of antiapoptotic molecules even allowed HR-Indiana virus to persist in culture when the infection was initiated at 0.01 pfu/cell (data not shown), indicating that those antiapoptotic Bcl-2 family members are of some importance for the control of VSV-induced apoptosis and possible viral persistence. Further analysis of the possible modulation of regulatory proteins such as anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-XL and of pro-apoptotic Bax and Bid are currently performed to further characterize the mechanisms underlying VSV-induced apoptosis.

Our results so far indicate that there may be other pathways involved in VSV-induced apoptosis besides the mitochondrial pathway which is regulated by the Bcl-2 family of proteins. Indeed, inhibition of caspase-9 protected cells from death only partially and for both Indiana variants with wild type M protein (HR and TP6), to the same level as inhibition of caspase-8 (Fig. 5a), which can be independent of mitochondria-related apoptosis by directly activating the effector caspase-3 (Hentgartner, 2000). Partial protection by caspase-8 and -9 inhibitors therefore suggests that intrinsic (caspase-9 associated) and extrinsic (caspase-8 associated) pathways of apoptosis are both important in regulating VSV-induced apoptosis, as is the case for Sindbis virus (Nava *et al.*, 1998). Moreover, the pan-caspase inhibitor ZVAD-fmk protected from VSV-induced cell death, as up to 80% of mitochondrial metabolic activity remained at 48 hours p.i. (Fig. 5a) and up to 70% at 68 hours p.i. (data not shown). This indicates that caspase-related apoptosis is implicated in cell death but also that a fraction of the cells may die by alternative death pathways such as passive

necrosis. Poliovirus has been shown to induce cell death by distinct pathways which could lead to caspase-related apoptosis or classical cytopathic effect (CPE) leading to death even in the presence of caspase-inhibitors (Agol *et al.*, 1998). Moreover ZVAD-fmk did not completely protect from cell rounding, a well documented VSV-induced CPE. Others have recently observed the same pattern of survival during VSV infection of C6 rat glial cells when using ZVAD-fmk and specific inhibitors of caspase-8, -9 or even -3 (Balachandran *et al.*, 2001). Even though the mean metabolic activity of H4 cells infected by M mutant T1026R1 appeared to be reduced in the presence of caspase-9 inhibitor (Z-LEHD) compared to ZVAD, the difference is not significantly different (ANOVA $p > 0.05$). This could imply differences in induction of apoptotic pathways between M mutants and wild type Indiana. On the other hand, like cells infected with wild-type Indiana virus, infection with this mutant in the presence of both Z-LEHD and Z-IETD did not protect the cells from death as well as ZVAD (ANOVA $p < 0.01$), suggesting that other proteases are involved in the induction of apoptosis. Calpain is a cysteine protease that has been linked to activation of caspase-3 in rat brain (Blomgren *et al.*, 2001), and it can be activated during reovirus infection (Debiasi *et al.*, 1999). Given these facts, characterization of calpain activation during infection by our different VSV variants is currently underway to determine if it could account for differences in caspase-3 activation by the less cytopathic viruses.

It has been reported that VSV was partially inhibited in its capacity to produce infectious virions in Hep-2 cells undergoing apoptosis (Koyama *et al.*, 1998). Despite a 10- fold reduction in virion production at 10 hours p.i. when cells were undergoing

apoptosis, these authors suggested that the replicative cycle of VSV was not significantly affected. Although our results indicate the same tendency, the differences appeared at later times, ZVAD-fmk being associated with a better production of infectious virions for Indiana variants between 45 and 72 hours p.i. (Fig. 6a and 6b). At this time in the infection, the increase in titers of infectious virions reached its maximum and went as high as 283-fold for TP6 when caspases are inhibited by ZVAD-fmk. This is in agreement with the fact that during a normal infection, there is an important drop of pfus production for TP6 between 45 and 72 hours (Fig. 2b)

In conclusion, it appears from our results that apoptotic cell death is important during VSV infection and that a restricted activation of this pathway by less cytopathic variants of VSV may lead to a persistent infection of neural cells. Moreover, VSV-induced apoptosis during wild type Indiana infection seems to be a potent mechanism to limit viral replication and to prevent viral persistence in a human neural cell line. Infection of neural cells *in vitro* does not necessarily recreate all the complexity of the CNS but viral persistence at this privileged site has been extensively described. Of course, further investigation has to be made to correlate our results to the situation *in vivo*. However it is already known that VSV mutant T1026 is associated with possible persistence and delayed CNS pathology in newborn hamsters (Stanners *et al.* 1975). Moreover, modulation of apoptosis has been described as a viral strategy that can permit the establishment of persistence in other systems (Shen and Shenk, 1995; Hardwick, 1998; Kalvakolanu, 1999). Hallmarks of apoptosis have been reported to appear in the mouse olfactory bulb during VSV Indiana wild type infection. Thus, studying how the

apoptotic process may be modulated or impaired during infection of neural cells should further our understanding of the establishment of a long term infection that may be associated with neurodegenerative diseases. Further investigation also remains necessary to explain the complete pathways of programmed cell death related to VSV infection of neural cells. In trying to identify what cellular and viral factors are important for cell death to happen it should be possible to understand why and how persistent infection can be established and maintained in neural cells by usually cytopathic viruses such as VSV. Furthermore, knowing that VSV is currently studied in relation to its possible use in cancer therapy (Stojdl *et al.*, 2000; Balachandran *et al.*, 2001), it is of major importance to understand how VSV persistence may appear in infected cells, especially in the CNS.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Éric Rassart and Francois Denis for helpful discussions and continuous support and Dr. Pierre Paquin for help with statistical analysis. This work was supported by funds from the Natural Sciences and Engineering Council of Canada (NSERC) and Université du Québec à Montréal to L. Poliquin and Canadian Institutes for Health Research (CIHR) to P.J. Talbot and by Public Health Service Grant AI32983 to D. S. Lyles from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. M. Desforges was supported by a CIHR studentship and G. Despars by a NSERC studentship.

REFERENCES

Agol, V.I., Belov, G.A., Bienz, K., Egger, D., Kolesnikova, M.S., Raikhlin, N.T., Romanova, L.I., Smirnova, E.A. and Tolskaya, E.A. (1998). Two types of death of poliovirus-infected cells: caspase involvement in the apoptosis but not cytopathic effect.

Allsopp, T.E., Scallan, M.F., Williams, A. and Fazakerley, J.K. (1998). Virus infection induces neuronal apoptosis: a comparison with trophic factor withdrawal. *Cell Death Diff.* **5**, 50-59.

Arbour, N., Côté, G., Lachance, C., Tardieu, M., Cashman, N.R., and Talbot, P.J. (1999a). Acute and persistent infection of human neural cell lines by human coronavirus OC43. *J. Virol.* **73**, 3338-3350.

Arbour, N., Ékandé, S., Côté, G., Lachance, C., Chagnon, F., Cashman, N.R., and Talbot, P.J. (1999b). Persistent infection of human oligodendrocytic and neuronal cell lines by human coronavirus 229E. *J. Virol.* **73**, 3326-3337.

Arbour, N., Day, R., Newcombe, J., and Talbot, P.J. (2000) Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. *J. Virol.* **74**, 8913-8921.

Balachandran, S., Roberts, P.C., Kipperman, T., Bhalla, K.N., Compans, R.W., Archer, D.R. and Barber, G.N. (2000). Alpha/Beta interferons potentiate virus-induced apoptosis through activation of the FADD/caspase-8 death signaling pathway. *J. Virol.* **74**, 1513-1523.

Balachandran, S., Porosnicu, M. and Barber, G.N. (2001). Oncolytic activity of vesicular stomatitis virus is effective against tumors exhibiting aberrant p53, Ras, or Myc function and involves the induction of apoptosis. *J. Virol.* **75**, 3474-3479.

Barrera, J. del C. et Letchworth, G.J. (1996). Persistence of vesicular stomatitis virus New Jersey RNA in convalescent hamsters. *Virology* **219**,453-464.

Bi, Z., Quant, P., Komatsu, T., Barna, M. and Reiss, C.S. (1995). IL-12 promotes enhanced recovery from vesicular stomatitis virus infection of the central nervous system. *J. Immunol.* **155**, 5684-5689.

Black, B.L. and Lyles, D.S. (1992). Vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits host cell-directed transcription of target genes in vivo. *J. Virol.* **66**, 4058-4064.

Black, B. L., Brewer, G. and Lyles D.S. (1994).. Effect of vesicular stomatitis virus matrix protein on host-directed translation in vivo. *J. Virol.* **68**:555-560.

Blomgren, K., Zhu, C., Wang, X., Karlsson, J-O., Leverin, A-L., Bahr, B.A., Mallard, C. and Hagberg, H. (2001). Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia. *J. Biol.Chem.* **276**, 10191-10198.

Buchmeier, M.J. and Lane, T. (1999). Viral-induced neurodegenerative disease. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 398-402

Castro, R.F., Evans, G.D., Jaszewski, A. and Perlman, S. (1994). Corona virus-induced demyelination occurs in the presence of virus-specific cytotoxic T cells. *Virology* **200**, 733-743.

Chen, W. and Baric, R.S. (1996). Molecular anatomy of mouse hepatitis virus persistence: coevolution of increased host cell resistance and virus virulence. *J. Virol.* **70**, 3947-3960.

Cory, A.H., Owen, T.C., Barltrop, J.A., and Cory, J.G. (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer comm.* **3**, 207-212.

Debiasi, R.L., Squier, M.K.T., Pike, B., Wynes, M., Dermody, T.S., Cohen, J.J. and Tyler, K.L. (1999). Reovirus-induced apoptosis is preceded by increased cellular calpain activity and is blocked by calpain inhibitors. *J. Virol.* **73**, 695-701.

de la Torre, J.C. and Oldstone, M.B.A. (1996). Anatomy of viral persistence : Mechanisms of persistence and associated disease. *Adv. Virus Res.* **46**, 311-343.

Desforges, M., Charron, J., Bérard, S., Beausoleil, S., Stojdl, D.F., Despars, G., Laverdière, B., Bell, J.C., Talbot, P.J., Stanners, C.P. and Poliquin, L. (2001). Different host-cell shutoff strategies related to the matrix protein lead to persistence of vesicular stomatitis virus mutants on fibroblast cells. *Virus. Res.* **76**, 87-102.

Earnshaw, W.C., Martins, L.M. and Kaufmann, S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates and function during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 383-424.

Francoeur, A.M., Poliquin, L. and Stanners, C.P. (1987). The isolation of interferon-inducing mutants of vesicular stomatitis virus with altered viral P function for the inhibition of total protein synthesis. *Virology* **160**, 236-245.

Fultz, P.N., Shaddock, J.A., Kang, C.Y. and Streilen, J.W. (1982). Vesicular stomatitis virus can establish persistent infections in Syrian hamsters. *J. Gen. Virol.* **63**, 493-497.

Gill, D.S. and Banerjee, A.K. (1986). Complete nucleotide sequence of the matrix protein mRNA of vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype). *Virology* **150**, 308-312.

Griffin, D.E. and Hardwick, J.M. (1999). Perspective: virus infections and the death of neurons. *Trends Microbiol.* **7**, 155-60

Haase, A.T., Gantz, D., Eble, B., Walker, D., Stowring, L., Ventura, P., Blum, H., Wietgreffe, S., Zupancic, M., Tourtelotte, W., Gibbs, C.J., Norrby, E. and Rozenblatt, S. (1985). Natural history of restricted synthesis and expression of measles virus genes in subacute sclerosing panencephalitis *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 3020-3024.

Hardwick, J.M. (1998). Viral interference with apoptosis. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **9**, 339-349.

Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-776

Houtman, J.J. and Fleming, J.O. (1996). Pathogenesis of mouse hepatitis virus-induced demyelination. *J. Neurovirol.* **2**, 361-376.

Huneycutt, B.S., Plakhov, I.V., Shusterman, Z., Bartido, S.M., Huang, A., Reiss, C.S., and Aoki, C. (1994). Distribution of vesicular stomatitis virus proteins in the brains of BALB/c mice following intranasal inoculation: an immunohistochemical analysis. *Brain Res.* **635**, 81-95.

Huprikar, J., Rabinowitz, S.G., DalCanto, M.C. and Rundell, M.K. (1986). Persistent infection of a temperature-sensitive G31 vesicular stomatitis virus mutant in neural and nonneural cells: biological and virological characteristics. *J. Virol.* **58**, 493-499.

Jelachich, M.L. and Lipton, H.L. (1996). Theiler's murine encephalomyelitis virus kills restrictive but not permissive cells by apoptosis. *J. Virol.* **70**, 6856-6861.

Kalvakolanu, D.V. (1999). Virus interception of cytokine-regulated pathways. *Trends Microbiol.* **7**, 166-171.

Kopecky, S.A., Willingham, M.C. and Lyles, D.S. (2001). Matrix protein and another viral component contribute to induction of apoptosis in cells infected with vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* **75**, 12169-12181

Koyama, A.H. (1995). Induction of apoptotic DNA fragmentation by the infection of vesicular stomatitis virus. *Virus Res.* **37**, 285-290.

Koyama, A.H., Irie, H., Fukumori, T., Hata, S., Iida, S., Akari, H. and Adachi, A. (1998). Role of virus-induced apoptosis in a host defense mechanism against virus infection. *J. Med. Invest.* **45**, 37-45.

Lavi, E., Suzumura, A., Hirayama, M., Highkin, M.K., Dambach, D.M., Silberberg, D.H. and Weiss, S.R. (1987). Coronavirus mouse hepatitis virus (MHV)-A59 causes a persistent, productive infection in primary glial cell cultures. *Microb. Pathog.* **3**, 79-86.

Levine, B., Huang, Q., Isaacs, J.T., Reed, J.C., Griffin, D.E. and Hardwick, J.M. (1993). Conversion of lytic to persistent alphavirus infection by the Bcl-2 cellular oncogene. *Nature* **361**, 739-742.

Liao, C-L., Lin, Y-L., Shen, S-C., Shen, J-Y., Su, H-L., Huang, Y-L., Ma, S-H., Sun, Y-C., Chen, K-P. and Chen, L.K. (1998). Antiapoptotic but not antiviral function of human bcl-2 assists establishment of Japanese encephalitis virus persistence in cultured cells. *J. Virol.* **72**, 9844-9854.

Marcellus, R.C., Lavoie, J.N., Boivin, D., Shore, G.C., Ketner, G. and Branton, P.E. (1998). The early region 4 orf4 protein of human adenovirus type 5 induces p53-independent cell death by apoptosis. *J. Virol.* **72**, 7144-7153.

Miller, S.D., Vanderlugt, C.L., Smith Begolka, W., Pao, W., Yauch, R.L., Neville, K.L., Katz-Levy, Y., Carrizosa, A. and Kim, B.S. (1997). Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading *Nature Med.* **3**, 1133-1136.

Nava, V.E., Rosen, A., Veliuona, M.A., Clem, R.J., Levine, B. and Hardwick, J.M. (1998). Sindbis virus induces apoptosis through a caspase-dependent, CrmA-sensitive pathway. *J. Virol.* **72**, 452-459.

Nunez, G., Benedict, M.A., Hu, Y. and Inohara, N. (1998). Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* **17**, 3237-3245.

Oldstone, M.B.A. (1989). Viral persistence. *Cell.* **56**, 517-520.

Plakhov, I.V., Arlund, E.E., Aoki, C., and Reiss, C.S. (1995). The earliest events in vesicular stomatitis virus infection of the murine olfactory neuroepithelium and entry of the central nervous system. *Virology* **209**, 257-262.

Razvi, E.S. and Welch, R.M. (1995). Apoptosis in viral infection. *Adv. virus res.* **45**, 3-60.

Rose, J.K. and Gallione, C.J. (1981). Nucleotide sequences of the mRNA's encoding the vesicular stomatitis virus G and M proteins determined from cDNA clones containing the complete coding regions. *J. Virol.* **39**, 519-528.

Scallan, M.F., Allsopp, T.E. and Fazakerly, J.K. (1997). Bcl-2 acts early to restrict Semliki Forest Virus replication and delays virus-induced programmed cell death. *J. Virol.* **71**, 1583-1590.

Shen, Y. and Shenk, T.E. (1995). Viruses and apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**, 105-111.

Schneider-Schaulies, S. and ter Meulen, V. (1999). Pathogenic aspects of measles virus infections. *Arch. Virol. Suppl.* **15**, 139-158.

Stanners, C.P., Farmilo, A.J., and Goldberg, V.J. (1975a). Effects in vitro and in vivo of a mutant of vesicular stomatitis virus with attenuated cytopathogenicity. *In* Negative strand viruses. Editors: B.W.J. Mahy and R.D. Barry. Academic Press, London. pp.785-798.

Stanners, C.P. and Goldberg, V.J. (1975b). On the neurotropism of vesicular stomatitis virus in newborn hamsters. Studies with temperature-sensitive mutants. *J. Gen. Virol.* **29**, 281-296.

Stojdl, D.F., Lichty, B., Knowles, S., Marius, R., Atkins, H., Sonenberg, N. and Bell, J.C. (2000). Exploiting tumorspecific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nature Med.* **6**, 821-825.

Strack, P.R., Frey, M.W., Rizzo, C.J., Cordova, B., George, H.J., Meade, R., Ho, S.P., Corman, J., Tritch, R. and Korant, B.D. (1996). Apoptosis mediated by HIV protease is preceded by cleavage of Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9571-9576.

Talbot, P.J., Arnold, D. and Antel, J.P. (2001). Virus-induced autoimmune reactions in the CNS. The mechanisms of neuronal damage in virus infections of the nervous system.. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **253**, 247-271.

Teodoro, J.G., and Branton, P.E. (1997). Regulation of apoptosis by viral gene products. *J. Virol.* **71**, 1739-1746.

Tsunoda, I., Kurtz, C.I.B. and Fujinami, R.S. (1997). Apoptosis in acute and chronic central nervous system disease induced by Theiler's murine encephalomyelitis virus. *Virology* **228**, 388-393.

Ubol, S., Sukwattanapan, C. and Utaisincharoen, P. (1998). Rabies virus replication induces Bax-related, caspase dependent apoptosis in mouse neuroblastoma cells. *Virus Res.* **56**, 207-215.

Wege, H., Schluesener, H., Meyermann, R., Barac-Latas, V., Suchanek, G. and Lassmann, H. (1998). Coronavirus infection and demyelination. Development of inflammatory lesions in Lewis rats. *Adv. Exp. Med. Biol.* **440**, 437-444.

LEGENDS TO FIGURES

Fig. 1- Persistent infection of H4 cells by VSV variants. (A) Production of infectious virus was measured by plaque assay up to 120 days post-infection.

◆ T1026, ◇ T1026R1, △ TP3 and ✕ New Jersey serotype. (B) Detection of viral proteins by indirect immunofluorescence with a polyclonal antiviral antiserum (green-yellow) during the course of persistent infection. Magnification 200x. Cells were counterstained with Evans blue dye (red) to allow visualization of all cells in the culture.

Fig. 2- (A) Cell survival after infection with VSV variants (m.o.i. of 1) evaluated by Trypan blue dye exclusion and (B) production of infectious virus during short term events (first three days) of infection.

Fig. 3- Comparison of virus-induced apoptosis. (A) left-hand panel: Micrograph of TUNEL assay at 16 h post-infection (magnification 200x); right-hand panel: quantification of TUNEL-positive cells (5 fields of more than 50 cells, 2 independent experiments). (B) DNA fragmentation analysis on 1.8% (w/v) agarose gel stained with EtBr 0.5 µg/ml ; m is 100-basepair DNA ladder.

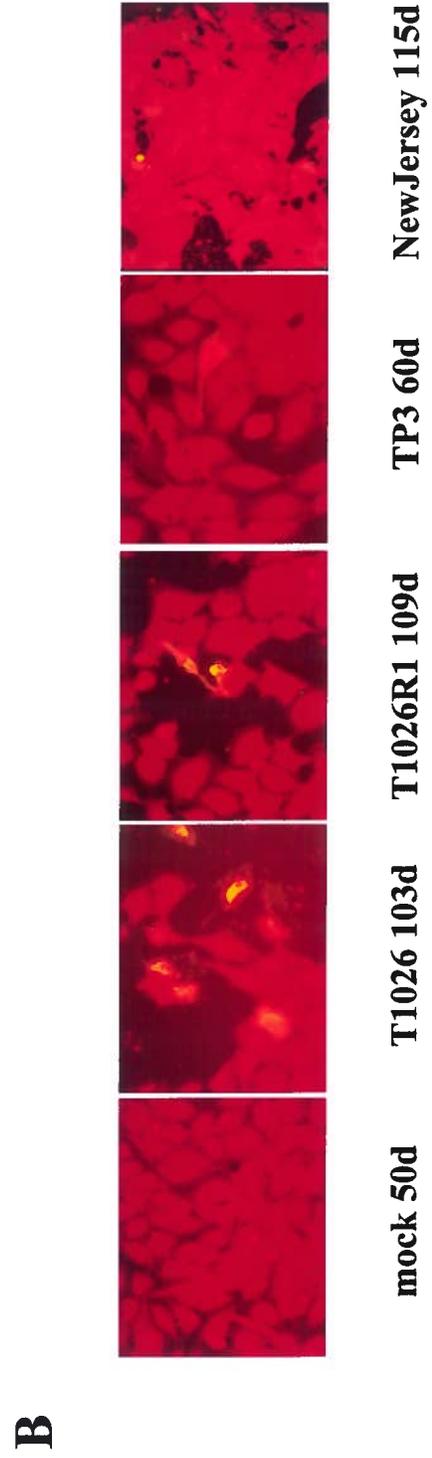
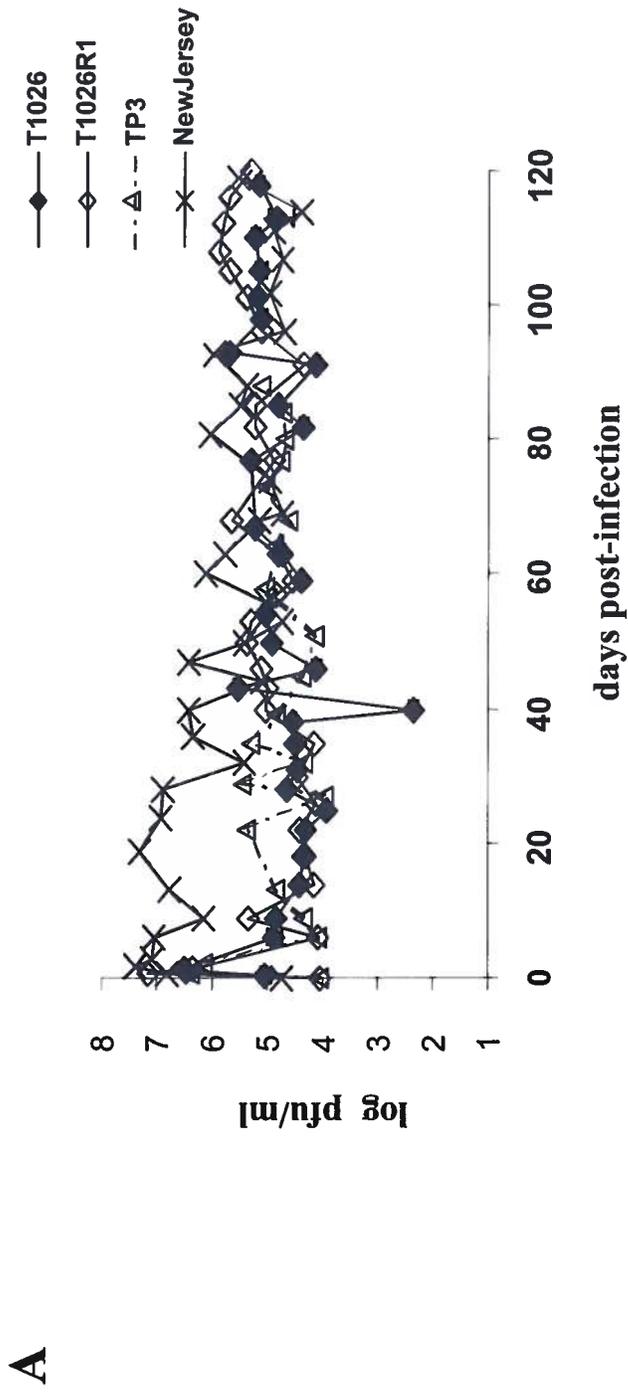
Fig. 4- Evaluation of caspase-3 during infection. (A) Measurement of enzymatic activity was performed at 3, 17, 24 and 42 h post-infection for Indiana M mutants and New Jersey serotype and at 3, 17 and 24 h post-infection for HR-Ind and TP6, the two variants that do not persist. Comparison was performed at 17 and 24 h and statistical analysis (ANOVA) shows that the difference in caspase-3 activity induction is significant between the viruses that did persist and those that did not, as indicated by the p values. ** $p < 0.01$, differences are significant, *** $p < 0.001$, differences are highly significant. Values of fold induction represent the mean for 5 different experiments in duplicate. The bars represent the standard deviations. (B) Evaluation of caspase-3 activation by western blot analysis. Cleavage of procaspase-3 (32 kDa) into smaller fragments (19 and 17 kDa) indicates that caspase-3 is activated at different levels by the different VSV variants at 18 h post infection. Lane 1: mock 18h; lane 2: mock 40h; lane 3: HR 18h; lane 4: TP6 18h; lane 5: T1026R1 18h; lane 6: TP3 18h; lane 7: NewJersey 18h.

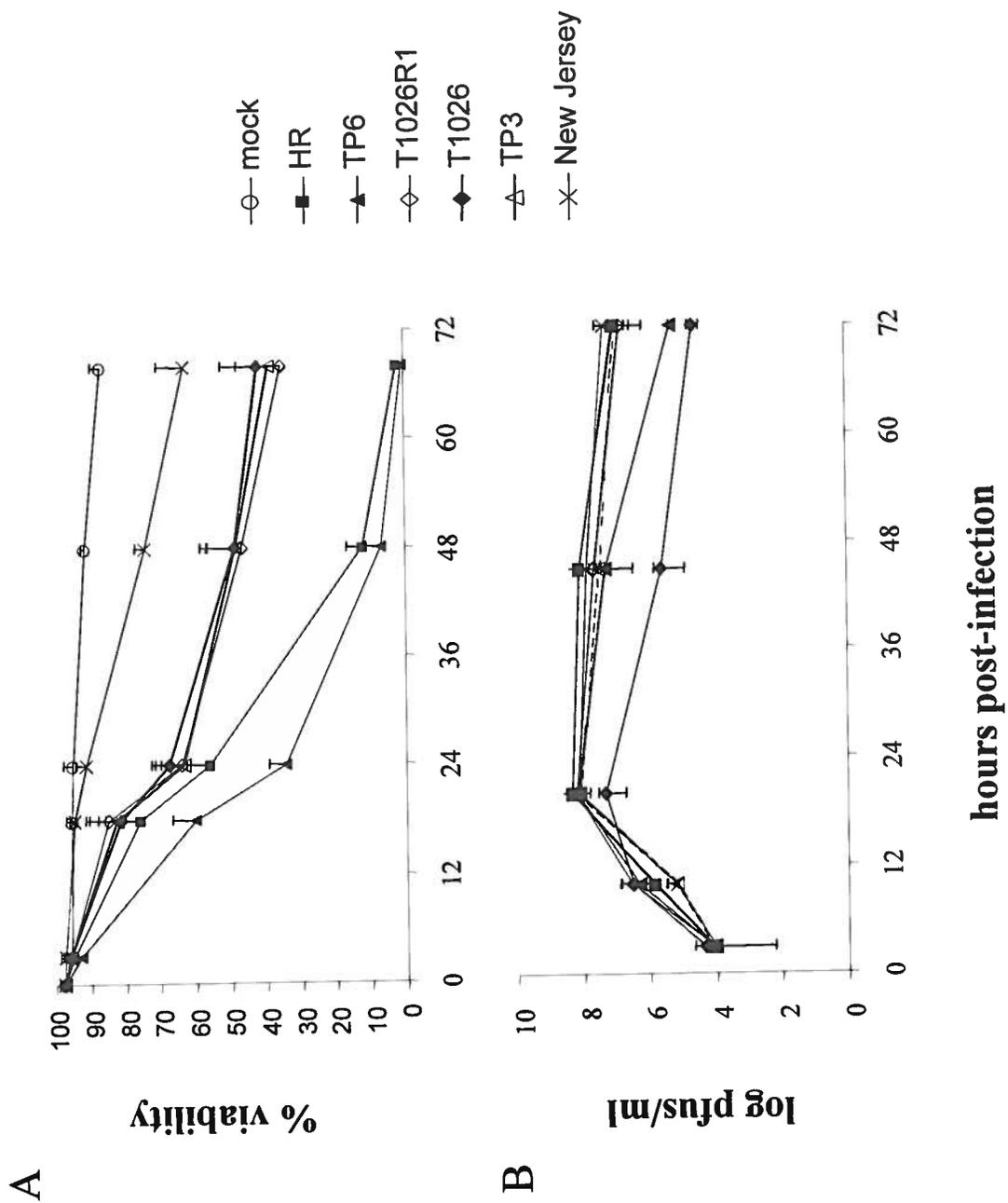
Fig 5- Modulation of apoptosis allows longer cell survival. (A) Evaluation of metabolic activity of the cells by MTS-PMS at 48 h post-infection (m.o.i. 1) reveals caspase-dependent apoptosis (units are % of metabolic activity measured by optical density at 540 nm as compared to mock infected cells). DMSO is the inhibitors solvent, ZFA is a negative control for caspase inhibitors, ZVAD-fmk is a pan-caspase inhibitor, Z-IETD-fmk is a caspase-8 inhibitor and Z-LEHD-fmk is a caspase-9 inhibitor. (B)

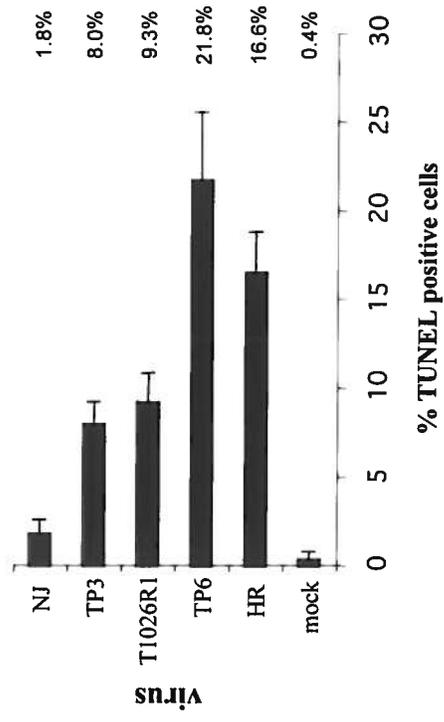
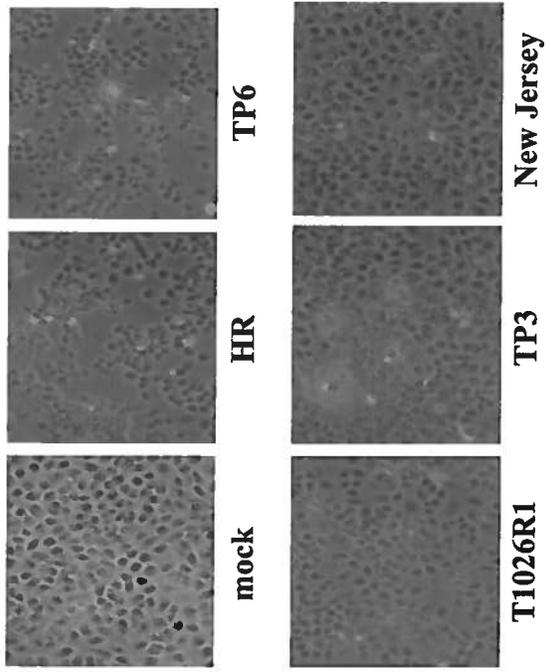
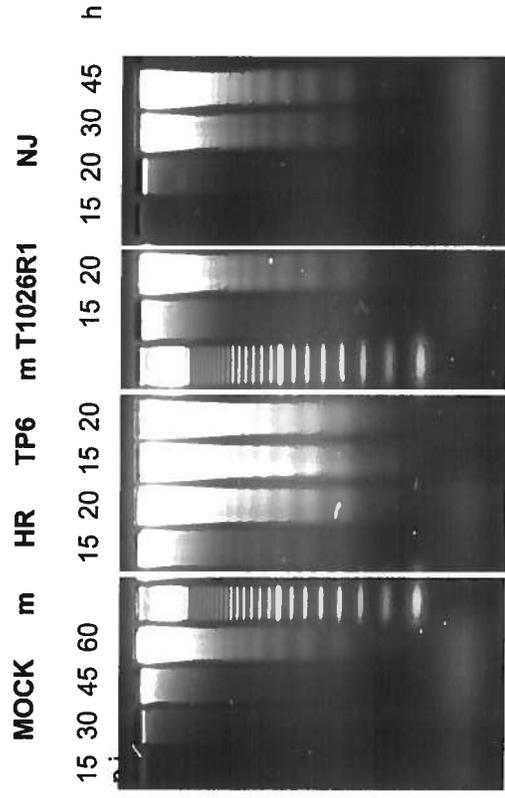
Evaluation of viability by trypan blue dye exclusion of H4 cells subpopulation overexpressing Bcl-2. Bcl-2 overexpression delays cell death significantly. (C) Evaluation of metabolic activity of the H4 cells Five clones overexpressing Bcl-2 or Bcl-XL were infected and metabolic activity was measured by MTS-PMS at 48 h post-infection (m.o.i. 1)

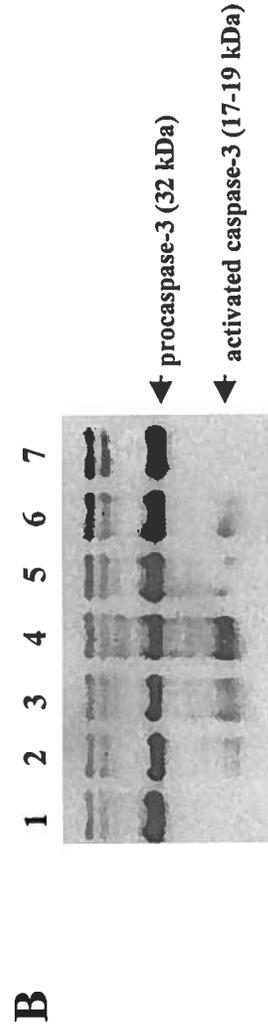
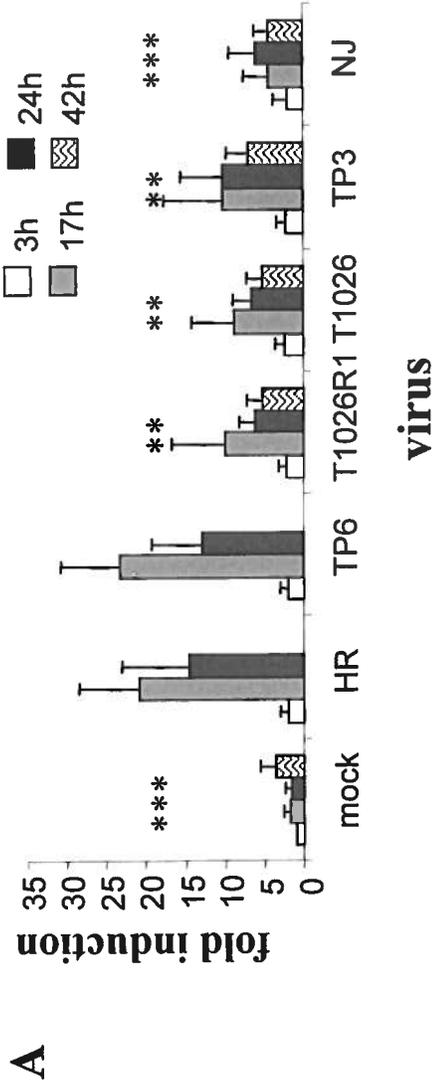
Fig. 6-.Infectious virus production in the presence or absence of caspase-related apoptosis inhibitors. (A) Inhibition of caspases by pan-caspase inhibitor ZVAD-fmk led to increased production of viruses between 45 and 72 h p.i.. (B) Ratio of infectious virus production (pfu) in the presence of caspase inhibitor ZVAD-fmk over infectious virus production in the presence of DMSO at 45 and 72h indicated a better production of infectious virions for all Indiana variants when caspases were inhibited.

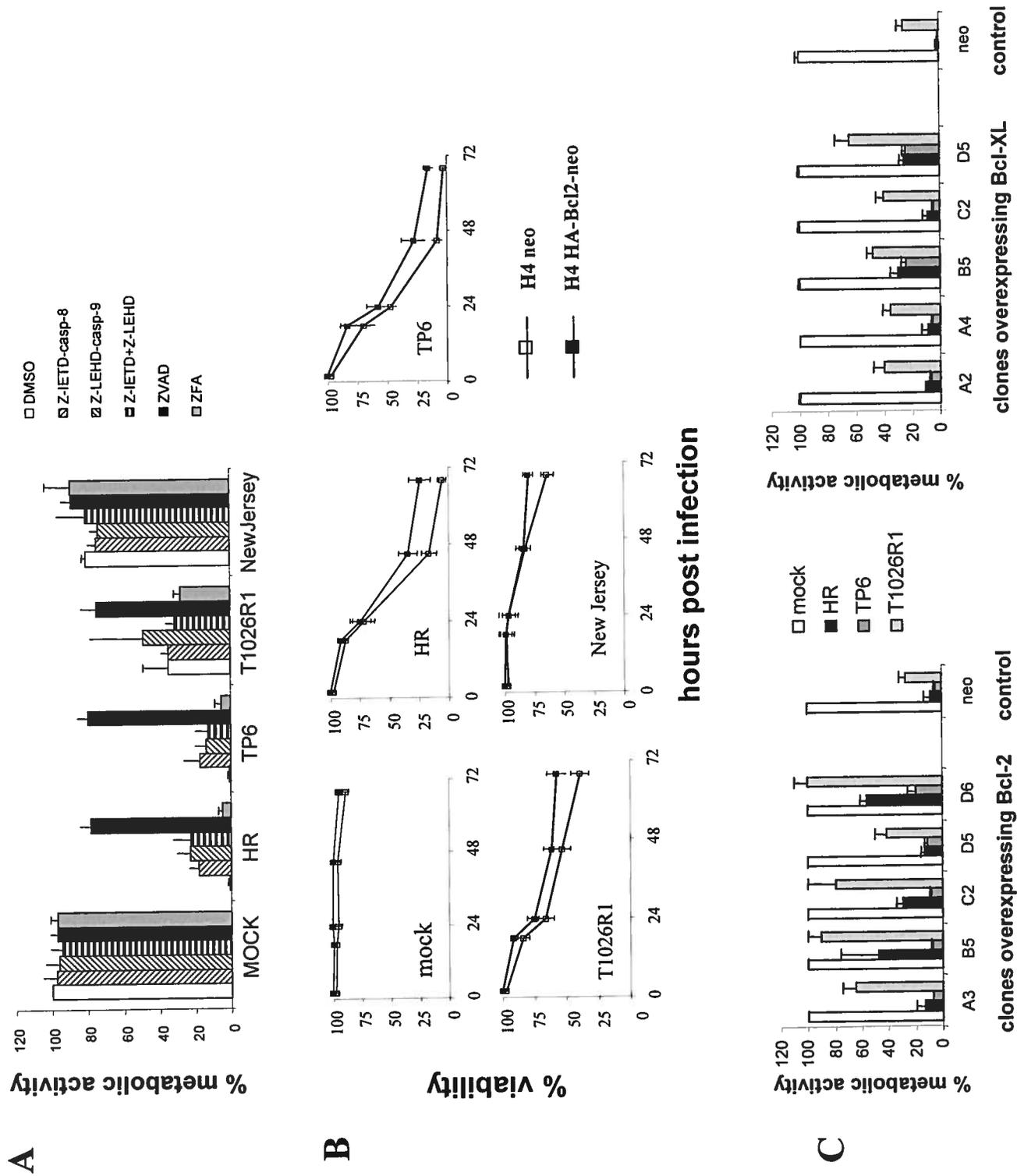
Fig.7- VSV M protein is related to the induction of apoptosis. H4 Cells were seeded the day before transfection in 4 well slides and left untreated (a,e), treated with Lipofectamine alone (b,f), transfected with T1026R1 mutant M mRNA (c,g), or transfected with wild type M mRNA (d,h). Cells were fixed 18 h post-transfection and the TUNEL reaction was performed. The same micrographs are shown under fluorescence for TUNEL assay (a,b,c,d) and phase contrast (e,f,g,h). Magnification 200x (Representative field of two independent experiments).

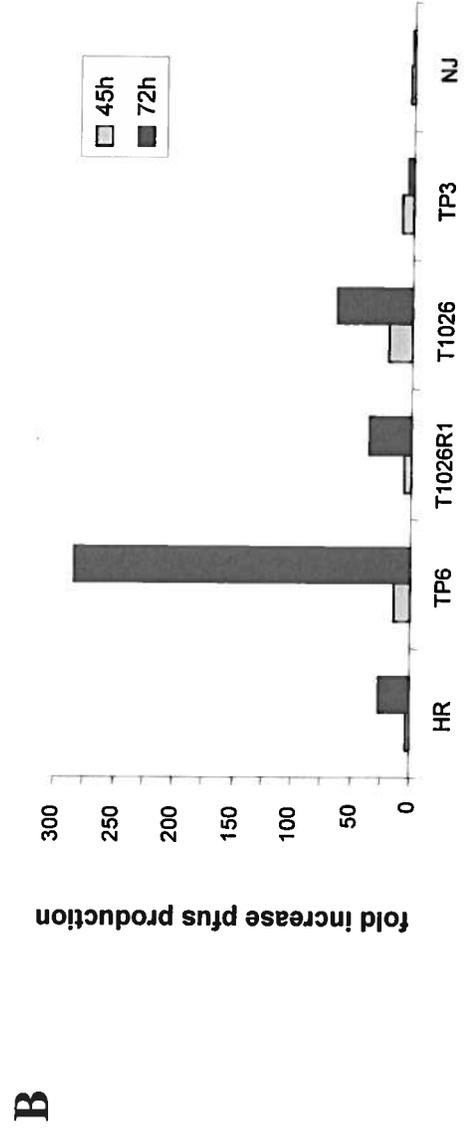
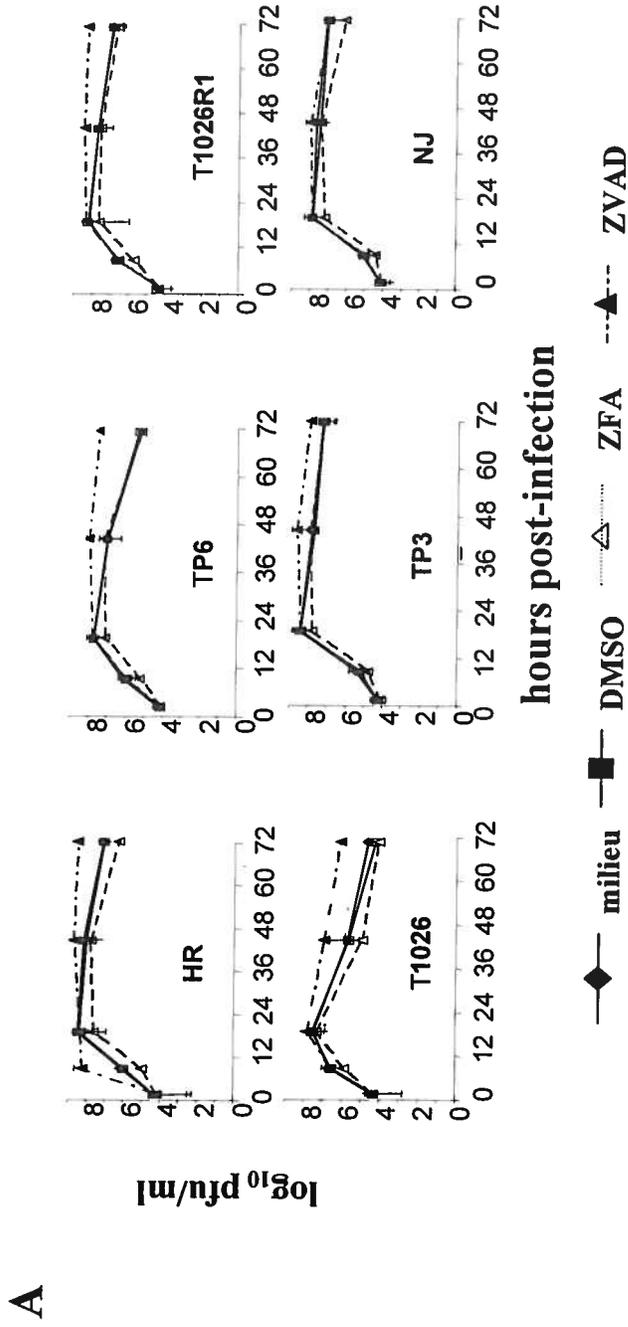


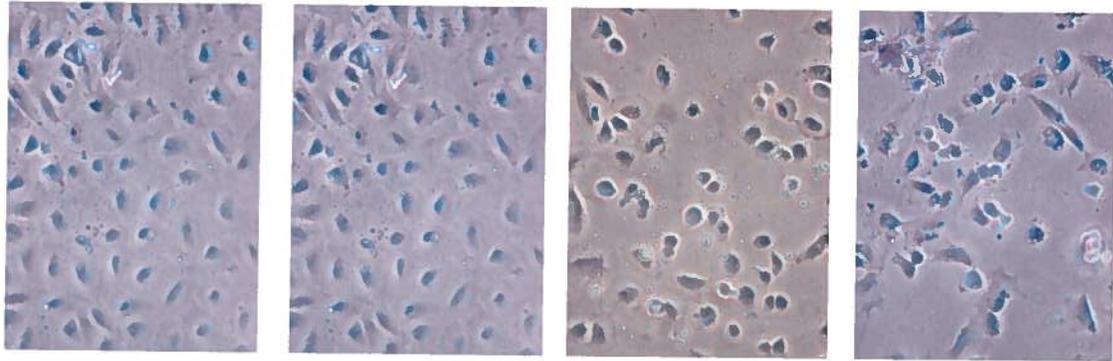


A**B**







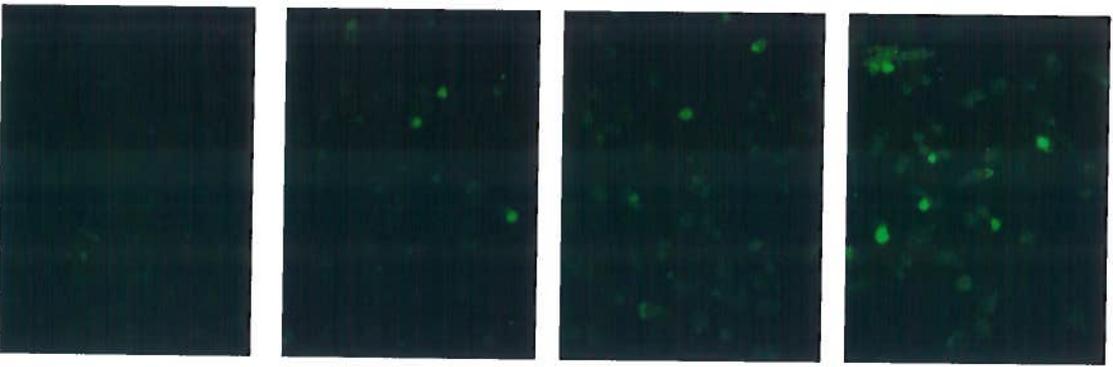


e

f

g

h



a

b

c

d

Table I

Relation between the studied VSV variants ability to persist on H4 human neural cells and mutation in the M gene compared to Indiana-HR.

Virus	M gene mutation	Other known mutation	Persistence
Indiana-HR	– ^a	No	No
TP6	none ^b	No	No
T1026	M ₅₁ R ^b	Lts	Yes
T1026R1	M ₅₁ R ^b	No	Yes
TP3	V ₂₂₁ F, S ₂₂₆ R ^b	No	Yes
New Jersey	62% homology ^c	–	Yes

a sequence of M gene ; Rose and Galione, 1981

b sequence of M gene ; Desforges *et al.*, 2001

c The M gene sequence of New Jersey Hazelhurst serotype is not known but the sequence of Ogden serotype presents a 62% homology with Indiana ; Gills and Banerjee, 1986

CHAPITRE III : *Vesicular stomatitis virus-induced apoptosis in human neural cells is associated with Bax translocation to the mitochondria and activation of caspase-8*

Soumis pour publication à *Journal of General Virology*, 10 juin 2003

Nouvelle version modifiée en préparation novembre 2003

VESICULAR STOMATITIS VIRUS-INDUCED APOPTOSIS IN HUMAN NEURAL CELLS
IS ASSOCIATED WITH BAX TRANSLOCATION TO THE MITOCHONDRIA
AND ACTIVATION OF CASPASE-8

Marc Desforges^{1,2}, Pierre J. Talbot², and Laurent Poliquin^{1*}

Running title: Mechanisms of apoptosis induction by Vesicular Stomatitis Virus

¹Department of Biological Sciences, Université du Québec à Montréal, Montréal,
Québec, Canada H3C 3P8

²INRS-Armand Frappier Institute, Laval, Qc, Canada H7V 1B7

*corresponding author : Department of biological sciences,
Univ. du Québec à Montréal,
P.O. box 8888, Station Centre-ville,
Montreal, Qc
Canada H3C 3P8
Phone : 514-987-3000, ext. 6192
Fax : 514-987-4647

Email : poliquin.laurent@uqam.ca

SUMMARY

Vesicular Stomatitis Virus (VSV) infects neural cells and induces apoptosis with varying efficiencies depending on the viral variant used. In order to identify factors accounting for these differences, characterization of apoptosis pathways was undertaken in the neural human cell line H4 infected with a panel of VSV variants. Hallmarks of apoptosis were evident, without significant modulation in the levels of Bcl-2 and Bax proteins and transcriptional activity of p53. However, VSV-HR and TP6, which both have a wild type matrix (M) protein, induced a more rapid and massive relocation of Bax to the mitochondria, simultaneously favoring cytochrome c release into the cytosol. Our results also indicate that caspase-8 was involved in VSV-induced apoptosis, especially during infection by the two non-persisting viruses HR and TP6, as suggested by a more important caspase-8-like activity early in the infection and by increased cell survival at two days p.i. in cFLIP-overexpressing cells. Moreover, cFLIP and Bcl-2 overexpression both inhibited this caspase-8-like activity and altered caspase 3 activation. Taken together our result suggest that VSV can induce apoptosis mainly through the mitochondria-related pathway and that there is a possible crosstalk between the activation of caspase 3 and caspase 8. Less cytotoxic VSV variants had a defect in the induction of apoptosis, a process which may participate in the short term events important for the establishment of a persistent infection in human neural cells.

INTRODUCTION

Apoptosis is involved in virus-mediated cell death and it appears to be induced and modulated by various viruses (Koyama *et al.*, 2000; Griffin and Hardwick, 1999; Teodoro and Branton, 1997). Apoptosis is complex and highly regulated and it may have various consequences during a viral infection. Nevertheless, apoptosis appears to represent a defence mechanism for the host (Barber, 2001; Allsopp *et al.*, 1998, Teodoro and Branton, 1997). Indeed, this is supported by the fact that many different viruses have developed strategies to overcome premature programmed cell death (Benedict *et al.*, 2002).

Vesicular Stomatitis Virus (VSV), a member of the *Rhabdoviridae* family from the order *Mononegavirales*, is a small RNA virus that developed a very rapid multiplication cycle to circumvent induction of apoptosis (Koyama *et al.*, 1998). Infection by VSV produces a large progeny; despite the fact that it usually leads to rapid cell death in part through apoptosis involvement (Balachandran *et al.*, 2000; 2001; Desforges *et al.*, 2002; Koyama, 1995). Nevertheless, VSV variants may persist in several cell cultures (Desforges *et al.*, 2001; Stanners *et al.*, 1975) including neural cells (Desforges *et al.*, 2002; Huprikar *et al.*, 1986) and have been studied to investigate mechanisms involved in the initiation of a persistent infection. Inappropriate control of apoptosis may be profitable to viruses, with potential deleterious effects to the host. Moreover, we have already shown that inefficient apoptosis induction was related to the establishment of VSV persistence in human neural cells (Desforges *et al.*, 2002). Importantly, VSV has been described as a neurotropic (Huneycutt *et al.*, 1994; Plakhov *et al.*, 1995) and neuroinvasive virus (Fultz *et al.*, 1982) and is currently studied in

relation to its possible use in cancer therapy (Balachandran *et al.*, 2001; Balachandran and Barber, 2000; Stojdl *et al.*, 2000). Therefore, it is of major importance to understand how VSV persistence may be established, especially in human cells representative of the central nervous system (CNS).

In the present study we have investigated apoptosis-related factors in an effort to better understand how VSV-induced apoptosis proceeds and, in turn, how its inefficient regulation could have an implication on the initiation of a persistent infection. As we have reported earlier, the Indiana strain of VSV induces apoptosis very rapidly while a series of matrix (M) protein mutants from the Indiana strain (Desforges *et al.*, 2001; Francoeur *et al.*, 1987) and the less cytopathic wild type New Jersey strain, also kill the cells by apoptosis but to a lesser and slower extent (Desforges *et al.*, 2002). We report here underlying molecular events associated with VSV-induced apoptosis in human neural cells in culture. Regulation of VSV-induced apoptosis was p53-independent and proceeded through a relocation of the proapoptotic protein Bax to the mitochondria and activation of caspase-8. VSV may provide a good model to characterize the importance of an efficient regulation of apoptosis as a mechanism involved in the control of viral persistence in CNS cells. Identifying factors important for cell death to occur is essential to understand why and how a persistent infection can be established and maintained in some neural cells by usually cytopathic viruses

METHODS

Cell lines and viruses

The human neural cell line H4 (ATCC-HTB-148) was grown at 37°C in a 5% (v/v) CO₂ atmosphere, in DMEM culture medium supplemented with 10% (v/v) FCS, 100 units/ml of penicillin G, 100 µg/ml of streptomycin sulfate and fungizone (2.5 µg/ml amphotericin B and 2.5 µg/ml sodium deoxycholate). The wild-type strain of VSV-Indiana HR and the derived M protein mutants were described elsewhere (Desforges *et al.*, 2001; Francoeur *et al.*, 1987). The New Jersey Hazelhurst strain was a gift from Dr. Yong Kang, University of Western Ontario. Reovirus T3D strain was a gift from Dr Guy Lemay, University of Montreal. The relevant characteristics of all VSV variants used for the present study were described earlier (Desforges *et al.*, 2002). Experimental infections were performed at an m.o.i. of 1. Viruses were diluted in PBS containing 2% (v/v) FCS and incubated with the cells for 1 hour at 37°C before washing once with PBS and adding complete DMEM, (culture products were from Invitrogen Life Technologies).

Infectious viral particles production

Aliquots of medium were taken at different times post-infection and titrated by a plaque assay performed as described elsewhere (Desforges *et al.*, 2001).

Protein extraction and Immunoblotting

Cells were scraped into culture medium and washed twice with cold PBS before being frozen at -80°C as a dry pellet. Total cell proteins were extracted with RIPA buffer; (150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 0.5% (w/v) deoxycholate, 0.1% (w/v) SDS,

50mM Tris-HCl pH 8.0 with freshly added 1mM PMSF). After 10 minutes on ice, lysates were centrifuged at 10,000 x *g* for 10 minutes at 4°C. Supernatants were recovered and protein concentration was evaluated. Samples were aliquoted and kept at –20°C until analyzed. Rabbit polyclonal anti-Bax (Santa Cruz) and mouse monoclonal anti-human Bcl-2 (BD Pharmingen) were used at dilution 1/1000 and rabbit anti-actin (Sigma-Aldrich) at 1/1500. All dilutions were in TBS (Tris Buffered Saline pH 7.6; Tris-HCl 20 mM, NaCl 100mM) -0.1% (v/v) Tween-20 with 5% (w/v) dry non-fat milk. Secondary antibodies were anti-rabbit-HRP from Pharmingen (1/5000) or anti-mouse-HRP from KPL (1/5000) in TBS-0.1% (v/v) Tween-20. Analysis of caspase 3 activation was performed with a rabbit polyclonal antibody (gift from Dr. Michele Barry, University of Alberta) at 1/5000 followed by an anti-rabbit-HRP (Amersham Biosciences) secondary antibody at 1/10000.

Subcellular fractionation of proteins was performed according to a protocol modified from both Drapier et al. (1993) and Bronfman et al. (1998). Briefly, detached and adherent cells were collected, washed with cold PBS and transferred into a microtube for a second cold PBS wash followed by lysis on ice for 30 seconds in digitonin buffer (1 mg/ml digitonin, Sigma-Aldrich); 20mM HEPES buffer pH 7.4 (Invitrogen-Life Technologies); 250mM sucrose; 1 mM PMSF, Sigma-Aldrich). Lysates were centrifuged at 14,000 x *g* 30 sec at room temperature and rapidly put on ice. Supernatants were recovered and transferred to another tube; this was the cytosolic fraction (C). Pellet was then lysed in lysis buffer (0.2% (v/v) Triton X-100; 150 mM NaCl; 30 mM Tris-HCl pH 7.2; PMSF 1 mM) for 10 min on ice and then centrifuged at

4°C for 15 min at 5000 x g. Supernatants were considered the mitochondrial fraction (M) and the pelleted nuclear fraction (N) was resuspended in digitonin buffer. Protein concentrations were evaluated and samples were kept at -20°C until analyzed. For all western blot analysis, twenty micrograms of samples were resolved in a 12.5 % (w/v) SDS-PAGE and transferred onto a PVDF membranes (Millipore).

Northern Blotting

Cells were scraped into culture medium, washed twice with cold PBS and kept frozen at -80°C as a dry pellet. Total RNA was extracted with the QIAGEN Rneasy minikit according to the manufacturer's protocol. Fifteen micrograms of total RNA were then run on a 1% (w/v) agarose denaturing gel (MOPS-formaldehyde) and transferred overnight onto a nylon membrane (Osmonics). Probes were prepared by random priming starting from a human Bax cDNA (gift from Dr. Gordon Shore, McGill University) and the hybridization was performed overnight in Church buffer (0.5 M phosphate buffer pH 7.2, 1 mM EDTA, 7% (w/v) SDS) at 65°C.

Indirect immunofluorescence

H4 cells (1.5×10^4) were infected on 16-well glass Lab-Tek slides (Nunc). For confocal photographs (Nikon Eclipse E-800 microscope with leoX N.A. 1.4 objective) and analysis (Bio-Rad Radiance 2000 software), cells were labelled with Mitotrackertm (M7512, Molecular Probes) diluted in fresh DMEM at a final concentration of 250 nM, for 20 min at 37°C at the indicated times post-infection to assess for relocation of the

Bax protein to mitochondria. After removal of the media, cells were fixed for 20 minutes at room temperature with fresh 4% (w/v) paraformaldehyde, permeabilized 5 min with cold methanol at -20°C and washed three times in PBS. Immunodetection of Bax was performed using a rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz, N-20) as primary antibody (1/200) and secondary antibody (1/1500) was F(ab')₂ fragments of anti-rabbit antibodies coupled to Alexafluor 488 (Molecular Probes). Negative control for Bax immunodetection was performed using rabbit IgG (Sigma-Aldrich). Bax relocation was correlated with the induction of DNA fragmentation by staining cells with DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 5 minutes before adding Prolong antifade mounting medium (Molecular Probes) for confocal analysis or Gelvatol as described elsewhere (Bonavia *et al.*, 1997) for standard immunofluorescence analysis (Nikon Eclipse E-800 microscope). All standard immunofluorescence pictures were taken with a digital camera (Nikon Coolpix model 990). Immunofluorescence for the detection of Bax and DAPI staining for evaluation of nuclei fragmentation was also performed during VSV infections in the presence of various inhibitors of cysteine proteases; ZVAD-fmk, Z-IETD-fmk and ZFA-fmk (Enzyme System Products); all dissolved in DMSO at 50 mM and used at 100 μM . The number of cells positive for Bax punctate appearance and for nuclear fragmentation were evaluated by counting six different fields of at least 50 cells in two independent experiments.

Establishment of cell lines and clones overexpressing human FLIP and / or Bcl-2

Transfection of 0.5 µg of pCR3-hFLIP-neo or pCR3-neo DNA (kind gift from Dr. Lars French, Geneva University Medical Center) or 0.5 µg of pRSV-HABcl-2-neo DNA (gift from Dr. Gordon Shore, McGill University) or 0.5 µg of pRSV-HABcl-2 plus 0.5 µg of pCR3-hFLIP-neo were performed using 10 µl of Lipofectamine (Invitrogen-Life Technologies) on H4 cells at two-third confluence in 6-well plates (Falcon). Selection of cells overexpressing human cFLIP and Bcl-2 was performed with G418 (Invitrogen-Life Technologies) at 1 mg/ml and cells were then kept under selection at 800 µg/ml of this selecting agent. RT-PCR analysis was performed using primers listed in Table 1 to detect overexpression of cFLIP and Bcl-2 in cells. Viability of subpopulations composed of 50 different clones overexpressing cFLIP, Bcl-2 or both or of isolated clones overexpressing cFLIP was evaluated by Trypan Blue dye exclusion. The Bcl-2 overexpressing cells used in experiments presented in figure 5 and 7 are those used in Desforges et al. (2002).

Colorimetric measurement of caspase 8-like activation

As the activity of caspase-8 is measured by a colorimetric assay which uses an artificial substrate that represents the consensus sequence recognized by caspase-8 related to its protease activity, we use the term caspase-like activity. H4 (4×10^6) cells were infected and floating and adherent cells were recovered together at the indicated times post-infection. After two washes in cold PBS, cells were counted and the induction of activity was measured with a caspase-8 colorimetric assay using IETD-pNA as substrate (R&D systems) as described by the manufacturer.

RESULTS

Bax gene expression is stable or downregulated following VSV infection

During apoptosis induction, the expression of the Bax gene is often upregulated by the proapoptotic transcriptional factor p53 (Jimenez *et al.*, 1999; May and May, 1999). As shown in Fig.1A, RNA analysis revealed that there was no significant induction of Bax RNA expression during the course of the infection. Subtle variations in the level of Bax transcripts were observed during infection by most VSV variants as well as in mock-infected cells. Starting at 15 h.p.i., there was a significant decrease in the amount of the Bax mRNA for the most cytotoxic virus TP6 (Fig. 2), even though more than 60% of the cells were still alive (Desforges *et al.*, 2002). The same decrease was observed for the actin gene and dot-blot hybridization of total RNA with a poly (dT) probe confirmed that there was a general down-regulation of mRNA expression (data not shown). Ribosomal 28S RNA served as a loading control.

Amounts of Bax and Bcl-2 regulatory proteins remain stable in VSV-infected cells

The equilibrium between the amount of the anti-apoptotic protein Bcl-2 and of the pro-apoptotic protein Bax is a key factor for cell maintenance and survival. These regulators of apoptosis may be modulated during viral infection. Indeed Sindbis virus (Appel *et al.*, 2000), HIV (Aillet *et al.*, 1998; Genini *et al.*, 2001), rubella virus (Megyeri *et al.*, 1999), rabies virus (Ubol *et al.*, 1998) have all been shown to increase the ratio of Bax to Bcl-2 proteins, a situation that leads to cell death (Oltvai *et al.*, 1993).

Nevertheless, western blot analysis showed that there were no significant changes in the total amount of either Bax or Bcl-2 proteins (Figure 1B) in the infected cells for all our VSV variants. Although some apparent variations are observable at different points between 4 and 48 h.p.i, statistical analysis of the average (four experiments) densitometric quantitation of Bax and Bcl-2 protein levels relative to actin levels showed that the differences were not significant (ANOVA, $p \geq 0.05$). The variations in the time points analysed is due to the shorter survival of HR- and TP6-infected cells.

From our results on Bax and Bcl-2 expression during VSV infection, it was tempting to conclude that p53 was dispensable during VSV-induced apoptosis. The functionality of p53 in the H4 cells was thus verified by upregulation of Bax and p21^{waf} (two known targets of p53) after a treatment with 50 nM of camptothecin (CPT), a topoisomerase 1 inhibitor known to induce p53-dependent apoptosis (data not shown). Although a previous report indicated that wild type VSV-Indiana could induce apoptosis in the p53-deficient rodent C6 glial cell line (Balachandran *et al.*, 2001), our results further show that p53 is not involved even when present in a functional state in human cells.

VSV-infected cells undergo Bax relocation to the mitochondria and cytochrome-c efflux towards the cytosol

Recent results (Desforges *et al.*, 2002; Balachandran *et al.*, 2001; 2000) indicated that the mitochondria-associated pathway of apoptosis induction was important during VSV infection, a process related to the M protein of the virus (Kopecky and Lyles, 2003; Desforges *et al.*, 2002). Indeed, overexpression of Bcl-2 or Bcl-XL, two antiapoptotic

regulators of this pathway, partially protected H4 cells from VSV-induced programmed cell death (Desforgues *et al.*, 2002). The absence of modulation in the total amount of Bax protein in VSV-infected cells during apoptosis (Fig. 1B) led us to verify if Bax was translocated to mitochondrial membranes during VSV infection, as is observed during other apoptic stresses (Goping *et al.*, 1998; Wolter *et al.*, 1997). Confocal microscopic analysis revealed that Bax was translocated from the cytosol towards mitochondria where it colocalized with the specific dye MitotrackerTM (Fig. 2A). The strong signal of Bax detection in a punctate appearance is not related to an increase in the total amount of Bax protein in the cell. It rather indicates that Bax is now concentrated in aggregates at the mitochondria compared to a diffuse signal everywhere in mock-infected cells. Furthermore, when Bax relocates to the mitochondria, conformational changes make the epitope recognized by the N-20 antibody more easily detected, so the intensity of the Bax signal becomes stronger (Dubrez *et al.*, 2001)

Subcellular fractionation followed by Western blot analysis (Fig. 2B) was consistent with this observation, as Bax was present in larger amounts in the mitochondrial fraction of VSV-Indiana HR and TP6 infected cells (the two most cytotoxic variants) at 15 hours post-infection and to a lesser extent during the infection by M protein mutant T1026R1. Concomitantly, there was less Bax protein in the cytosol at the same time post-infection. The amount of Bax in the mitochondrial and cytosolic fractions remained unchanged during wild type New Jersey infection as well as for mock-infected cells for up to 20 hours post-infection. A fraction of Bax was also detected in the nuclear fraction from HR and TP6-infected cells and to a lesser extent for

the T1026R1 M protein mutant, a location previously observed during interphase (Hoetelmans *et al.*, 2000).

Bax incorporation in the mitochondrial membrane can induce cytochrome C efflux from the mitochondria to the cytosol. As shown in Fig. 2B, Bax relocation to the mitochondria was accompanied by leakage of cytochrome C towards the cytosolic fraction for HR- and TP6-infected cells, and to a smaller extent for T1026R1-infected cells, in correlation with the virulence of each VSV variants. The absence of cytochrome C in cytosolic and nuclear fractions in the cases where no apoptosis was measured (Fig. 2B, mock-infected cells) led us to believe that the fractions were highly enriched.

Translocation of Bax to the mitochondrial membrane is associated with nuclear condensation and DNA fragmentation.

As Bax was relocated to the mitochondria, we investigated the correlation with the induction of apoptosis. Cells showing a punctate appearance of the protein (Fig. 3A) also showed nuclear condensation or DNA fragmentation, both hallmarks of apoptosis. The number of cells presenting a punctate Bax appearance and DNA fragmentation (Fig. 3A and 3C) was correlated to the virulence of each VSV variant.

Bax translocation to mitochondria during VSV infection of H4 cells is caspase-independent but is delayed by cystein protease inhibitor

Bax translocation to mitochondria can occur through specific activation of caspase 8 (Li *et al.*, 1998) or general activation of caspases (Goping *et al.*, 1998). To verify if it was the case in our model, cells were infected with VSV-TP6, the strongest

inducer of apoptosis, during inhibition of different cysteine proteases that can be linked to this phenomenon. Not only did translocation of Bax to mitochondria continue during inhibition of caspase 8 (zIETD-fmk) or inhibition of all caspases (zVAD-fmk), it even accelerated. Indeed, more cells presented a punctate Bax appearance in the presence of caspase inhibitors (Fig. 4A and B). Despite this increased translocation of Bax, even though some cells presented nuclear condensation, DNA fragmentation was partially (zIETD) or totally (zVAD) inhibited as observed by DAPI staining either at 18h (Fig. 4A) or 24 h (data not shown) post-infection. Moreover, many Bax translocation-positive cells did not even present DNA condensation or morphological changes (Fig. 4A, zVAD, white arrowheads).

Lysosomal proteases cathepsins have been associated with the induction of apoptosis (Stoka *et al.*, 2001). When cathepsin B and L were inhibited (ZFA-fmk), an important delay of Bax translocation to mitochondria at 18 h.p.i. was observed (Fig. 4A). Nevertheless, the effect was transient as Bax appeared in a punctate form characteristic of mitochondrial location in many cells at 24 h post infection (data not shown). We have previously observed that ZFA-fmk, protected cells from death over the first 24 h of infection (unpublished results) and reduced infectious virus production in the first 20 h post-infection for most VSV variants studied (Desforges *et al.*, 2002)., including VSV-TP6.

As a positive control for Bax translocation to the mitochondria, we submitted the cells to camptothecin and etoposide treatment, two anticancer drugs known to induce mitochondria-associated apoptosis through Bax translocation (Godlewski *et al.*, 2001;

Jia *et al.*, 2001). Mock-treated cells (DMSO and DMSO zVAD-fmk) indicated that zVAD-fmk alone did not produce the relocation of Bax to the mitochondria (data not shown).

Overexpression of antiapoptotic molecules Bcl-2 and cFLIP modulate Bax translocation towards mitochondria, virus production and caspase-3 activation

We have shown that Bcl-2 partially protects against VSV-induced cell death. We therefore investigated if this situation was related to the Bax translocation towards mitochondria. Our results indicate that this Bax relocation was strongly inhibited at 18 h.p.i. by overexpression of Bcl-2, but less so by overexpression of cFLIP (Fig.5A). The cathepsin inhibitor ZFA-fmk also delays Bax translocation to mitochondria (Fig. 4A and B) and we have previously reported that it could delay virus production up to 20h.p.i. (Desforges *et al.*, 2002). Therefore, we evaluated whether Bcl-2 overexpression had an effect on viral production as it strongly delayed the induction of apoptosis during VSV-TP6 infection. As shown in Fig.5B, Bcl-2 overexpression delayed virus production by up to 20 fold at 16 h.p.i., although virus production did recover and surpassed the production in control cells at later times. Interestingly, cFLIP also delayed virus production but to a much lesser extent at 16 h.p.i. (about 50%), (Fig.5B). Overexpression of both cFLIP and Bcl-2 had an effect on caspase-3 activation. Indeed, the fragment corresponding to procaspase-3 is already disappearing in *neo* control cells at 14 h post-infection with VSV-TP6 but overexpression of cFLIP delayed this process and Bcl-2 completely abolished it until at least 18 h.p.i. (Fig.5C)

Overexpression of antiapoptotic molecules Bcl-2 and cFLIP partially protects cells from VSV-induced cell death

Microscopic observations of Bax relocation to the mitochondria in the presence of different inhibitors (Fig. 4A) indicate that caspases were not implicated as a positive trigger of the phenomenon. Nevertheless, previous results (Desforges *et al.*, 2002; Balachandran *et al.*, 2001) showed that chemical inhibition of caspase-8 and caspase-9 as well as overexpression of Bcl-2 yielded partial protection against cell death during VSV infection. Here, we studied the effect of the overexpression of cFLIP, a natural caspase-8 inhibitor, to confirm the implication of caspase 8 in VSV-induced apoptosis. The outcome of the ectopic expression of cFLIP was evaluated on populations of about 50 pooled clones (average of 2 pools) as well as on isolated single clones. Overexpression of cFLIP induced partial protection when cells were infected by the non-persisting variants VSV-HR and TP6. At 45 h p.i., survival rates ranged between 15 and 30% (Fig 6A and 6B, right-hand panels), which does represent a significant increase (ANOVA, $p < 0.01$). Indeed, this is a 2.4- to 3-fold increase in cell survival compared to *neo* control cells, whether measures were performed on cFLIP overexpressing cell populations (Fig. 6A) or on isolated clones which were expressing cFLIP at levels up to 6 times higher than the endogenous molecule (Fig. 6B). Adding the overexpression of Bcl-2 to established stable cell populations already overexpressing cFLIP did not induce a significantly better survival rate when compared to cells overexpressing equivalent levels of ectopic cFLIP alone (Fig. 6A).

Caspase-8-like activity is induced during VSV infection and is modulated by cFLIP and Bcl-2 overexpression

Overexpression of cFLIP increased cell survival after VSV-HR and TP6 infection, suggesting caspase-8 involvement. Caspase-8-like activity was measured during infection of H4 cells with VSV variants, in the presence or absence of overexpression of cFLIP and Bcl-2. Figure 7A shows that caspase-8-like activity was induced by HR and TP6 infection as soon as 14 h p.i, whereas induction during infection by T1026R1 was observed only at 24 h.p.i. Furthermore, the level of caspase-8-like activity induced by VSV was stronger than the level observed after Reovirus infection or after agonistic anti-Fas antibody induction of the Fas-related apoptosis, both previously characterized to induce apoptosis involving caspase-8 activity (Clarke *et al.*, 2001, Wajant, 2002). As observed on Fig. 7B, caspase-8-like activity was equivalently abrogated by cFLIP and Bcl-2 at 14 h.p.i.

DISCUSSION

Many different viruses induce or modulate apoptosis, which appears to be a crucial factor in the complex regulation that takes place during the infection and is determinant in the evolution towards acute or persistent infection (Hardwick, 1998; Teodoro and Branton, 1997; Shen and Shenk, 1995). We have been studying VSV infection of H4 neural cells as a model system to look at persistence in CNS cells, a privileged site for viruses to persist. Using wild type New Jersey strain and a panel of M protein mutants of VSV-Indiana, the modulation of apoptosis was shown to be related to

the ability to persist (Desforges *et al.*, 2002). During many types of stress response, including viral infection, different apoptotic pathways can be activated. Different but complementary arms of the complex apoptotic process exist.

Bax and Bcl-2 are two antagonistic molecules of the family that together participate in the complex mitochondrial regulation of apoptosis. In many instances, the upregulation of Bax and/or the downregulation of Bcl-2 are key events to determine cell fate. Even though, there was no such modification in Bax/Bcl-2 ratios (Fig. 1B) in our model, overexpression of Bcl-2 correlates with a significant prolongation in H4 cell survival after a VSV infection (Fig. 6A and Desforges *et al.*, 2002), especially when infection is performed at a low m.o.i., where Bcl-2 may even allow HR-Indiana virus to persist in culture (Desforges *et al.*, 2002). Overexpression of Bcl-2 has also been shown to be associated with persistent infection of cells by other cytopathic viruses such as Sindbis virus (Levine *et al.*, 1993), Semliki Forest Virus (Scallan *et al.*, 1997) and Japanese encephalitis virus (Liao *et al.*, 1998).

Many studies have described Bax translocation from the cytosol to the mitochondrial membrane in cells undergoing apoptosis, this relocation being sufficient for the induction of apoptosis (Goping *et al.*, 1998; Wolter *et al.*, 1997). Pore formation at the mitochondrial membrane by insertion of Bax homodimers (Martinou and Green, 2001) or of larger Bax/Bak complexes (Antonsson, 2001; Korsmeyer *et al.*, 2000; Sundararajan *et al.*, 2001) is believed to cause leakage of mitochondrial factors into the cytosol, initiating apoptosis. In our system, the rapidity of Bax translocation to the mitochondria and its amount at this organelle's membrane correlated well with the

degree of apoptosis induction in H4 cells, since the VSV M protein mutant T1026R1 and the VSV New Jersey strain were less effective in inducing Bax relocation to the mitochondria and consequently in causing DNA fragmentation (Fig. 3). This is in agreement with previous results that indicated that the M protein was in part responsible for VSV-induced apoptosis and that mutations in either the N-terminal or the C-terminal part of the protein was responsible for a partial loss of function leading to a reduction of apoptosis induction (Desforges *et al.*, 2002; Kopecky *et al.*, 2001). Both non-persisting Indiana variants studied here, HR and TP6, Furthermore, even though both non-persisting variants HR and TP6 induced a higher level of Bax translocation and DNA fragmentation compared to the persisting variants, TP6 unquestionably induced apoptotic symptoms and cell death more rapidly than did HR (Desforges *et al.*, 2002 and Figs. 2 and 3). Accordingly, as cited by Kopecky and colleagues in another system, other unidentified viral component(s) may be necessary for an optimal induction of apoptosis (Kopecky *et al.*, 2001). The small amount of Bax protein observed at the nucleus (Fig. 2B), mostly during HR and TP6 infection has not been thoroughly analysed but this relocation of the protein was reported in the context of growth factor deprivation (Mandai *et al.*, 1998).

As overexpression of cFLIP increased cell survival significantly for the non-persisting HR and TP6 at 2 days p.i. (Fig. 6), our results suggest that VSV-induced apoptosis relates in part to a caspase-8-related pathway of apoptosis. Bax translocation to the mitochondria is often related to the cleavage of Bid by caspase-8 (Li *et al.*, 1998; Slee *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2000). However, our results showing Bax relocation even

during caspase 8 inhibition (Z-IETD-fmk, Fig. 4 or in cells overexpressing cFLIP, Fig. 5A) suggest that this is not the pathway activated during VSV infection. Nevertheless, cFLIP overexpression delayed caspase-3 activation in our system (Fig. 5C), suggesting that caspase 8 targets caspase 3 directly. Indeed, caspase 3, which is strongly activated during VSV infection (Desforges et al., 2002), is often directly activated by caspase 8 (Scaffidi et al., 1999). The delay in caspase-8-like activation during infection by the M protein mutant T1026R1 compared to variants with wild type M protein (Fig. 7A) is thus interesting as we have shown that caspase 3 was significantly less active in H4 cells infected by less virulent VSV variants, including T1026R1 (Desforges et al., 2002). Furthermore, cFLIP overexpression abrogated caspase-8-like activity during infection by reovirus T3D and treatment of cells with agonistic antibody to Fas, which are both known to induce caspase-8 activation. Nevertheless, caspase-8-like activity in cFLIP overexpressing cells was reduced, but not completely inhibited, during infection by all our VSV variants tested. Even though there was a decrease in the level of enzyme activity compared to the neo control cells, ectopic expression of cFLIP was somehow overwhelmed by caspase-8-like activation during VSV infection at 24 h p.i.

Caspase-8 is often activated via the death-receptor-associated pathway during different apoptotic stimuli such as viral infection (Clarke et al., 2001; Kominski et al., 2002) or Fas-Fas ligand interaction (Scaffidi et al., 1999). But the pathway implicating caspase 8 activation could also function in a second stage as an amplifying loop to increase the first apoptotic stimulus that takes place using the intrinsic pathway. Such system implicates caspase 8 activation downstream of caspase 3 and have recently been

reported during 3-deazaadenosine (DZA) induced apoptosis of the U-937 cell line (Cha et al., 2001) and anticancer drugs (Wieder et al., 2001; Tang et al., 2000). Furthermore, our results (Fig. 7B) shows that Bcl-2 overexpression inhibited caspase-8 activation as well as cFLIP. This Bcl-2-associated inhibition was also reported during MHV infection (Chen et Makino, 2002). This result (Fig. 7B), coupled to the important delay of Bax translocation towards mitochondria (Fig. 5A) and to the inhibition of caspase 3 for up to 18 h.p.i. (Fig. 5C) in cells overexpressing Bcl-2, suggests that the caspase-8-like activity measured during VSV infection is dependent of a mitochondria-mediated pathway that first activates caspase-3 following the translocation of Bax towards the mitochondria. In the end, caspase 8 activation would be dependent on previous caspase 3 activation but could also result in an amplifying mechanism to further activate caspase 3.

Besides this delay in Bax translocation to the mitochondria, overexpression of Bcl-2 did protect the cells in part by inhibiting VSV-TP6 replication (Fig. 5B) as it has been reported for Semliki Forest virus (Scallan *et al.*, 1997). Our results (Fig. 5B) also indicate that after inducing a significant initial delay in virus replication, Bcl-2 overexpression allowed a steady increase in time as opposed to *neo* control cells, as was also observed with SFV by Scallan and colleagues (1997).

On the other hand, the accelerated translocation of Bax during inhibition of caspases (Fig. 4) suggested that regulation of this relocation may require a negative control of caspases. The delayed translocation of Bax when inhibitors of cathepsins B and L was present (Fig. 4; ZFA-fmk) suggests that there could be a cross-talk between caspases and cathepsins for the control of VSV-induced apoptosis, as it has been

proposed for ischemic neuronal death of primates (Yamashima, 2000) Even though we observed positive or negative modulation according to the type of inhibition, relocation of Bax was always apparent during infection of cells with VSV-TP6, the strongest inducer of apoptosis. In all cases, except when caspases were inhibited by either ZVAD-fmk and Z-IETD-fmk (Fig. 4), each and every cell that had Bax translocated to the mitochondria presented a fragmented nucleus. This clearly indicates that when Bax is mostly located at the mitochondria, apoptosis occurs in part through downstream activation of caspases and cell death will therefore follow. Furthermore, the increase in Bax relocation to the mitochondria coupled to significant inhibition of DNA fragmentation in the presence ZVAD-fmk (Fig. 4) implies that this movement of Bax is necessary for efficient caspase activation and induction of the intrinsic pathway of apoptosis.

Persisting viral mutants may appear naturally. As VSV has been proposed as a treatment against cancer cells *in vivo*, it is fundamental to evaluate the importance of cellular or viral factors, such as the M protein, for programmed cell death to happen adequately and to understand why and how persistent infection can be established and maintained in cells. In this regard, the major conclusion of our study is that mitochondria-related apoptosis is central during VSV infection and involves relocation of Bax towards mitochondria, caspase 3 and caspase-8 activation. A cross-talk between those events may serve to amplify the apoptotic stimulus during infection, at least for the most virulent variants, thus preventing the establishment of a viral persistence.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully thank Francine Lambert and Marcel Desrosiers for fabulous technical support for immunofluorescence and confocal experiments and analysis and Julie Guenoun for help with subcellular fractionation experiments.

This work was supported by the Institute of Infection and Immunity, Canadian Institutes for Health Research (CIHR) funds to Pierre J. Talbot and by Natural Sciences and Engineering Council of Canada (NSERC) and Université du Québec à Montréal financial support to Laurent Poliquin. Marc Desforges was supported by a studentship from CIHR, Fondation Armand-Frappier and INRS-Institut Armand-Frappier.

REFERENCES

- Aillet, F., H. Masutani, C. Elbim, H. Raoul, L. Chene, M.-T. Nugeyre, C. Paya, F. Barre-Sinoussi, M.-A. Gougerot-Pocidallo, and N. Israel. (1998). Human immunodeficiency virus induces a dual regulation of Bcl-2, resulting in persistent infection of CD4(+) T-or monocytic cell lines *Journal of Virology* **72**, 9698-9705.
- Allsopp, T.E., M.F. Scallan, A. Williams and J.K. Fazakerley. (1998). Virus infection induces neuronal apoptosis: a comparison with trophic factor withdrawal. *Cell Death and Differentiation* **5**, 50-59.
- Antonsson, B. (2001). Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer proteins" and their victim, the mitochondrion. *Cell Tissue Research* **306**, 347-361.
- Appel, E , A. Katzoff, T. Ben-Moshe, G. Kazimirsky, D. Kobiler, S. Lustig, and C. Brodie. (2000). Differential regulation of Bcl-2 and Bax expression in cells infected with virulent and nonvirulent strains of Sindbis virus. *Virology* **276**, 238-242.
- Balachandran, S., M. Porosnicu and G.N. Barber. (2001). Oncolytic activity of vesicular stomatitis virus is effective against tumors exhibiting aberrant p53, Ras, or Myc function and involves the induction of apoptosis. *Journal of Virology* **75**, 3474-3479.

Balachandran, S., P.C. Roberts, T. Kipperman, K.N. Bhalla, R.W. Compans, D.R. Archer and G.N. Barber. (2000). Alpha/Beta interferons potentiate virus-induced apoptosis through activation of the FADD/caspase-8 death signaling pathway. *Journal of Virology* **74**, 1513-1523.

Balachandran, S. and G.N. Barber. (2000). Vesicular stomatitis virus (VSV) therapy of tumors. *IUBMB Life*. **50**, 135-138.

Barber, G.N. (2001). Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death and Differentiation* **8**, 113-126.

Benedict, C.A, P.S. Norris, and C.F. Ware. (2002). To kill or to be killed: Viral evasion of apoptosis. *Nature Immunology* **3**, 1013-1018.

Bonavia, A., N. Arbour, V.W. Yong and P.J. Talbot. (1997). Infection of primary cultures of human neural cells by human coronaviruses 229E and OC43. *Journal of Virology* **71**, 800-806.

Bronfman, M., G. Loyola and C.S. Koenig. (1998). Isolation of intact organelles by differential centrifugation of digitonin-treated hepatocytes using a table eppendorf centrifuge. *Analytical Biochemistry* **255**, 252-256.

Chen, C.J. and S. Makino. (2002). Murine coronavirus-induced apoptosis in 17Cl-1 cells involves a mitochondria-mediated pathway and its downstream caspase-8 activation and Bid cleavage. *Virology* **302**, 321-332.

Clarke, P., S.M. Meintzer, A.C. Spalding, G.L. Johnson, and K.L. Tyler. (2001). Caspase 8-dependent sensitization of cancer cells to TRAIL-induced apoptosis following reovirus-infection. *Oncogene* **20**, 6910-6919.

Desforges, M., G. Despars, S. Bérard, M. Gosselin, M.O. McKenzie, D.S. Lyles, P.J. Talbot and L. Poliquin. (2002). Matrix Protein Mutations Contribute To Inefficient Induction of Apoptosis Leading To Persistent Infection Of Human Neural Cells By Vesicular Stomatitis Virus. *Virology* **295**, 63-73

Desforges, M., J. Charron, S. Bérard, S. Beausoleil, D.F. Stojdl, G. Despars, B. Laverdière, J.C. Bell, P.J. Talbot, C.P. Stanners and L. Poliquin. (2001). Different host-cell shutoff strategies related to the matrix protein lead to persistence of vesicular stomatitis virus mutants on fibroblast cells. *Virus. Research* **76**, 87-102.

Drapier, J.C., H. Hirling, J. Wietzerbin, P. Kaldy and L.C. Kuhn. (1993). Biosynthesis of nitric oxide activates iron regulatory factor in macrophages. *EMBO Journal* **12**, 3643-3649.

Dubrez, L., Coll, J.L. Hurbin, A., Solary, E., and Favrot M.C. (2001). Caffeine sensitizes human H358 cell line to p53-mediated apoptosis by inducing mitochondrial translocation and conformational change of Bax protein. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 38980-38987.

Francoeur, A.M., L. Poliquin and C.P. Stanners. (1987). The isolation of interferon-inducing mutants of vesicular stomatitis virus with altered viral P function for the inhibition of total protein synthesis. *Virology* **160**, 236-245.

Fultz, P.N., J.A. Shaddock, C.Y. Kang and J.W. Streilen. (1982). Vesicular stomatitis virus can establish persistent infections in Syrian hamsters. *Journal of General Virology* **63**, 493-497.

Genini, D., D. Sheeter, S. Rought, J.J. Zaunders, S.A. Susin, G. Kroemer, D.D. Richman, D.A. Carson, J. Corbeil and L.M. Leoni. (2001). HIV induces lymphocytes apoptosis by a p53-initiated, mitochondrial-mediated mechanism. *FASEB Journal* **15**, 5-6.

Godlewski, M.M., M.A. Motyl, B. Gajkowska, P. Wareski, M. Koronkiewicz, and T. Motyl. (2001). Subcellular redistribution of Bax during apoptosis induced by anticancer drugs. *Anticancer Drugs*. **12**, 607-617.

Goping, I.S., A. Gross, J.N. Lavoie, M. Nguyen, R. Jemmerson, K. Roth, S.J. Korsmeyer and G.C. Shore. (1998). Regulated targeting of Bax to mitochondria. *Journal of Cell Biology* **143**, 207-215.

Griffin, D.E. and J.M. Hardwick. (1999). Perspective: virus infections and the death of neurons. *Trends in Microbiology* **7**, 155-60

Hardwick, J.M. (1998). Viral interference with apoptosis. *Seminars in Cellular and Developmental Biology* **9**, 339-349.

Hoetelmans, R., H.J. van Slooten, R. Keijzer, S. Erkeland, C.J. van de Velde and J.H. Dierendonck. (2000). Bcl-2 and Bax proteins are present in interphase nuclei of mammalian cells. *Cell Death and Differentiation* **7**, 384-392.

Huneycutt, B.S., I.V. Plakhov, Z. Shusterman, S.M. Bartido, A. Huang, C.S. Reiss and C. Aoki. (1994). Distribution of vesicular stomatitis virus proteins in the brains of BALB/c mice following intranasal inoculation: an immunohistochemical analysis. *Brain Research* **635**, 81-95.

Huprikar, J., Rabinowitz, S.G., DalCanto, M.C. and Rundell, M.K. (1986).

Persistent infection of a temperature-sensitive G31 vesicular stomatitis virus mutant in neural and nonneural cells: biological and virological characteristics. *Journal of Virology* **58**, 493-499.

Jia, L., Y. Patwari, S.M. Srinivasula, A.C. Newland, T. Fernandes-Alnemri, E.S.

Alnemri, and S.M. Kelsey. (2001). Bax translocation is crucial for the sensitivity of leukaemic cells to etoposide-induced apoptosis. *Oncogene*. **20**, 4817-4826.

Jimenez, G.S., Khan, S.H., Stommel, J.M. and Wahl, G.M. (1999). P53 regulation by

post-translational modification and nuclear retention in response to diverse stresses. *Oncogene* **18**, 7656-7663.

Kominski, D.J., R.J. Bickel, and K.L. Tyler. (2002). Reovirus-induced apoptosis

requires both death receptor- and mitochondrial-mediated caspase-dependent pathways of cell death. *Cell Death and Differentiation* **9**, 926-933.

Kopecky, S.A and D.S. Lyles. (2003). Contrasting effects of matrix protein on

apoptosis in HeLa and BHK cells infected with vesicular stomatitis virus are due to inhibition of host gene expression. *Journal of Virology* **77**, 4658-4669.

- Kopecky, S.A, M.C. Willingham and D.S. Lyles. (2001).** Matrix protein and another viral component contribute to induction of apoptosis in cells infected with vesicular stomatitis virus. *Journal of Virology* **75**, 12169-12181.
- Korsmeyer, S.J., M.C. Wei, M. Saito, S. Weiler, K.J. Oh and P.H. Schlesinger. (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* **7**, 1166-1173.
- Koyama, A.H., T. Fukumori, M. Fujita, H. Irie and A. Adachi. (2000).** Physiological significance of apoptosis in animal virus infection. *Microbes and Infection*. **2**, 1111-1117.
- Koyama, A.H., H. Irie, T. Fukomori, S. Hata, S. Iida, H. Akari and A. Adachi. (1998).** Role of virus-induced apoptosis in a host defense mechanism against virus infection. *Journal of Medical Investigation* **45**, 37-45.
- Koyama, A.H. (1995).** Induction of apoptotic DNA fragmentation by the infection of vesicular stomatitis virus. *Virus Research* **37**, 285-290.
- Lafleur, M.A., M.D. Hollenberg, S.J. Atkinson, V. Knäuper, G. Murphy, and D.R. Edwards. (2001).** Activation of pro-(matrix metalloproteinase-2) (pro-MMP-2) by thrombin is membrane-type-MMP-dependent in human umbilical vein endothelial cells and generates a distinct 63 kDa active species. *Biochemical Journal* **357**, 107-115.

- Levine, B., Huang, Q., Isaacs, J.T., Reed, J.C., Griffin, D.E. and Hardwick, J.M. (1993).** Conversion of lytic to persistent alphavirus infection by the Bcl-2 cellular oncogene. *Nature* **361**, 739-742.
- Li, H., H. Zhu, C.-j. Xu and J. Yuan. (1998).** Cleavage of Bid by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501.
- Liao, C-L., Lin, Y-L., Shen, S-C., Shen, J-Y., Su, H-L., Huang, Y-L., Ma, S-H., Sun, Y-C., Chen, K-P. and Chen, L.K. (1998).** Antiapoptotic but not antiviral function of human bcl-2 assists establishment of Japanese encephalitis virus persistence in cultured cells. *Journal of Virology* **72**, 9844-9854.
- Mandai, M., L. Adam, J. Mendelsohn and R. Kumar. (1998).** Nuclear targeting of Bax during apoptosis in human colorectal cancer cells. *Oncogene*. **17**, 999-1007.
- Martinou, J.-C. and Green, D.R. (2001).** Breaking the mitochondrial barrier. *Nature Review in Molecular and Cellular Biology* **2**, 63-67.
- May, P. and May, E. (1999).** Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* **18**, 7621-7636.

Megyeri, K., Berencsi, K., Halazonetis, T. D., Prendergast, G.C., Gri, G., Plotkin, S.A., Rovera, G. and Gonczol, E. (1999). Involvement of a p53-dependent pathway in rubella virus-induced apoptosis. *Virology* **259**, 74-84.

Oltvai, Z.N., Milliman, C.L. and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609-619.

Plakhov, I.V., Arlund, E.E., Aoki, C., and Reiss, C.S. (1995). The earliest events in vesicular stomatitis virus infection of the murine olfactory neuroepithelium and entry of the central nervous system. *Virology* **209**, 257-262.

Scaffidi, C., I. Schmitz, J. Zha, S.J. Korsmeyer, P.H. Krammer, and M.E. Peter. (1999). Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 22532-22538.

Scallan, M.F., Allsopp, T.E. and Fazakerly, J.K. (1997). Bcl-2 acts early to restrict Semliki Forest Virus replication and delays virus-induced programmed cell death. *Journal of Virology* **71**, 1583-1590.

Shen, Y. and T.E. Shen. (1995). Viruses and apoptosis. *Current Opinion in Genetics and Development* **5**, 105-111.

Slee, E.A., S.A. Keogh and S.J. Martin. (2000). Cleavage of Bid during cytotoxic drug and UV radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of Bcl-2 action and is catalysed by caspase-3: a potential feedback loop for amplification of apoptosis-associated mitochondrial cytochrome C release. *Cell Death and Differentiation* 7, 556-565.

Stanners, C.P., Farmilo, A.J., and Goldberg, V.J. (1975). Effects in vitro and in vivo of a mutant of vesicular stomatitis virus with attenuated cytopathogenicity. *In Negative strand viruses*. Editors: B.W.J. Mahy and R.D. Barry. Academic Press, London. pp.785-798.

Stojdl, D.F., B. Lichty, S. Knowles, R. Marius, H. Atkins, N. Sonenberg, and J.C. Bell. (2000). Exploiting tumorspecific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nature Medecine* 6, 821-825.

Stoka, V., B. Turk, S.L. Schendel, T.-H. Kim, T. Cirman, S.J. Snipas, L.M. Ellerby, D. Bredesen, H. Freeze, M. Abrahamson, D. Brömme, S. Krajewski, J.C. Reed, X.-M. Yin, V. Turk and G.S. Salvesen. (2001). Lysosomal protease pathways to apoptosis; cleavage of Bid, not procaspases, is the most likely route. *Journal of Biological Chemistry* 276, 3149-3157.

Sundararajan, R. and E. White. (2001). E1B 19K blocks Bax oligomerization and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis. *Journal of Virology* **75**, 7506-7516.

Tang, D., J.M. Lahti and V.J. Kidd. (2000). Caspase-8 activation and Bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase-3-dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 9303-9307.

Teodoro, J.G., and Branton, P.E. (1997). Regulation of apoptosis by viral gene products. *Journal of Virology* **71**, 1739-1746.

Tepper, C.G. and M.F. Seldin. (1999). Modulation of caspase-8 and FLICE-inhibitory protein expression as a potential mechanism of Epstein-Barr virus tumorigenesis in Burkitt's lymphoma. *Blood*. **94**, 1727-1737.

Ubol, S., Sukwattanapan, C. and Utaisinchaoen, P. (1998). Rabies virus replication induces Bax-related, caspase dependent apoptosis in mouse neuroblastoma cells. *Virus Research*. **56**, 207-215.

Wajant, H. (2002). The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* **296**, 1635-1636.

Wolter, K.G., Y.T. Hsu, C.L. Smith, A. Nechushtan, X.G. Xi and R.J. Houle. (1997).

Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *Journal of Cell Biology* **139**, 1281-1292.

Yamashima, T. (2000). Implication of cystein proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. *Progress in Neurobiology* **62**, 273-295.

LEGENDS TO FIGURES

Fig. 1. Absence of significant variations in the total amount of Bax and Bcl-2 levels after infection with VSV variants. (A) Northern blot analysis of the apoptosis-related Bax gene indicate that VSV-induced apoptosis is p53-independent. Analysis of transcript levels were performed after infection of H4 cells for the indicated times p.i. with the VSV variants. Fifteen micrograms of total RNA was migrated on a 1% (w/v) agarose formaldehyde denaturing gel and transferred overnight onto a Nylon membrane (Osmonics). Radiolabelled probe from human Bax cDNA was used. EtBr staining of total 28S rRNA was used as a loading control. (B) Representative detection of Bax protein (left-hand panel) and of Bcl-2 protein (right-hand panel) compared to β -Actin. Twenty micrograms of proteins were resolved on a 12.5 % (w/v) SDS-PAGE. Statistical analysis by ANOVA revealed that there were no significant differences in the amounts of both Bax and Bcl-2 proteins in total cell extracts. Values were always $p \geq 0.05$. Densitometric analysis was performed for 4 different experiments.

Fig. 2. Infected cells undergo apoptosis related to Bax relocation to the mitochondria and slight cytochrome-c efflux from the mitochondria in apoptotic cells after infection with VSV. (A) Immunodetection of Bax protein revealed its translocation towards the mitochondria during VSV infection (18 h post-infection). The punctate form of Bax colocalized with the mitochondrial-specific dye (MitotrackerTM) after infection with VSV-TP6, as seen by confocal analysis. (B) Twenty micrograms of subcellular fractions samples harvested at 2, 15 and 20 h p.i., were resolved on 12.5 % (w/v) SDS-PAGE and Western blots confirmed that Bax was mainly translocated from the cytosol to the mitochondria during VSV-Indiana HR, TP6 and to a lesser extent for M mutant T1026R1. No Bax movement was observed for mock-infected and New Jersey-infected cells up to 20 h post-infection. Cytochrome C (Cyt C) immunodetection revealed a release from mitochondria during VSV-HR, TP6 and to a lesser extent for M mutant T1026R1. No Cyt C movement was observed for mock-infected and New Jersey infected cells up to 20 h post-infection.

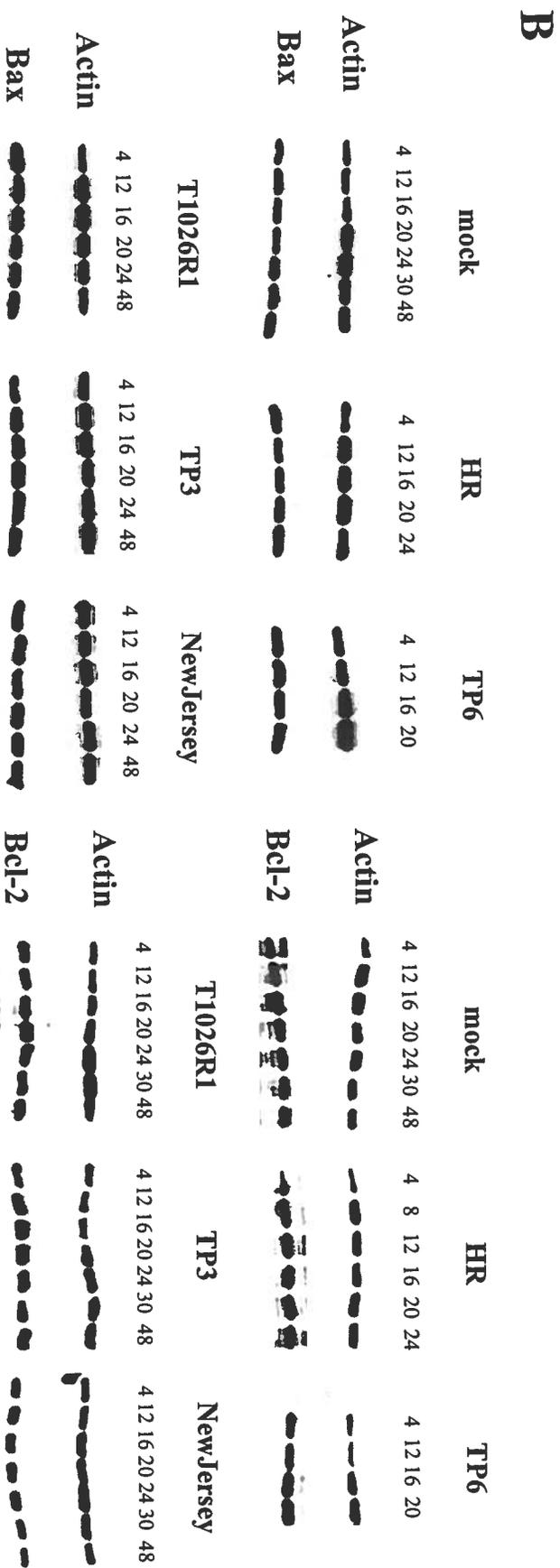
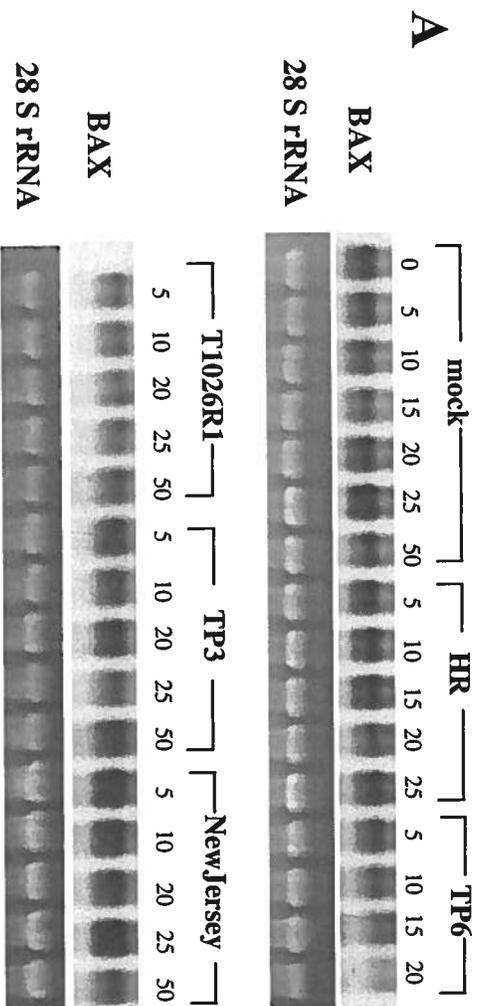
Fig. 3. Translocation of Bax to the mitochondrial membrane is associated with nuclear condensation and DNA fragmentation. (A) Immunodetection of Bax was correlated with DNA condensation and fragmentation (hallmarks of apoptosis) in VSV-infected H4 human neural cells as seen by DAPI staining of the nucleus. (B) Negative control of Bax immunodetection. (C) The number of apoptotic cells was in direct relation with the virulence of the different VSV variants. Non-persisting HR and TP6 induced more Bax translocation more rapidly to the mitochondria and thus more DNA fragmentation.

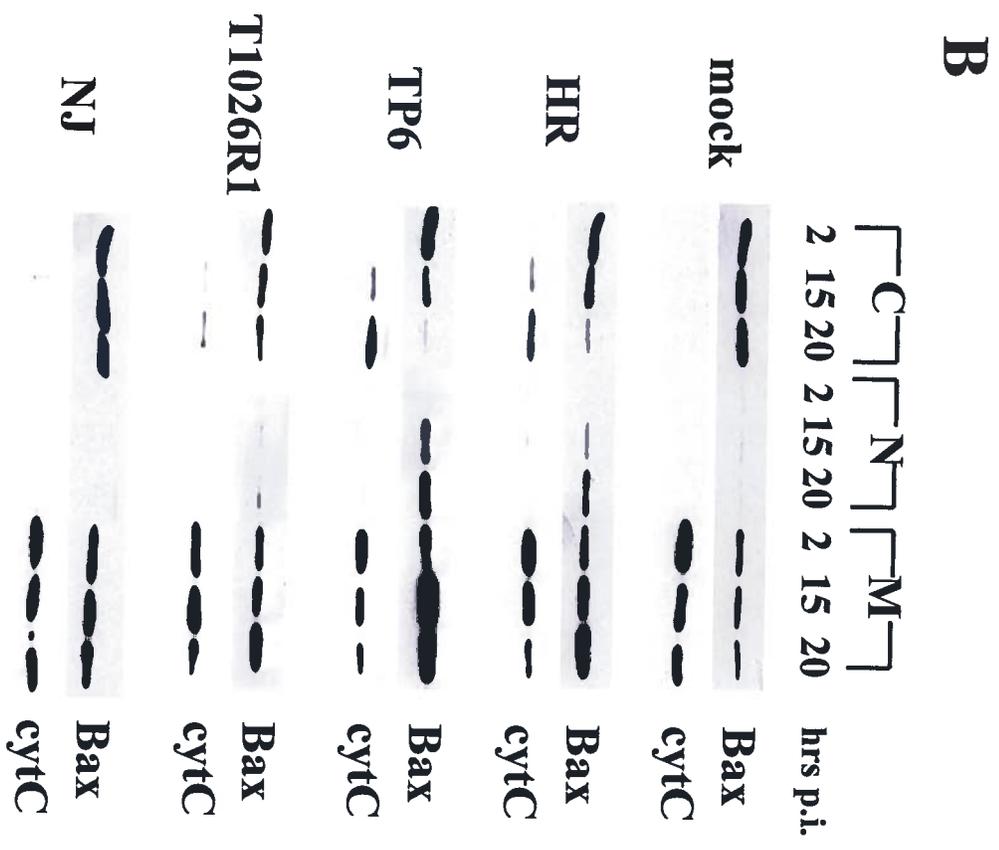
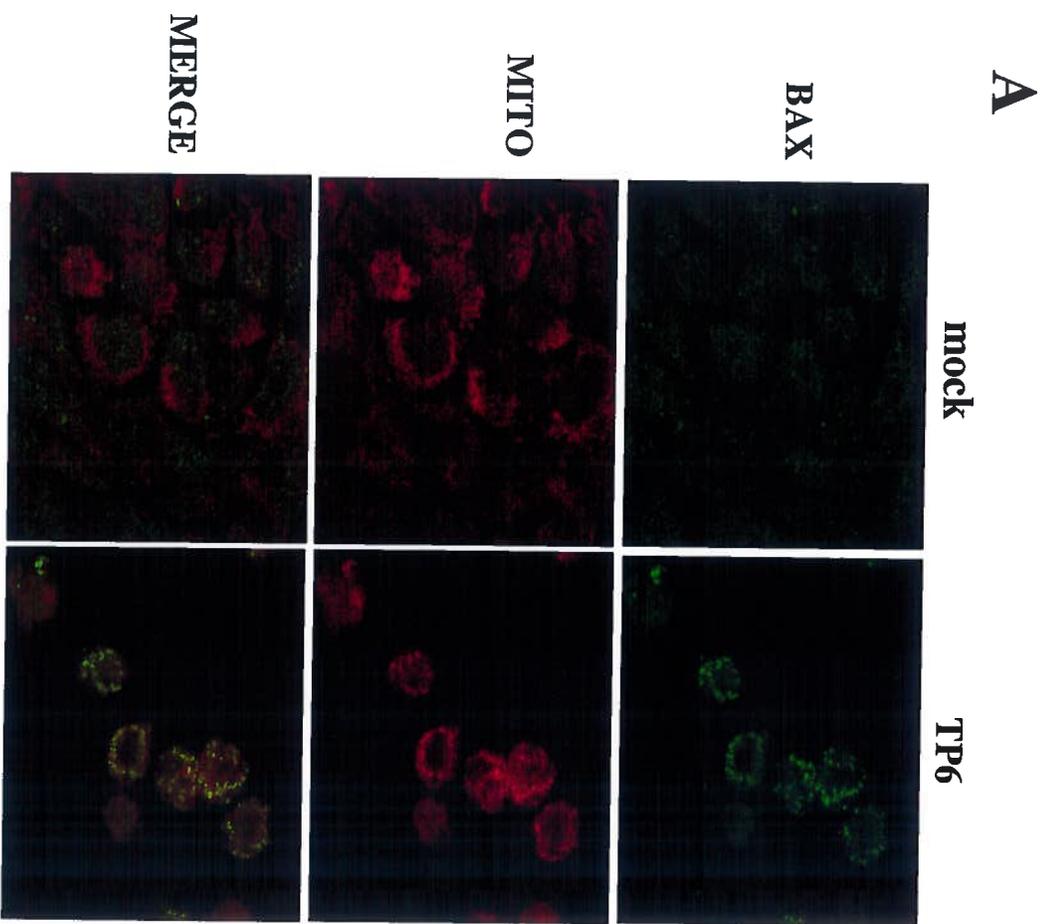
Fig. 4. Cystein protease inhibition modulate translocation of Bax to the mitochondrial membrane during VSV-TP6 infection of H4 cells. (A) Infection during inhibition of caspase (z-IETD-fmk or zVAD-fmk) increased Bax relocation to mitochondria. Many cells positive for Bax relocation did not show a fragmented nucleus during infection in the presence of zVAD-fmk (white arrowheads). Inhibition of cathepsins B and L (zFA-fmk) decreased this relocation to the mitochondria. (B) Quantitation (mean of the count of six different fields in two independent experiments) of cells positive for the punctate appearance of Bax.

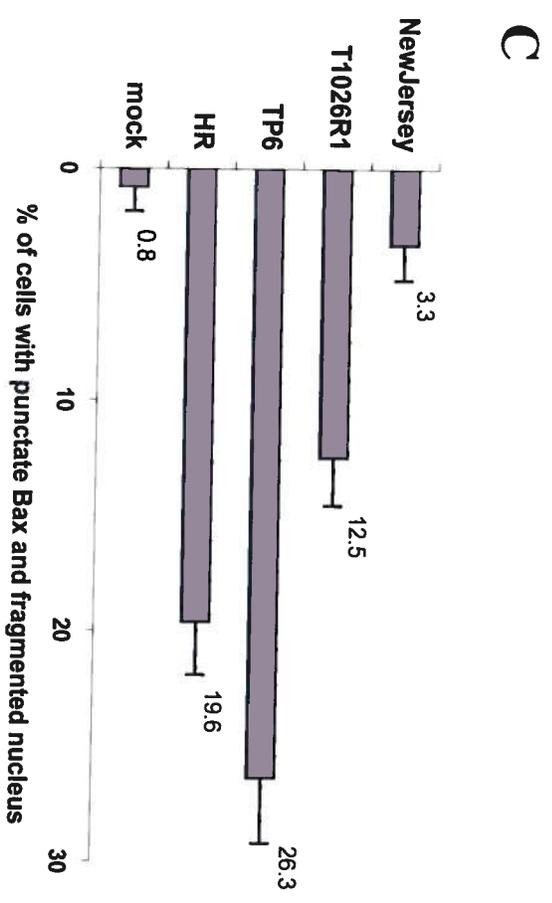
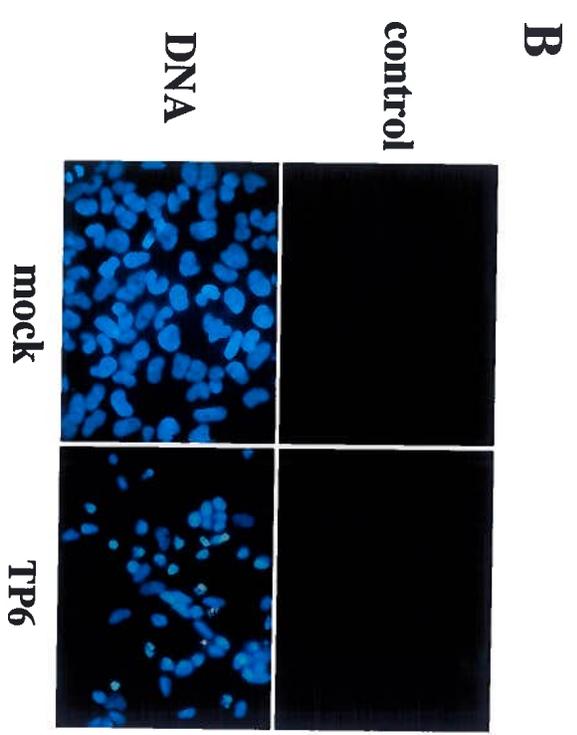
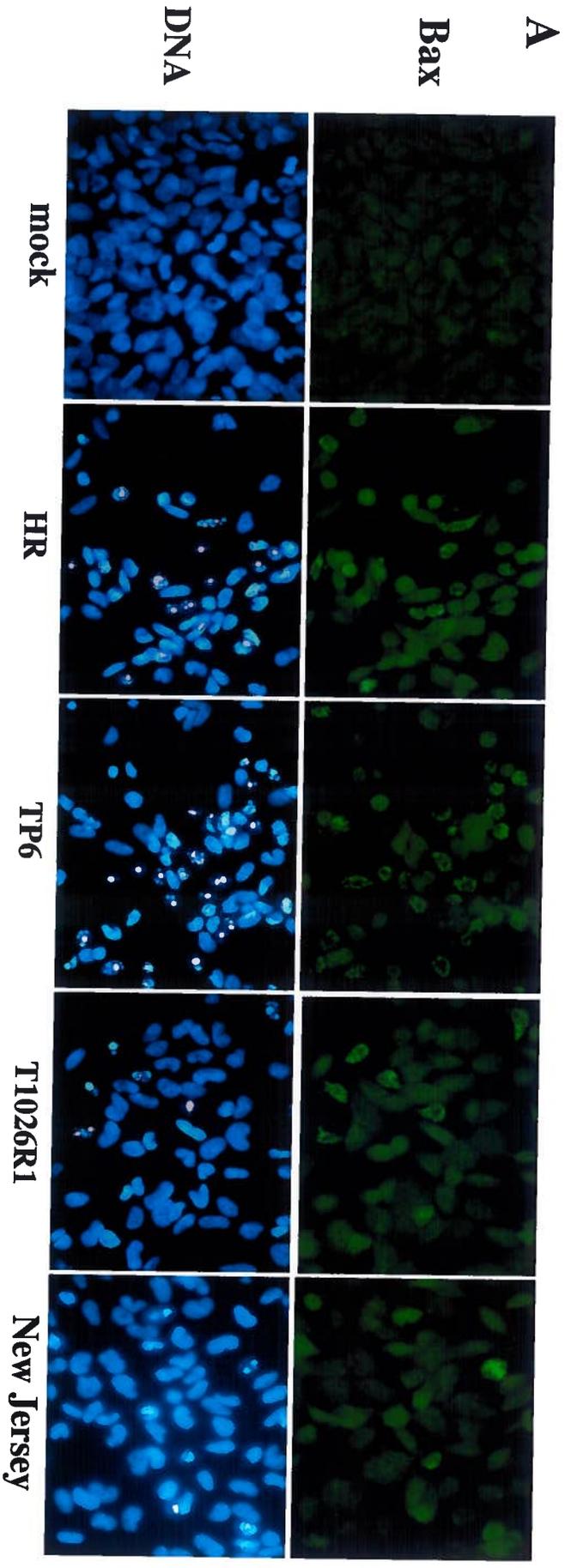
Fig. 5. Overexpression of Bcl-2 and cFLIP modulate the production of infectious virus and the induction of apoptosis. (A) Bcl-2 strongly inhibited Bax relocation towards mitochondria while cFLIP did not alter it significantly when compared to *neo* control cells. (B) VSV replication was significantly delayed by overexpression of Bcl-2. (C) Procaspase 3 fragment of 32 kDa disappearance (revealing caspase 3 activation) was delayed by overexpression cFLIP and inhibited by overexpression of Bcl-2 for up to 18 h.p.i.

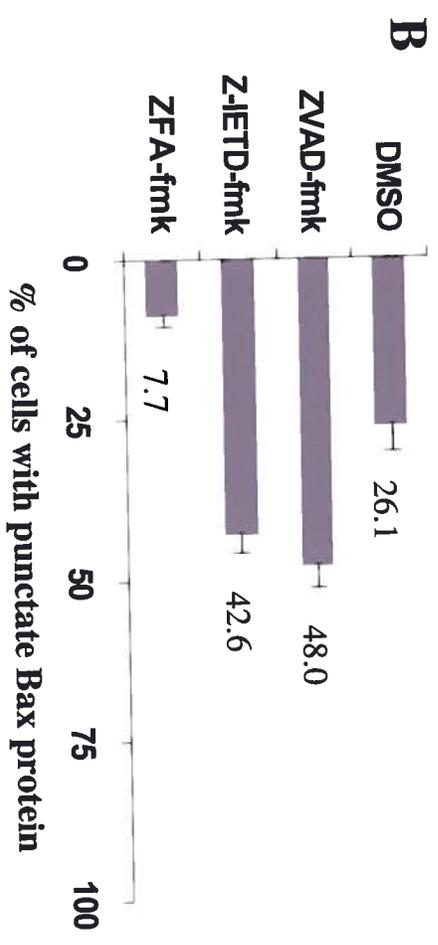
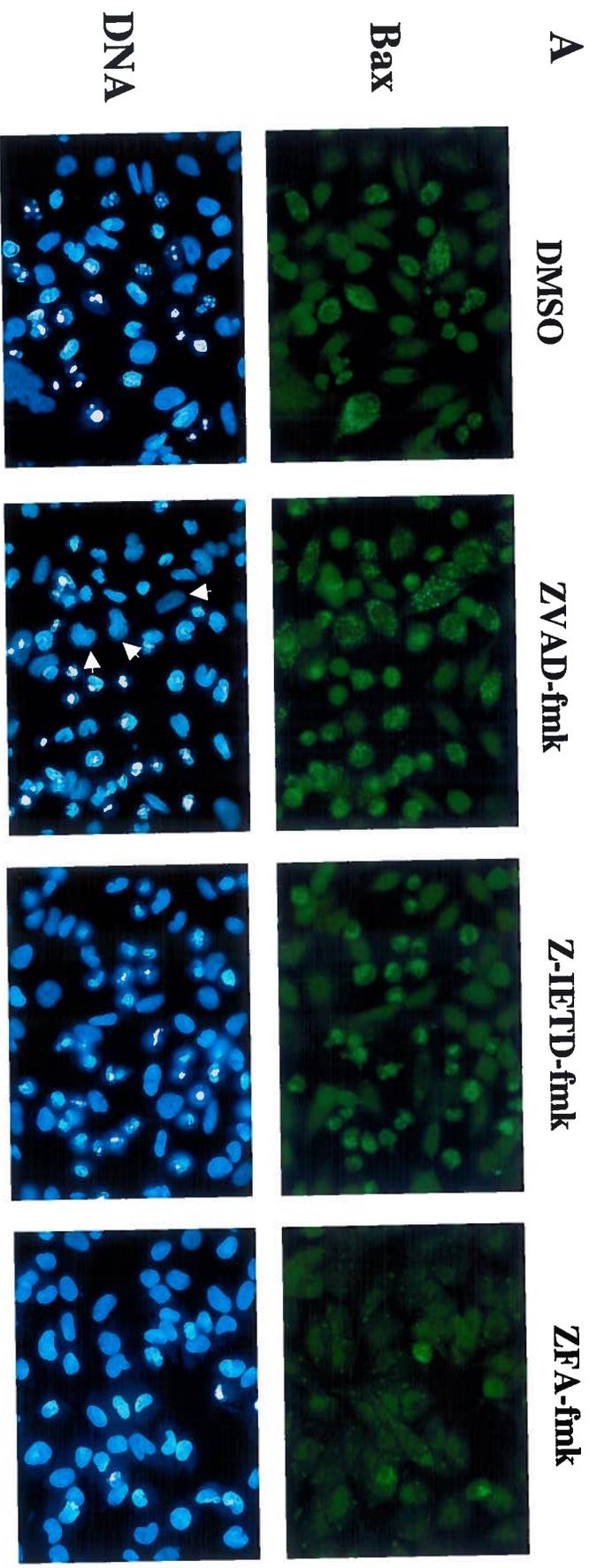
Fig. 6. Overexpression of cFLIP and Bcl-2 partially protected cells from VSV-induced cell death. (A) Evaluation of cell survival by Trypan blue dye exclusion indicated that cells overexpressing either Bcl-2, cFLIP or both were all partially protected from VSV-induced cell death. Cells are representing populations of 50 pooled clones. Viability of the population [Bcl-2-FLIP]-1 and [Bcl-2-FLIP]-2 are shown together as a mean as well as FLIP-1 and FLIP-2. ANOVA statistical analysis revealed that Bcl-2 allowed a significant increase in survival during infection by the three variants tested while cFLIP did allow a significant increase in cell survival at 45 h p.i. only for wild type M protein VSV variants HR and TP6. RT-PCR analysis indicated that the transgenes (either Bcl-2 or cFLIP or both) were expressed at higher levels than the corresponding endogenous genes. GAPDH was the internal control. (B) Evaluation of cell survival (Trypan blue dye exclusion) at 45 h p.i and the level of cFLIP transgene expression (RT-PCR) in three different individual cFLIP-transfected clones and neomycin (*neo*) control. Survival of all three cFLIP isolated clones differed significantly from the neo control, but the variations between clones were not significant. (ANOVA $p > 0.05$).

Fig. 7. Monitoring of caspase-8-like activity by colorimetric assay using IETD-pNA, indicated that caspase-8 was activated during infection with VSV variants and modulated by overexpression of cFLIP and Bcl-2. (A) VSV variants with wild type M protein (VSV-HR and -TP6) induced caspase-8-like activity more rapidly (14h p.i) than the VSV T1026R1 M mutant and reovirus T3D strain in *neo* control cells. Induction of caspase-8 like activity observed for VSV-HR and TP6 was partially abrogated during VSV infection in cFLIP-overexpressing cells. Reovirus T3D strain and agonistic antibody to Fas were used as positive controls of caspase-8-like activity induction. Asterisks in panel A indicate significant (*ANOVA, $p < 0.05$) or highly significant (**ANOVA, $p < 0.01$) variations in caspase-8-like activity between neo- and cFLIP-overexpressing cells for each virus. (B) Another series of experiments revealed that overexpression of Bcl-2 inhibited caspase-8-like activation as well as cFLIP overexpression.

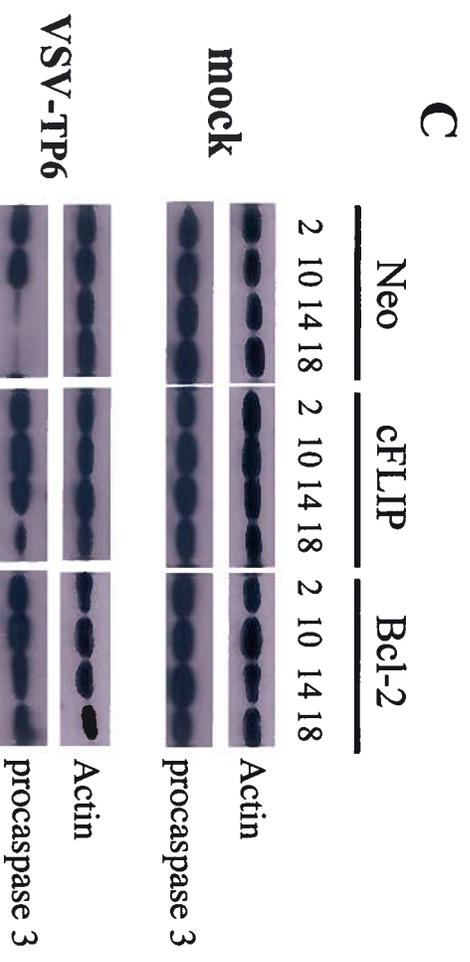
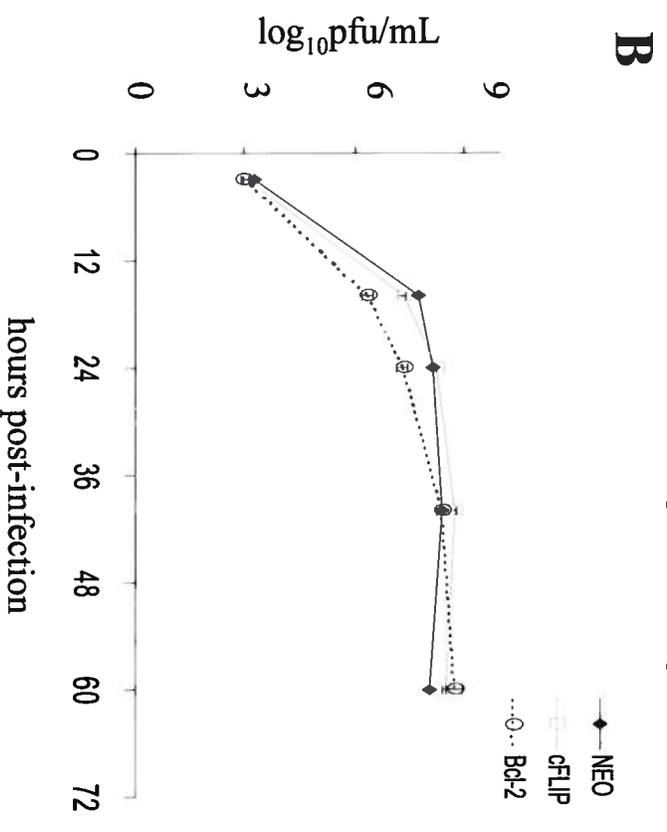
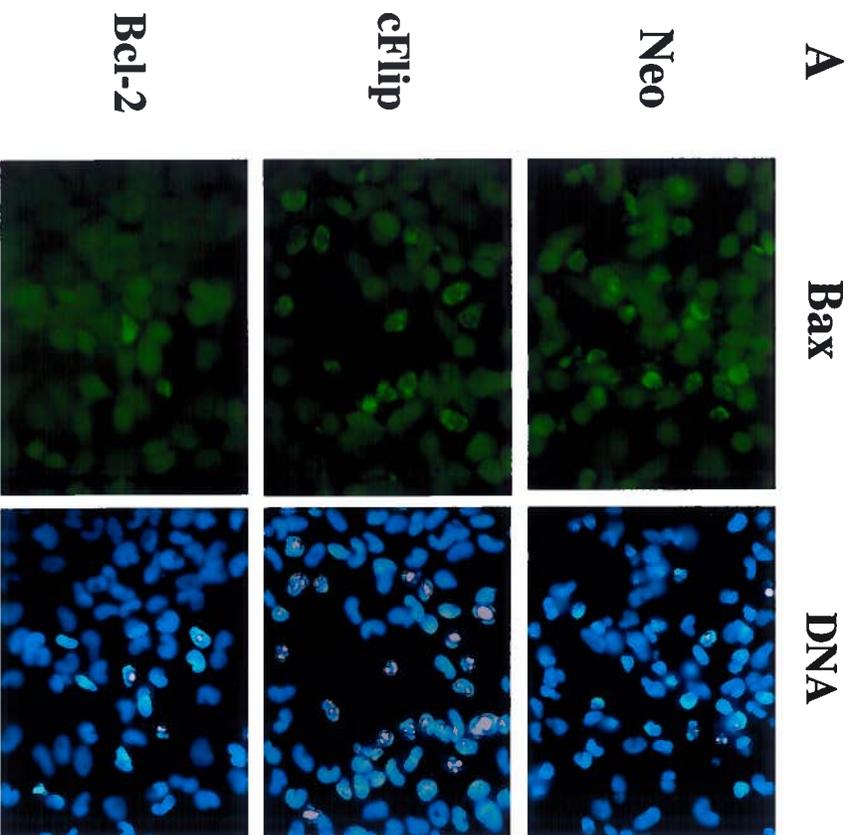




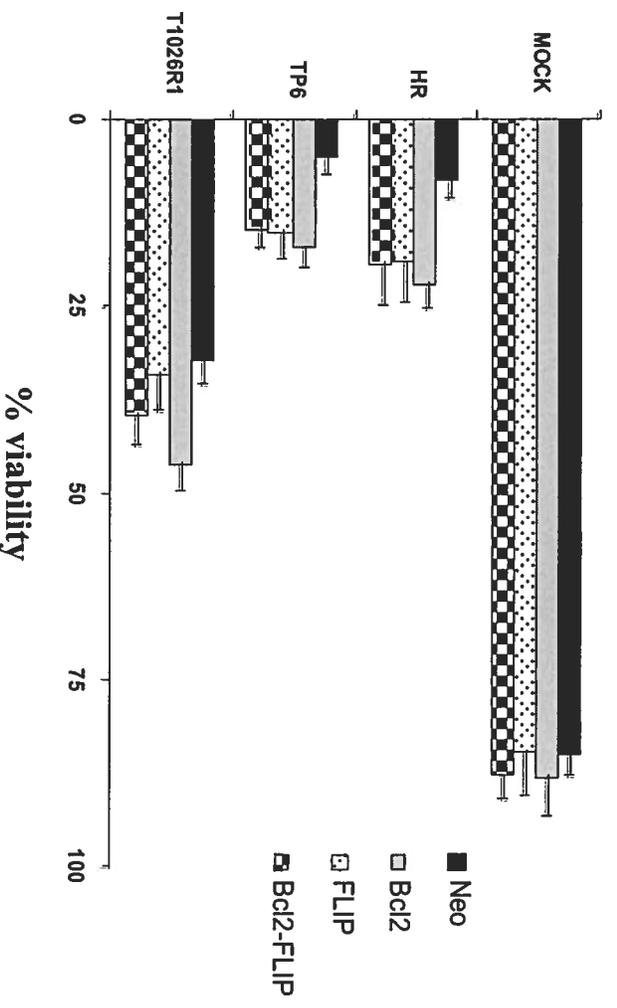




Desforges et al. Fig.4

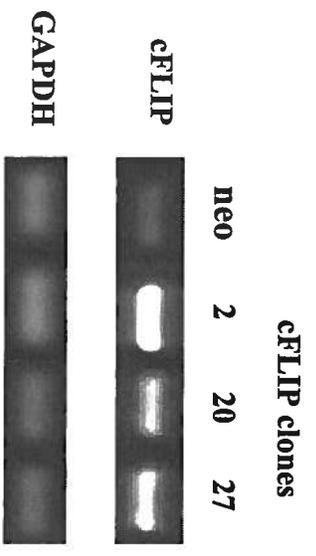
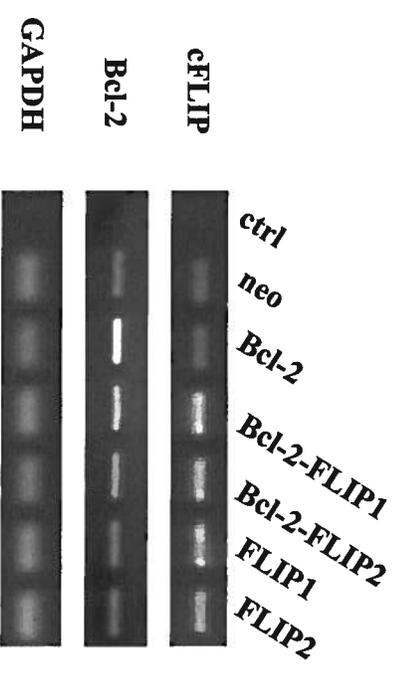
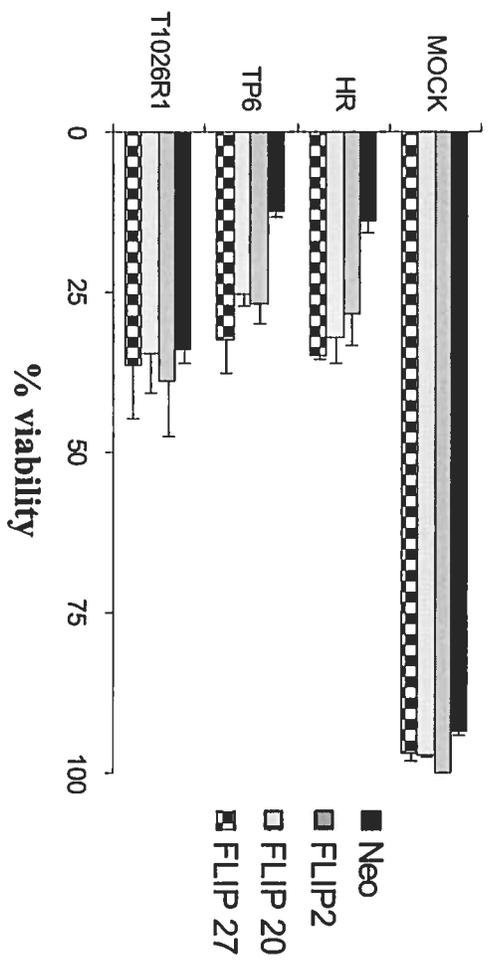


A

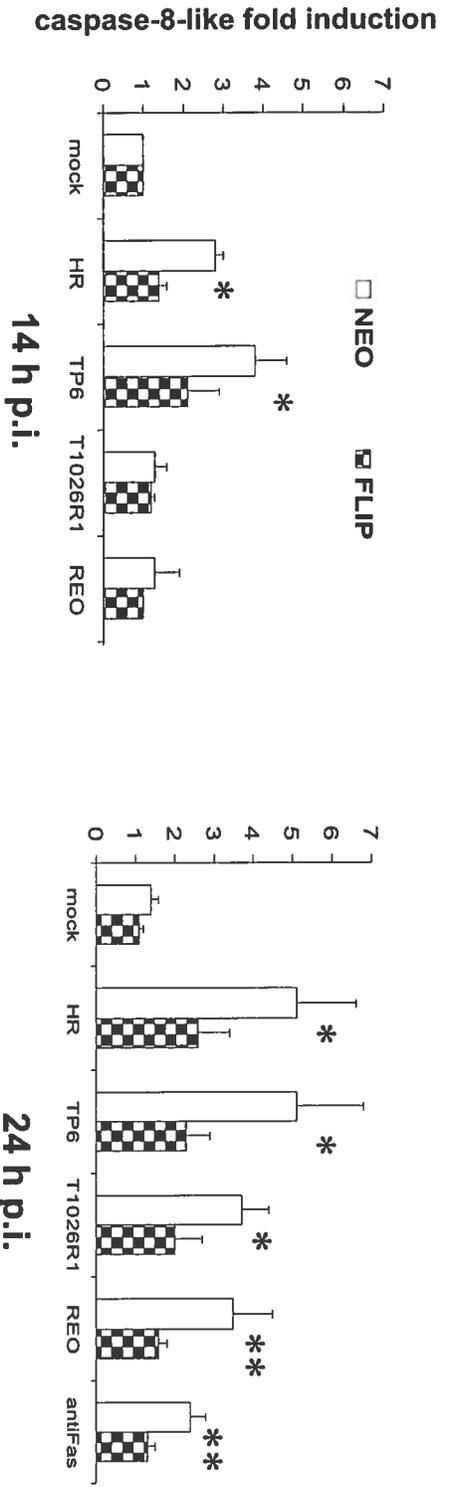


Desforges et al. Fig.6

B



A



B

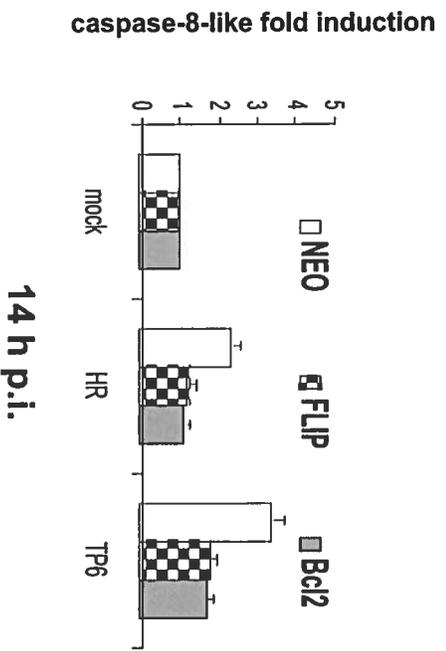


TABLE 1. List of PCR primers used to evaluate the expression of the different transgene transfected in H4 cells

RNA amplified nucleotides	Primer name	Primer sequence 5' to 3'	
Human cFLIP	FLIP-S	GTATACATATGTCTGCTGAAGTCATCCATCAGGTTG	383-418 ^a
Human cFLIP	FLIP-AS	GTGACTCGAGTGTGTAGGAGAGGATAAGTTTCTTTCTC	1822-1785 ^a
Human Bcl-2	Bcl-2-S	TGTGGCCTTCTTTGAGTTCG	1899-1918 ^b
Human Bcl-2	Bcl-2-AS	TCACTTGTGGCTCAGATAGG	2178-2159 ^b
Human GAPDH	GAPDH-H	CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT	78-101 ^c
Human GAPDH	GAPDH-I	AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC	384-361 ^c

^a Tepper and Seldin, 1999

^b Gene Bank access number M13994

^c Gene Bank access number M33197; Lafleur *et al.*, 2001

CHAPITRE IV : VSV ET APOPTOSE; UN CONTEXTE PLUS GLOBAL

11 Matériel et Méthodes

11.1 Cellules et Virus

La lignée de cellules humaines H4 (ATCC-HTB-148) a été cultivée à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂ dans le milieu DMEM contenant 10% (v/v) de sérum de veau fœtal, 100 unités/mL de pénicilline G et 100 µg/mL de sulfate de streptomycine. Le variant VSV-HR et les mutants de la protéine M qui en sont dérivés sont décrits dans le Tableau 1 au chapitre II de cette thèse. Le variant TP6, également dérivé de HR, porte un gène M identique mais sa capacité à induire la production d'IFNβ chez les cellules infectées est toutefois plus grande que celle de HR. La souche New Jersey Hazelhurst est un don du Dr Yong Kang (*University of Western Ontario*). Le réovirus T3D est un don du Dr Guy Lemay de l'Université de Montréal. Les infections ont été réalisées à une multiplicité d'infection (m.o.i.) de 1, les virus étant dilués dans un tampon PBS additionné de 2% (v/v) de sérum de veau fœtal et incubés une heure à 37°C dans un volume minimal variable selon le contenant utilisé pour chaque expérience. Après adsorption d'une heure, les cellules ont été lavées dans le PBS et réadditionnées de milieu DMEM complet. Tous les produits pour la culture cellulaire provenaient de chez *Invitrogen Life Technologies*.

11.2 Viabilité cellulaire avec ou sans inhibiteur

La viabilité des cellules a été estimée par une coloration au bleu de Trypan 0.2% (v/v). Après un traitement de 2 minutes à la trypsine (0.25% p/v), les cellules ont été resuspendues dans du DMEM complet. Quatre volumes de suspension cellulaire étaient mélangés à un volume de bleu de Trypan 1% et le pourcentage de viabilité était évalué en microscopie à l'aide d'un hémacymètre. Les infections en présence des inhibiteurs ZFA-fmk (100 µM) et de cyclosporine A (CsA 10 µM) ont été précédées d'une préincubation des cellules d'une durée de 2 heures dans le DMEM contenant l'inhibiteur à la concentration indiquée. Les cellules servant de témoins ont été incubées en présence de DMSO, le solvant des deux inhibiteurs utilisés. La même période de préincubation a été utilisée pour les infections en présence du Pyrrolidine Dithiocarbamate (PDTC 100

μM). Comme cet inhibiteur est soluble en solution aqueuse, les cellules témoins ont été infectées en présence de PBS dilué dans le milieu DMEM dans les mêmes proportions que le PDTC.

11.3 Préparation d'extraits protéiques et Immunobuvardage de type *Western*

Les cellules ont été préincubées 2 heures en présence de Mu-Val-Hph 100 μM , de ZVAD-fmk 100 μM (Enzyme System) ou de DMSO avant d'être infectées tel qu'indiqué auparavant. Le fractionnement cellulaire des protéines a été réalisé en récupérant les cellules par grattage. Les échantillons ont ensuite été lavés deux fois au PBS, transférés dans un microtube de 1.5 mL et centrifugés 5 minutes à 3500 rpm à 4°C. Les culots récupérés ont été lysés pour une période de 30 secondes dans un tampon digitonine; (1 mg/mL de digitonine (Sigma-Aldrich), 20 mM HEPES pH 7.4 (*Invitrogen Life Technologies*), 250 mM sucrose, 1 mM PMSF (Sigma-Aldrich)). Après centrifugation 30 secondes à 14,000 x g à température ambiante, les lysats ont été remis sur glace. Les surnageants récupérés ont été transférés à un nouveau microtube de 1.5 mL et représentaient les fractions cytosoliques (C). Les culots ont par la suite été lysés dans un tampon de lyse (0.2% (v/v) Triton X-100; 150 mM NaCl; 30 mM Tris-HCl pH 7.2; PMSF 1 mM) pour une période de 10 minutes sur la glace et centrifugés à 4°C pour une période de 15 minutes à 5000 x g. Les surnageants issus de cette centrifugation représentaient la fraction mitochondriale (M) et le culot, qui représentait la fraction nucléaire (N) a été resuspendu dans le tampon digitonine. La concentration en protéines totales des échantillons a été évaluée par la technique de Bradford et les dits échantillons ont été conservés à -20°C jusqu'à analyse. Cinquante microgrammes (détection de Bax) et 30 μg (détection de la sous-unité 30kDa des calpaïnes) de protéines de fraction mitochondriale et cytosolique ont été déposés sur SDS-PAGE et transférés sur membrane de PVDF. La qualité du transfert a été évalué par coloration au rouge Ponceau-S (Sigma-Aldrich).

Les analyses par immunobuvardage visant à détecter la protéine Bax ont été réalisées en incubant les membranes en présence d'un anticorps primaire polyclonal de lapin (BD-Pharmingen) à la dilution de 1/1500 dans le TBS-T (*Tris Buffered Saline* pH

7.6; Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM) additionné de 0.1% (v/v) de Tween-20) additionné de 5% (p/v) de lait en poudre écrémé suivit d'une incubation avec un anticorps secondaire anti-lapin couplé à la HRP (*Horse Radish Peroxydase*) (Amersham Biosciences) à la dilution de 1/7500 dans le TBS-T (*Tris Buffered Saline* pH 7.6; Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM) additionné de 0.1% (v/v) de Tween-20). Les analyses visant à détecter les calpaïnes ont été réalisées en incubant les membranes en présence d'un anticorps primaire monoclonal de souris détectant la sous-unité de 30kDa clivée ou non (Chemicon) à la dilution 1/1500 dans le TBS-T + 5% (p/v) de lait écrémé. La seconde incubation a été réalisée en présence d'un anticorps secondaire anti-souris couplé à la HRP (*Horse Radish Peroxydase*) (Amersham Biosciences) à la dilution de 1/7500 dans le TBS-T. L'immunodétection a été réalisée avec la trousse ECL-Plus (Amersham Biosciences).

11.4 Immunofluorescence indirecte

Les cellules H4ensemencées 48 heures auparavant dans des lames à 16 puits de type LABTEK (Nunc) à raison de 8×10^3 cellules par puits. L'infection (m.o.i. de 1) était réalisée au moment où les cellules atteignaient 90% de confluence, soit 2×10^4 cellules/puits. À 18 heures post-infection, le milieu de culture était retiré et les cellules fixées pour une période de 20 minutes à température ambiante dans une solution de paraformaldéhyde 4% (p/v), perméabilisées 5 minutes au méthanol froid (-20°C) et lavées trois fois au PBS. L'immunodétection de Bax était réalisée à l'aide de l'anticorps primaire polyclonal de lapin (Santa Cruz N-20) à la dilution 1/200 dans le PBS. Après une incubation d'une heure à température ambiante dans le noir, les cellules étaient lavées trois fois au PBS puis réincubées en présence d'un anticorps secondaire couplé au fluorochrome AlexaFluor-488 (Molecular Probes) dilué à 1/1500 dans le PBS. Après 3 lavages au PBS, les cellules étaient incubées 5 minutes en présence d'une solution de DAPI 1µg/mL afin de pouvoir observer les noyaux. Le milieu de montage subséquent était le gelvatol.

12 Résultats / Discussion

Le but ultime de toute l'étude présentée dans les pages de cette thèse était d'établir comment le sérotype New Jersey et différents mutants de la protéine M du sérotype Indiana du VSV pouvaient induire une infection persistante. Le coeur des résultats concerne l'infection d'une lignée de cellules humaines issue du système nerveux central. Les principaux résultats sont présentés dans deux articles (chapitre II et III) et permettent de mettre en lumière l'implication de la bonne mise en œuvre du processus apoptotique pour éviter l'établissement d'une persistance par VSV. Bien que certains points liés aux mécanismes d'induction de l'apoptose soient expliqués, plusieurs questions restent en suspens.

Les résultats complémentaires du chapitre IV représentent des données préliminaires mais tout de même fort intéressantes pouvant aider à élaborer un portrait plus complet du processus menant à la mort ou à la survie de cellules infectées par nos différents variants de VSV. Les sections 12.1 et 12.2 de ce chapitre comprennent d'abord un retour sur les principaux résultats présentés dans les chapitres II et III dans un contexte plus large et les sections 12.3 et 12.4 apportent une ouverture sur quelques facteurs supplémentaires qui pourraient être impliqués dans le phénomène d'induction d'apoptose par VSV. Afin de tenter de tracer un portrait plus global des mécanismes associés à l'induction du processus apoptotique par VSV, une réflexion sur une série de résultats préliminaires suggérant des avenues possibles concrètes pour compléter le portrait d'induction d'apoptose par VSV est présentée à la section 12.5. La section 12.6 propose un modèle rassemblant les données expérimentales jumelées aux connaissances théoriques sur l'apoptose en général et finalement la section 12.7 décrit certaines conséquences néfastes potentielles d'une induction inadéquate ou inefficace d'apoptose lors d'une infection naturelle ou artificielle par VSV au SNC.

12.1. Induction d'apoptose et prévention d'infection persistante par VSV

L'article composant le chapitre II (Desforges *et al.*, 2002) démontre que VSV induit l'apoptose de cellules humaines provenant du SNC et suggère qu'une induction inefficace de ce processus est un des facteurs lié à l'établissement possible d'une infection persistante. Dans le cas du sérotype Indiana, l'ensemble des résultats du chapitre II suggère fortement que la protéine M soit impliquée dans le processus. La figure 7 de cet article suggère que l'expression ectopique de cette protéine sans aucun autre facteur viral puisse induire la fragmentation d'ADN et que cette caractéristique apoptotique est diminuée lorsqu'une protéine M mutante est exprimée. Le choix de faire exprimer la protéine M seule en utilisant une technique de transfection d'ARNm s'explique par les nombreux insuccès à réussir à obtenir une bonne expression de la protéine M (expression transitoire ou obtention de lignées stables avec expression du gène M sous le contrôle de promoteurs inductibles), probablement à cause de l'effet d'inhibition engendrée par la protéine M sur une très grande quantité de promoteur, un phénomène lié à la fonction d'inhibition de transcription de M. En fait, même s'il semble, dans certaines circonstances, possible de faire exprimer la protéine M à partir d'un ADNc cloné dans un vecteur d'expression (Terstegen *et al.*, 2001) ou encore à l'aide d'un système d'infection utilisant le virus de la vaccine (Black *et al.*, 1993), par la transfection d'un ARNm, on évite la possible répression sur un promoteur dont l'activité dépend de la transcription de l'hôte pour faire exprimer un gène M cloné dans un vecteur d'expression et le niveau de détection de la protéine M est en général meilleur. L'utilisation d'un vecteur viral de type adénovirus modifié, permettant l'expression de protéine toxique de façon inductible par l'utilisation du système tétracycline, pourrait être envisagée étant donné la possibilité de faire produire des protéines toxiques en bonne quantité à l'intérieur de cellules eucaryote (Gagnon *et al.*, 2003).

Néanmoins, le résultat présenté à la figure 7 du chapitre II est qualitatif et corrobore des résultats obtenus par d'autres auteurs (Kopecky *et al.*, 2001). Toutefois, l'expression de la protéine M n'a pas été mesurée suite à la transfection d'ARNm. Or, on sait aujourd'hui que l'expression de la protéine M mutante provenant du mutant

T1026R1 (M51R), utilisée dans l'expérience, nécessite la transfection d'environ 10 fois plus d'ARNm pour obtenir un niveau d'expression de protéine M comparable à celui de la protéine M de type sauvage (Ahmed *et al.*, 2003). De plus, la quantité de cellules positive pour la réaction *TUNEL*, indiquant une fragmentation d'ADN, est significativement plus faible que suite à l'infection par VSV. Il appert qu'une quantité beaucoup moins importante de protéine M est synthétisée lors d'une transfection que lors d'une infection par le virus entier (Black *et al.*, 1994; Black et Lyles, 1992) ce qui peut expliquer la moins grande quantité de cellules H4 en apoptose lorsque M est transfectée seule (Figure 7) que lors de l'infection par VSV (Figure 3). Il convient donc, comme il a été fait dans l'article présenté au chapitre II, d'être prudent sur la signification réelle du résultat présenté. Une étude utilisant une co-transfection d'un ARNm de M et un excès d'ARNm de la *Enhanced Green Fluorescence Protein* (EGFP) ou encore où les différents gènes M seraient clonés en fusion avec celui de la EGFP permettrait aisément de mesurer la quantité de cellules réellement transfectée et présentant des symptômes apoptotiques en faisant une réaction *TUNEL* ou une quelconque mesure de fragmentation d'ADN caractéristique de l'apoptose.

Quoiqu'il en soit, il est clairement démontré que la protéine M exprimée seule dans un cellule, peut induire l'apoptose (Kopecky et Lyles, 2003a; 2003b; Kopecky *et al.*, 2001) et des résultats comparant des virus recombinants issus de la souche Indiana dont seule la protéine M varie, démontre que l'induction d'apoptose est retardée dans les cellules HeLa (Kopecky et Lyles 2003b). Il appert que cette baisse dans l'induction d'apoptose par la protéine M mutante ne survient que dans des cellules où l'induction d'apoptose ne nécessite pas de modulation de transcription de gènes liés à l'apoptose. En fait, il semble que la fonction d'inhibition d'expression des gènes de la cellule-hôte liée à la protéine M de type sauvage soit directement responsable de l'induction d'apoptose dans les cellules HeLa (Kopecky et Lyles, 2003a). Les cellules H4 utilisées dans notre modèle, semblent être du même type que les cellules HeLa en rapport à l'induction d'apoptose par VSV. En effet, l'induction d'apoptose est la plus forte et la plus rapide

lors de l'infection par les variants Indiana HR et TP6 qui possèdent tous deux la même protéine M de type sauvage associé à une capacité à inhiber la transcription chez l'hôte.

Nos résultats suggèrent fortement que la relocalisation de la protéine Bax est un événement précoce essentiel dans l'induction d'apoptose induite lors de l'infection par VSV. Bien que la preuve irréfutable du rôle de Bax dans ce processus et le mécanisme menant à son activation, en induisant sa translocation vers la mitochondrie, ne soit pas illustrés dans les chapitres II et III, la section 12.5 suggère des avenues possibles. Il est très fortement suggéré que la protéine M puisse jouer un rôle dans l'induction d'apoptose dans les cellules H4 (Desforges et al, 2002) comme elle peut le faire dans d'autres modèles (Kopecky et Lyles, 2003a; 2003b; Kopecky *et al.*, 2001). Quoiqu'il en soit, l'implication de la protéine M n'est pas directement démontrée dans l'activation de Bax. Des études de surexpression de M pourront être entreprises dans les cellules H4 afin vérifier si l'induction d'apoptose déjà observée (Desforges *et al.*, 2002) est associée à la relocalisation de Bax vers la mitochondrie. Néanmoins, le séquençage complet des génomes des variants Indiana moins virulents n'a pu démontrer aucune autre mutation que celles identifiées dans la protéine M lorsque comparé au variant HR (Desforges *et al.*, 2001).

Les résultats présentés dans les chapitres II (Figure 5A) et III (Figure 6) suggèrent également que l'apoptose induite lors de l'infection par VSV induit plusieurs voies apoptotiques de façon simultanée en impliquant l'activation de caspase-8 et -9; ce qui corrobore des données déjà publiées par d'autres auteurs (Balachandran *et al.*, 2001). Dans leurs travaux présentés en 2003, Kopecky et Lyles (2003b), démontrent que l'activation de la caspase-9 associée à la voie mitochondriale est la voie principalement activée par la protéine M sans toutefois mettre de côté l'importance de la caspase-8 dans le portrait global. Nos résultats indiquent que suite à l'infection par VSV, la survie cellulaire est augmentée lors d'une inhibition chimique de caspase ou lors de l'expression ectopique de Bcl-2, (inhibiteur de la voie apoptotique mitochondriale empêchant habituellement l'activation de la caspase-9) ou de l'inhibiteur naturel de la caspase-8 cFLIP (Krueger *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent que l'activité des deux

caspace survient lors de l'infection par VSV. De plus, la figure 5C du chapitre III indique que l'expression ectopique de Bcl-2 retarde l'activation de la caspase-3 et la figure 7B, celle de la caspase-8, ce qui laisse présager que l'activation de la caspase-8 surviendrait en aval de la perméabilisation de la membrane mitochondriale suite à une translocation de Bax vers cet organelle. Le retard d'activation *caspase-8-like* observée lors l'infection par le mutant de la protéine M T1026R1, supporte cette hypothèse puisque la relocalisation de la protéine Bax vers la mitochondrie est moins rapide lors de l'infection des cellules H4 par ce mutant. Ainsi, l'activation de la caspase-8 pourrait servir en quelque sorte de système d'amplification à la voie mitochondriale qui elle représenterait la voie apoptotique principale induite par la protéine M de VSV, tel que suggéré par les résultats de Kopecky et Lyles (2003b).

12.2 Induction d'apoptose liée aux récepteurs de mort

L'activation de caspase-8 (parfois de la caspase 10) survient très souvent suite à un stimulus utilisant la voie extrinsèque liée aux récepteurs de mort (Sartorius *et al.*, 2001; Hengartner, 2000) et de nombreux virus utilisent cette façon de faire pour induire en tout ou en partie l'apoptose de cellules infectées. En effet, le réovirus (Richardson-Burns *et al.*, 2002; Clarke *et al.*, 2001; 2000), le virus *Influenza* (Balachandran *et al.*, 2000), le virus de Sindbis (Sarid *et al.*, 2001), le virus de l'hépatite C (Zhu *et al.*, 2001; 1998), le HIV (de Oliveira Pinto *et al.*, 2002; Pinti *et al.*, 2000) le MHV (Chen et Makino, 2002) peuvent tous induire l'apoptose reliée à la voie des récepteurs de mort. Dans le cas de VSV, il a été démontré que l'ajout de TNF- α durant l'infection par le sérotype New Jersey accélérerait l'induction d'apoptose dans les cellules HeLa infectées (Koyama *et al.*, 1998b), suggérant peut-être un effet additif entre VSV-New Jersey et le TNF- α ou la possibilité que le virus induise l'apoptose par une voie différente de celle impliquant les récepteurs de mort dans ce type cellulaire. Quoiqu'il en soit, le tout reste à prouver et il n'a jamais été directement démontré que VSV pouvait induire la voie des récepteurs de mort pour activer la caspase-8. Les résultats présentés au chapitre III ainsi

que ceux des équipes de D.S. Lyles (Kopecky et Lyles, 2003b) et de G.N. Barber (Balachandran *et al.*, 2001) indiquent que la caspase-8 joue un rôle lors de l'induction d'apoptose suite à l'infection par VSV. Toutefois, il semble que cette activation soit plus significative lors de l'induction d'apoptose suite à l'infection par VSV dans notre modèle. Comme préalablement mentionné, nos résultats suggèrent que l'activation de caspase 8 agirait comme une sorte de système d'amplification de la voie mitochondriale puisque la surexpression de Bcl-2 altère l'activation de la dite caspase, ce qui n'exclut pas que la caspase-8 puisse être activée par la voie des récepteurs de mort comme c'est le cas pour le réovirus T3D (Clarke *et al.*, 2001). La voie apoptotique liée aux récepteurs de mort est associée à la formation du DISC et peut faire intervenir des molécules différentes selon le récepteur particulier sollicité. Comme la molécule cFLIP joue habituellement son rôle inhibiteur au niveau du DISC (Krueger *et al.*, 2001), nos résultats suggèrent fortement une activation de la voie des récepteurs de mort, notamment suite à l'infection par les variants VSV-Indiana portant une protéine M de type sauvage. Quoiqu'il en soit, la protéine cFLIP peut être phosphorylée et devenir moins efficace pour s'associer au DISC et prévenir l'apoptose (Higuchi *et al.*, 2003). Il conviendrait de vérifier si ce phénomène survient dans notre modèle. De plus, la protéine adaptatrice FADD est toujours présente dans le DISC. Ainsi, l'expression ectopique d'un mutant de type *dominant négative* (DN-FADD) serait une bonne façon de démontrer si l'activation de caspase-8 associée à l'infection par VSV peut, entre autre, être liée à l'induction d'apoptose via des récepteurs de mort. De plus, en engendrant une lignée cellulaire surexprimant à la fois Bcl-2 et le DN-FADD, il serait beaucoup plus aisé de départager l'importance des voies mitochondriale et des récepteurs de mort suite à l'infection par VSV.

12.3 Induction d'apoptose : les autres facteurs possibles

L'inhibition partielle d'activation de caspase-8 par la surexpression de Bcl-2 dans notre modèle, peut aussi suggérer un rôle de la caspase-12 dans l'induction d'apoptose par VSV. Située au niveau du réticulum endoplasmique cette caspase est capable d'activer la caspase-8 (Jimbo *et al.*, 2003) et une surexpression de Bcl-2 peut modifier

cette cascade pro-apoptotique étant donné la présence de ce facteur anti-apoptotique au niveau de la membrane de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique (Häcki *et al.*, 2000). De plus, la caspase 12 peut être activée par les calpaïnes (Nakagawa et Yuan, 2000). Sachant que ces protéases semblent activées lors de l'infection par VSV (Fig. 4A), il serait opportun de vérifier dans quelle mesure la caspase 12 peut être activée et participer à la cascade apoptotique induite lors de l'infection par VSV.

On l'a vu dans le chapitre I, nombre d'autres facteurs cellulaires peuvent d'une façon ou d'une autre participer à l'induction d'apoptose. Une des voies d'induction d'apoptose fait intervenir la formation de céramides par les sphingomyélinases à partir de la membrane plasmique. Comme décrit auparavant, ces lipides peuvent influencer la voie mitochondriale d'apoptose en favorisant la relocalisation de Bax vers la mitochondrie (von Haefen *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2001). Il a déjà été démontré que le virus de Sindbis pouvait induire l'apoptose en partie par la formation des dits céramides même lorsqu'un virus traité aux U.V. et donc non-répliquatif est utilisé. Ce phénomène est à relier d'une quelconque façon à l'acidification lysosomiale puisque lorsque ce dernier processus est bloqué par le NH₄Cl, la génération de céramides est inhibée (Jan *et al.*, 2000). Un fait encore plus intéressant provient du fait que lorsqu'une très forte multiplicité d'infection est utilisée pour infecter des cellules Vero-76 par un VSV-Indiana (San Juan) inactivé aux U.V., il peut y avoir induction d'apoptose et que, comme préalablement mentionné, le traitement des cellules au NH₄Cl altère le processus apoptotique induit par VSV dans ces cellules (Gadaleta *et al.*, 2002).

La protéine AIF est certainement un candidat intéressant dont il faudrait évaluer l'impact sur l'induction d'apoptose lors de l'infection par VSV. En effet, ce facteur peut passer de la mitochondrie vers le cytosol pour finir au noyau et engendrer la fragmentation de l'ADN et l'apoptose indépendamment de l'activation des caspases (Candé *et al.*, 2002). Au moins un virus, le HSV-1, induit la translocation de AIF vers le noyau et donc induit une apoptose partiellement indépendante de l'activation de caspases (Zhou et Roizman, 2000). Selon les résultats de survie cellulaire présentés au chapitre II (Desforges *et al.*, 2002), la présence de l'inhibiteur des caspases zVAD-fmk permet une

survie d'environ 80% des cellules à 48 heures post-infection. Le 20% de cellules n'étant pas protégé pourrait être confronté à une induction d'apoptose reliée à AIF. De plus, la translocation de Bax à la mitochondrie et son insertion dans la membrane externe mitochondriale favorise le passage sélectif de AIF vers le cytosol (Bidère *et al.*, 2003).

Finalement, la caspase-2 pourrait représenter un facteur pro-apoptotique dont il conviendrait de vérifier l'activation dans notre modèle. Cette caspase est notamment capable de favoriser directement la libération de cytochrome c et d'autres facteurs apoptogènes vers le cytosol et donc de participer à l'induction d'apoptose via la voie intrinsèque (Guo *et al.*, 2002).

12.4 Mort cellulaire induite par d'autres processus que l'apoptose

Certains auteurs ont également décrit que l'inhibition des caspases par le zVAD-fmk pouvait mener à un changement dans le type de mort cellulaire observé. En effet, il appert qu'en présence de zVAD-fmk, des lymphocytes B (Lemaire *et al.*, 1998) et des neurones (Nicotera, 2002; 2000) qui auraient dû mourir par apoptose, finissent plutôt par mourir par un processus nécrotique associé à une déplétion en ATP dans les cellules. Enfin, la paraptose, un mode de mort cellulaire à mi-chemin entre l'apoptose proprement dite et la nécrose a déjà été décrite (Chen *et al.*, 2002; Sperandio *et al.*, 2000). À l'instar de l'apoptose, il s'agit d'un processus actif nécessitant de l'énergie mais qu'il n'est pas possible d'inhiber par le zVAD-fmk et où l'on observe ni fragmentation d'ADN ni activation de caspase-3 (Sperandio *et al.*, 2000).

Quoiqu'il en soit, parmi toute la panoplie de facteurs pouvant être associés à l'induction d'apoptose par VSV, certaines pistes sont ouvertes par quelques données préliminaires présentées dans la prochaine section. Ces résultats complémentaires suggèrent quelques voies à explorer pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le contrôle de l'apoptose induite lors de l'infection par VSV.

12.5 Résultats préliminaires et discussion complémentaire aux chapitres II et III

La section 12.5 présentée ici, suggère des avenues ayant entre autres trait aux mécanismes possibles pour expliquer la relocalisation de la protéine Bax du cytosol vers la mitochondrie suite à l'infection par VSV. Ces résultats font référence aux Figures 4 et 6. Une implication potentielle du facteur transcriptionnel NF- κ B dans la régulation de la mort cellulaire induite suite à une infection par VSV est également mise en évidence à la figure 5.

12.5.1 Les Calpaïnes

La Figure 4A présente une analyse par immunobuvardage de type *Western* d'échantillons protéiques de fraction cytosolique (C) et mitochondriale (M), où l'on peut voir un court fragment de 18 kDa correspondant à un produit clivé de la sous unité 30 kDa de la calpaïne. L'échantillon témoin, récolté à partir de cellules n'ayant subies aucun traitement, présente un tel fragment au niveau de la fraction cytosolique. Il semble donc qu'il y ait une activité constitutive basale et physiologiques de calpaïnes à l'intérieur des cellules H4, comme c'est le cas pour d'autres types cellulaires en rapport à des fonctions de motilité (Potter *et al.*, 1998), de contrôle de neurotransmetteurs (Bi *et al.*, 1998) ou du cycle cellulaire (Choi *et al.*, 1997). Le processus d'extraction de protéines par fractionnement cellulaire pourrait également induire un faible niveau d'activation de ces protéases (Wood *et al.*, 1998). Dans l'échantillon représentant des cellules ayant été traitées à la camptothécine (CPT), un inhibiteur de la topoisomérase I et un agent reconnu pour induire l'activation de la calpaïne (Mandic *et al.*, 2002), le clivage de la calpaïne apparaît important. L'échantillon de protéines extraites à partir de cellules infectées par VSV-TP6 présente le même fragment de 18 kDa pouvant être associé à l'activation de calpaïnes.

La Figure 4B présente également une analyse de type *Western* à partir d'échantillons protéiques de fraction cytosolique (C) et mitochondriale (M) récoltés lors de l'infection par VSV-TP6 ou lors de l'exposition des cellules à la CPT. La détection

d'un fragment de 21 kDa représente la protéine Bax native et un second fragment de 18 kDa, issu du clivage de Bax est également détecté.

L'implication possible des calpaïnes dans l'induction du processus de mort cellulaire, dont il est fait mention dans la portion discussion de l'article présenté au chapitre II, semble être vérifiée lors de l'infection par le variant VSV-Indiana-TP6, soit le plus virulent, tel que l'illustre l'apparition d'un fragment de 18 kDa (Fig. 4A), souvent associé au clivage partiel de la petite sous-unité de 30 kDa de la calpaïne (Wang, 2000). De plus, lorsque activées, les calpaïnes peuvent également cliver certaines protéines régulatrices de l'apoptose, dont Bax (Choi *et al.*, 2001; Gao et Dou, 2000; Wood *et al.*, 1998) et Bid (Mandic *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2001), en augmentant leur pouvoir pro-apoptotique (Mandic *et al.*, 2002; Wood et Newcomb, 2000). Tel qu'observé (Fig. 4B), le clivage de Bax survient lors de l'infection par VSV-TP6 en générant, comme dans le cas des cellules exposées à la camptothécine, un fragment de 18 kDa. Bien que ne démontrant pas à lui seul l'activation réelle de calpaïne, l'apparition de ce fragment de Bax, jumelé à la détection d'un fragment clivé de 18 kDa dans les fractions cytosolique et mitochondriale lors de la détection de calpaïne, suggère fortement que ces cystéines protéases peuvent être activées pendant l'infection des cellules H4 par VSV-TP6. Des expériences réalisées en présence de divers inhibiteurs chimiques de calpaïne, ont bel et bien permis de confirmer que le clivage de Bax survient à la mitochondrie mais n'ont malheureusement pas permis de confirmer avec certitude que ce clivage était dû à la calpaïne (Fig. 4B). En fait, il semble que l'inhibiteur Mu-Val-Hph (Enzyme System) inhibe partiellement le clivage de Bax lors de l'infection des cellules par VSV-TP6 et lors d'un traitement à la camptothécine (Figure 4B). Cependant, la même analyse réalisée sur des cellules témoins démontre qu'il y a clivage de Bax à la mitochondrie (Figure 4B), toutefois, bien que réel, ce niveau basal est très faible comme l'est aussi l'activation de calpaïnes, presque inexistante dans les fractions mitochondriales (Fig. 4A). De plus, le niveau d'activation de calpaïne (apparition du fragment de 18 kDa) est beaucoup plus important suite au traitement des cellules par la CPT, un témoin positif d'activation de ces protéases cellulaires. La quantité de protéine Bax clivée est également augmentée de façon importante dans la fraction mitochondriale des cellules

ayant été traitées à la CPT ou infectées par VSV-TP6. Ce résultat corrobore celui présenté à la figure 2 du chapitre III où l'on observe une translocation de Bax vers la mitochondrie. L'anticorps utilisé dans l'analyse de type *Western* présentée à la Figure 4B permet toutefois de détecter les formes complètes et clivées de Bax tandis que l'anticorps utilisé pour l'analyse de la Figure 2 du chapitre III ne peut pas détecter la forme clivée de 18 kDa de Bax.

Néanmoins, l'inhibiteur chimique (Mu-Val-Hph), reconnu pour inhiber les calpaïnes, représente un outil très peu efficace dans notre modèle. De nouvelles expériences réalisées en présence de calpastatine, l'inhibiteur cellulaire naturel des calpaïnes devraient être entreprises afin de vérifier que l'apparition des fragments de 18 kDa associés à la calpaïne activée et à Bax, sont véritablement imputables à une activation de calpaïnes.

Parmi les substrats possibles des calpaïnes, on retrouve également quelques caspases et selon le stimulus de départ, les calpaïnes peuvent avoir un effet positif sur l'activation de la caspase-3 (Blomgren *et al.*, 2001) ou un effet négatif en inactivant les caspases -8 et -9 qui ne seront plus en mesure d'activer adéquatement la caspase-3 (Tin Chua *et al.*, 2000). Ainsi, les calpaïnes pourront servir de système d'amplification ou de régulation négative de l'apoptose selon le cas. D'un autre côté, les calpaïnes peuvent être activées de façon importante par les caspases -1, -3 et -7, ce qui mène à une apoptose plus importante et rapide (Kato *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1998). Dans le cas de l'infection par VSV, il est peu probable que l'activation suspectée de calpaïnes soit associée à un mode de régulation négative de l'apoptose. En effet, cette possible activation semble survenir de façon notable lors de l'infection par VSV-TP6, soit le variant induisant le plus rapidement l'apoptose dans les cellules H4. Il est également connu que les calpaïnes et les caspases peuvent agir en synergie pour causer l'apoptose de neurones dans la région de l'hippocampe au niveau du SNC chez le rat (Rami *et al.*, 2000) ou chez les mêmes neurones en cultures primaires (Newcomb-Fernandez *et al.*, 2001).

Enfin, il a déjà été démontré que les calpaïnes pouvaient être activées de façon très précoce et associées à l'induction d'apoptose suite à l'infection par les réovirus T3A et T3D (DeBiasi *et al.*, 1999). De plus, les calpaïnes peuvent avoir un effet direct sur

l'activation des facteurs transcriptionnels de la famille NF- κ B. En effet, suite à une exposition au TNF α , l'activation rapide de la calpaïne II peut mener à la dégradation de I κ B α et donc engendrer l'activation de NF- κ B (Han *et al.*, 1999). Sachant qu'une infection par le réovirus T3D engendre à la fois une activation des calpaïnes (DeBiasi *et al.*, 1999) et de NF- κ B (Connolly *et al.*, 2000), il paraît intéressant et très pertinent de chercher à déterminer si ces événements surviennent lors de l'infection par le VSV, d'autant plus que les résultats préliminaires de la Figure 4 jumelés à ceux de la Figure 5 (survie cellulaire en présence d'inhibiteur de NF- κ B) permettent de spéculer que les calpaïnes et NF- κ B sont activés et peuvent avoir un rôle à jouer lors de l'infection par VSV-TP6.

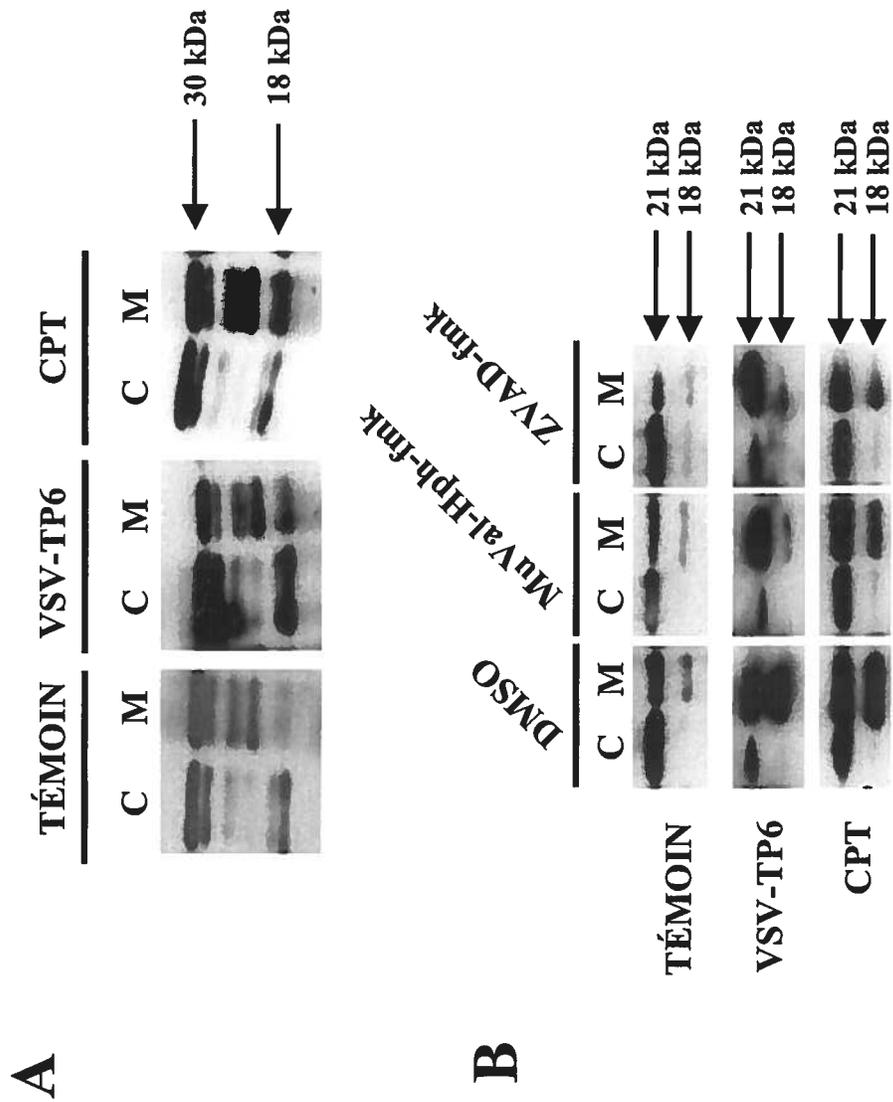


Fig. 4. Immunobuvardage de type *Western* montrant l'activation de calpaïnes et le clivage de Bax lors de l'infection de cellules H4 par VSV-TP6 et suite à un traitement par la camptothécine (CPT). (A) Détection d'un fragment de 18 kDa correspondant à la petite sous-unité de calpaïne activée. Le niveau de base dans cytosol témoin est augmenté suite à l'infection par VSV-TP6 et le traitement à la CPT. (B) Détection d'un fragment de 18 kDa correspondant à la protéine Bax clivée. MuVal-Hph-fmk; inhibiteur de calpaïne et ZVAD-fmk; inhibiteur de caspases. Niveau de base dans mitochondrie témoin est augmenté suite à l'infection par VSV-TP6 et le traitement à la CPT.

12.5.2 NF- κ B, Apoptose et Infection virale

Les résultats présentés en rapport à une implication possible du facteur transcriptionnel NF- κ B sont très préliminaires mais aussi très intéressants. La Figure 5 illustre que la viabilité cellulaire est augmentée de façon significative pour le réovirus T3D lorsque l'infection est réalisée en présence de PDTC, un inhibiteur reconnu pour altérer l'activité de NF- κ B. Le réovirus est utilisé comme témoin positif pouvant induire une apoptose liée à l'activation du facteur NF- κ B. L'augmentation de survie cellulaire est encore plus significative pour les infections de cellules H4 réalisées par VSV-HR et VSV-TP6, les deux variants de VSV-Indiana possédant la séquence de type sauvage du gène M.

Le terme NF- κ B est générique et réfère en fait à un ensemble de facteurs transcriptionnels dimériques. Chez les vertébrés, on compte 5 protéines regroupées en 2 classes. Les protéines c-Rel, RelA (p65) et RelB, sont synthétisées sous forme mature, alors que p100 et p105 doivent subir un clivage menant respectivement à la production des protéines p52 et p50. L'action des facteurs dimériques NF- κ B est régulée par un mécanisme de navette entre le cytoplasme et le noyau et fait intervenir les facteurs I κ B (*Inhibitor of κ B*), inhibiteurs cellulaires naturels de l'activation des facteurs NF- κ B (Karin et Lin, 2002). L'activation des facteurs transcriptionnels de la famille Rel / NF- κ B peut survenir suite à une panoplie de stimuli différents en général reliés aux processus de croissance ou de différenciation cellulaire ainsi qu'à la régulation de la réponse inflammatoire et de l'apoptose (Barkett et Gilmore, 1999). NF- κ B peut participer à l'inhibition ou à l'induction d'apoptose, probablement selon le type cellulaire et le stimulus auquel fait face la cellule. Lors de l'inhibition de l'apoptose, NF- κ B engendre l'augmentation d'expression de plusieurs gènes dont les IAP (*Inhibitors of Apoptosis*), des inhibiteurs naturels cellulaires des caspases -3, -6, -7 et -9. Ainsi NF- κ B peut participer à l'inhibition d'apoptose induite autant via la voie intrinsèque qu'extrinsèque (Karin et Lin, 2002). D'autre part, la fonction pro-apoptotique de NF- κ B est plutôt à relier à sa capacité à augmenter l'expression de facteurs de la famille des récepteurs au TNF et à diminuer l'expression de gènes de la famille Bcl-2 (Barkett et Gilmore, 1999).

L'infection virale est un des stimuli pouvant engendrer l'activation de NF- κ B. Lors de cette activation, le rôle dans la régulation de l'apoptose est parfois sollicité. L'infection par le HHV-8 (Keller *et al.*, 2000), le HTLV-1 (Kawakami *et al.*, 1999) et le EMCV (Schwarz *et al.*, 1998) induisent un rôle anti-apoptotique alors que l'infection par le virus de Sindbis (Lin *et al.*, 1998) et le réovirus T3D (Clarke *et al.*, 2000; Connolly *et al.*, 2000) induisent plutôt la fonction pro-apoptotique de NF- κ B.

Le mutant T1026R1 de VSV-Indiana, induit une activation de NF- κ B alors que le virus de type sauvage HR semble pouvoir empêcher cette activation (Hamid Boulares *et al.*, 1996). Il n'est toutefois pas connu si NF- κ B joue un rôle dans la modulation de l'apoptose induite lors de l'infection par VSV. L'importante augmentation du taux de survie cellulaire observée suite à l'infection par les variants HR et TP6, portant tous deux la protéine M Indiana de type sauvage, en présence de PDTC, pourrait suggérer que le facteur transcriptionnel NF- κ B est impliqué dans la régulation du processus de mort cellulaire suite à l'infection. En effet, le PDTC, un agent chélateur des métaux lourds ayant des propriétés antioxydantes, est reconnu pour sa capacité à inhiber NF- κ B de façon importante dans plusieurs types cellulaires (Bian *et al.*, 2002; Bian *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2001; Kawakami *et al.*, 1999). Sachant que le mutant T1026R1 peut induire l'activation de NF- κ B, on se serait attendu à observer une différence dans le taux de survie cellulaire suite à l'infection par ce virus en présence d'un inhibiteur de NF- κ B, si ce dernier joue un rôle dans l'induction de l'apoptose par VSV. Cependant, comme l'indique la Figure 2, le taux de survie des cellules est le même en présence et en absence d'inhibiteur de NF- κ B suite à l'infection par le mutant T1026R1, de même que lors de l'infection par tous les variants Indiana portant une ou des mutations dans la protéine M de même que pour le virus de sérotype New Jersey. Si le PDTC agit bel et bien en inhibant NF- κ B dans notre modèle, il semble plutôt logique de penser que ce facteur transcriptionnel est activé lors de l'infection par les virus Indiana portant une protéine M de type sauvage et qu'il joue un rôle proapoptotique.

D'autre part, on sait que des fibroblastes embryonnaires de souris déficientes pour la kinase PKR sont beaucoup plus sensibles à l'induction d'apoptose par VSV

(Balachandran *et al.* 2000c), ce qui démontre l'importance d'une activation de cette kinase lors d'une infection par VSV. Comme une des nombreuses fonctions attribuées à PKR est justement l'activation de NF- κ B (Goodbourn *et al.*, 2000), il devient d'autant plus opportun de vérifier si NF- κ B est impliqué dans l'apoptose induite suite à une infection par VSV et s'il l'est, de quelle façon.

Des études de transfections transitoires de mutant « dominant négatif » de I κ B α , (un des membres de la famille I κ B) sont présentement en cours afin de vérifier plus adéquatement le rôle de NF- κ B dans la régulation de l'apoptose induite par VSV. La transfection transitoire de plasmide portant le gène rapporteur de la luciférase (*Luc*) sous le contrôle d'un promoteur minimal sur lequel NF- κ B peut se lier afin d'engendrer l'expression de luciférase, est également débutée afin de mesurer l'activation relative de NF- κ B pour chacun des variants VSV utilisés dans notre modèle.

La filière apoptose / PKR / NF- κ B serait certainement à étudier plus à fond dans le cas d'une infection par VSV. En effet, puisque PKR et NF- κ B sont reliés à la voie de réponse à l'IFN (Samuel, 2001) et à l'infection par VSV (Balachandran *et al.*, 2000c; Ferran et Lucas-Lenard, 1997), il convient d'analyser les choses plus en profondeur. Sachant qu'un des modèles d'action de l'IFN suggère l'induction d'apoptose dans les cellules infectées et la protection des cellules avoisinantes (Tanaka *et al.*, 1998), il apparaît de mise de vérifier si l'infection par VSV confirme ou infirme ce modèle. Toutefois, étant donné l'activation de PKR mesurée lors d'une infection par VSV (Balachandran *et al.*, 2000) et l'importance de cette kinase pour protéger des cellules primaires contre cette infection (Stojdl, *et al.*, 2000a, Balachandran *et al.* 2000c), il semble peu probable que PKR et NF- κ B soit impliqués ensemble pour induire l'apoptose des cellules infectées par VSV dans notre modèle. Cependant, le fait que certains de nos variants VSV puissent persister à l'intérieur des cellules H4 pourrait peut-être être attribuable à un défaut d'activation de PKR. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que les variants Indiana possédant une protéine M de type sauvage (VSV-HR et VSV-TP6) tuent les cellules en utilisant entre autres voies, PKR, qui irait activer NF- κ B qui jouerait un rôle pro-apoptotique dans notre modèle utilisant des cellules immortalisées.

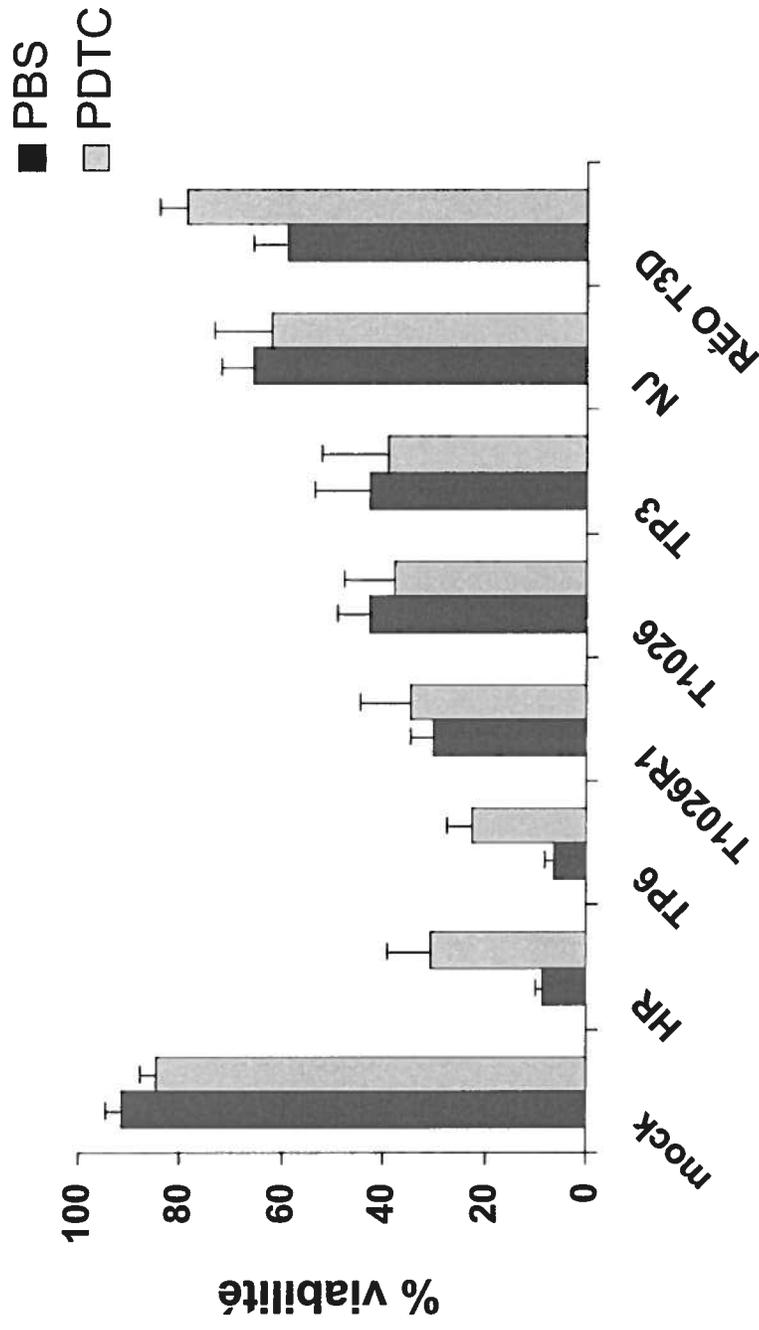


Fig. 5. Survie cellulaire accrue suite à l'infection des cellules H4 par les variants non persistants de VSV-Indiana en présence de PDTC, un inhibiteur du facteur transcriptionnel NF- κ B. La présence de PDTC augmente la survie cellulaire de façon significative lors de l'infection des cellules par les variants VSV-Indiana HR et TP6 ainsi que lors de l'infection par le réovirus T3D servant de témoin positif pour l'implication de NF- κ B dans l'induction de mort cellulaire par apoptose.

12.5.3 Les Cathepsines et autres facteurs lysosomiaux

Tel qu'illustré à la Figure 6 du chapitre III ainsi qu'à la Figure 6A dans la présente section, les cathepsines pourraient avoir un rôle précoce à jouer lors de l'apoptose induite par le VSV dans notre modèle. En effet, en inhibant la cathepsine B, une des cathepsines les plus en vue en rapport à l'induction d'apoptose (Johnson, 2000), l'inhibiteur zFA-fmk (inhibiteur des cathepsines B et L) retarde de façon très marquée la translocation de Bax vers la mitochondrie, et de ce fait la fragmentation d'ADN caractéristique de l'apoptose (Chapitre III, Desforges *et al.*, en préparation 2003). L'inhibition de ces deux cathepsines permet d'ailleurs une augmentation du taux de survie cellulaire très significatif jusqu'à 24 heures post-infection, de même qu'un retard dans la production de particules infectieuses pour tous les variants VSV-Indiana utilisés dans notre étude. Il est toutefois important de mentionner que le retard de translocation de Bax engendré par l'inhibition de la cathepsine B est transitoire, ce qui concorde avec les résultats en rapport à la survie cellulaire et l'inhibition de production virale. Comme plusieurs caspases, dont la caspase-3, et les calpaïnes I et II, les cathepsines semblent avoir un rôle à jouer dans la mort neuronale par apoptose et par nécrose au niveau du SNC. Un réseau complexe pourrait d'ailleurs exister entre ces trois classes de cystéines protéases afin d'assurer un mode de fonctionnement optimal (Yamashima, 2000). De plus, des lymphocytes T primaires humains mis en présence de staurosporine entre en processus d'apoptose sans la participation des caspases. Dans ce modèle, la cathepsine D peut permettre la translocation de Bax vers la membrane externe mitochondriale, ce qui favorise le passage sélectif du facteur AIF de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol (Bidère *et al.*, 2003, E-pub). Quoiqu'il en soit, alors que l'inhibition de la cathepsine D ou de l'acidification lysosomiale inhibe la relocalisation de Bax vers la mitochondrie, l'inhibition des cathepsines B et L par le zFA-fmk n'a aucun effet sur ce processus.

Ainsi, l'inhibition transitoire de la relocalisation de la protéine Bax observée lorsque l'infection des cellules H4 par VSV se fait en inhibant les cathepsines B et L (zFA-fmk), pourrait sous-entendre qu'il existe un mécanisme amenant l'activation de

Bax par la cathepsine B ou L ou les deux. Il convient toutefois d'être prudent car le zFA-fmk pourrait participer à l'inhibition de la cathepsine D ou de d'autres protéases dans notre modèle. Cependant, l'étude citée en rapport à la capacité de la cathepsine D à activer Bax (Bidère *et al.*, 2003) a révélé que l'inhibiteur zFA-fmk n'nhibait aucunement l'activité des cathepsines B et L lors de l'apoptose de lymphocytes T humains.

D'autre part, l'implication de la perméabilisation de la membrane lysosomiale (LMP; *lysosomal membrane permeabilisation*) et le déversement subséquent du contenu de ces organites dans le cytosol vient récemment d'être mis en évidence et représente une étape précoce pouvant mener à l'induction d'apoptose liée à la mitochondrie et nécessitant la relocalisation du facteur Bax du cytosol vers la membrane externe mitochondriale (Boya *et al.*, 2003a; 2003b). Toutefois, dans ces deux études, la translocation de Bax et l'induction de la voie apoptotique mitochondriale ne sont pas liées à une activation via les cathepsines. En effet, aucun changement dans la cinétique de relocalisation de Bax n'est observé lorsque le stimulus proapoptotique est engendré sur des fibroblastes embryonnaires murins normaux ou dont l'expression des gènes des différentes cathepsines lysosomiales a été réduit au silence. Il est donc suggéré que dans ces cas, la translocation de Bax faisant suite à la LMP pourrait dépendre d'autres enzymes lysosomiales dont l'activité n'a pas encore été reliée à l'induction d'apoptose (Boya *et al.*, 2003a; 2003b). Il est à noter que les deux études excluant un rôle des cathepsines ont été réalisées à l'aide de cellules murines alors que l'étude démontrant une activation de Bax par la cathepsine D a été réalisée à l'aide de lymphocytes primaires humains. Il conviendrait de tenter de comprendre comment des cathepsines ou d'autres facteurs lysosomiaux pourrait être réellement impliqués dans la translocation de Bax vers la mitochondrie dans notre modèle. Pour ce faire, un blocage de l'acidification lysosomiale à l'aide de NH₄Cl (Gadaleta *et al.*, 2002), de monensine (Jan et Griffin, 1999) ou de bafilomycine A (Bidère *et al.*, 2003) permettrait de mesurer l'importance de facteurs issus des lysosomes, dont les cathepsines B et L, se retrouvant dans le cytosol lors de l'induction du processus apoptotique induit par VSV. D'ailleurs, le blocage d'acidification des lysosomes (NH₄Cl) réalisé lors de l'infection par VSV dans un autre

modèle cellulaire altère le processus apoptotique et aucune fragmentation d'ADN n'est observée jusqu'à 12 heures p.i. De plus, l'inhibition chimique ou génétique (à l'aide de la technologie d'ARN interférents) (Bidère *et al.*, 2003) des différentes cathepsines individuellement permettrait de démontrer l'implication de ces enzymes dans l'induction d'apoptose lors d'une infection par VSV dans notre modèle de cellules humaines.

12.5.4 Potentiel membranaire mitochondrial, PTP, translocation de Bax et survie cellulaire

Le maintien d'un potentiel membranaire mitochondrial ou gradient électrochimique ($\Delta\psi$) est un des facteurs important qui semble régir l'ouverture du PTP pour assurer un bon fonctionnement de la mitochondrie. Or, lors de certains stress proapoptotiques, il peut y avoir une chute rapide du $\Delta\psi$ et ouverture rapide et irréversible du PTP (Ly *et al.*, 2003). La Figure 6A montre qu'à 20 heures post-infection, la translocation de Bax à la mitochondrie est retardée en présence de cyclosporine A (CsA), un inhibiteur potentiel d'apoptose reliée au PTP. Ce retard de translocation est du même ordre que lors de l'infection en présence zFA-fmk dont il est question à la Figure 6 de l'article présenté au chapitre III. D'autre part, la Figure 6B démontre clairement que la survie cellulaire est augmentée jusqu'à au moins 30 heures post-infection lorsque l'infection des cellules se fait en présence de CsA.

La Figure 6 présente des résultats préliminaires reproductibles pouvant permettre de spéculer sur un des mécanismes très précoce régissant la relocalisation de Bax à la mitochondrie durant l'infection par VSV. En effet, tel que le démontre cette figure, le processus de relocalisation de Bax vers la mitochondrie est retardée lorsque l'infection des cellules H4 par VSV-TP6 est faite en présence de cyclosporine A (CsA). Cette dernière est reconnue pour sa capacité à inhiber la cyclophiline D, une des composantes majeures permettant la régulation du PTP au niveau de la membrane mitochondriale. Ce faisant, la CsA peut altérer l'ouverture du PTP et retarder l'apoptose reliée à la voie mitochondriale. Des travaux récents ont montré que la formation de ce PTP pouvait survenir avant la translocation de Bax vers la mitochondrie et que la relocalisation de ce dernier pouvait dépendre en bonne partie de la formation du PTP au niveau de la

membrane mitochondriale (De Giorgi *et al.*, 2002). Il serait donc approprié de mesurer si une chute de potentiel survient au niveau mitochondrial lors de l'infection par VSV. Comme le mécanisme de translocation de Bax vers la mitochondrie lors de l'infection par VSV n'est pas identifié, on peut penser que la régulation par le PTP, suite à une dépolarisation par exemple, en fait partie. De plus, ce retard dans la translocation de la protéine Bax vers la mitochondrie en présence de CsA est associée à une augmentation de survie (Figure 3B). Ceci renforce le fait que la translocation de Bax vers la mitochondrie est un événement important qui participe à l'induction de mort cellulaire durant l'infection par VSV. L'importance directe de Bax a récemment été démontrée durant l'induction d'apoptose lors de l'infection par un mutant adénoviral de type 2 en utilisant un modèle de cellules dont l'expression de Bax est inactivée (Bax $-/-$) et en comparant les résultats aux mêmes cellules où l'expression de Bax est normale (Lomonosova *et al.*, 2002). Cette approche serait intéressante à utiliser pour démontrer hors de tout doute l'importance de Bax lors de l'apoptose induite par VSV.

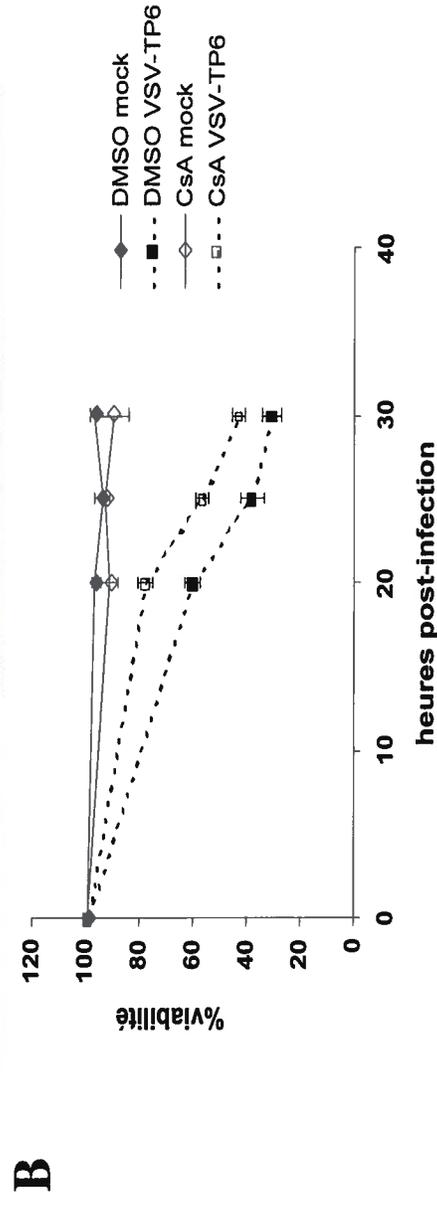
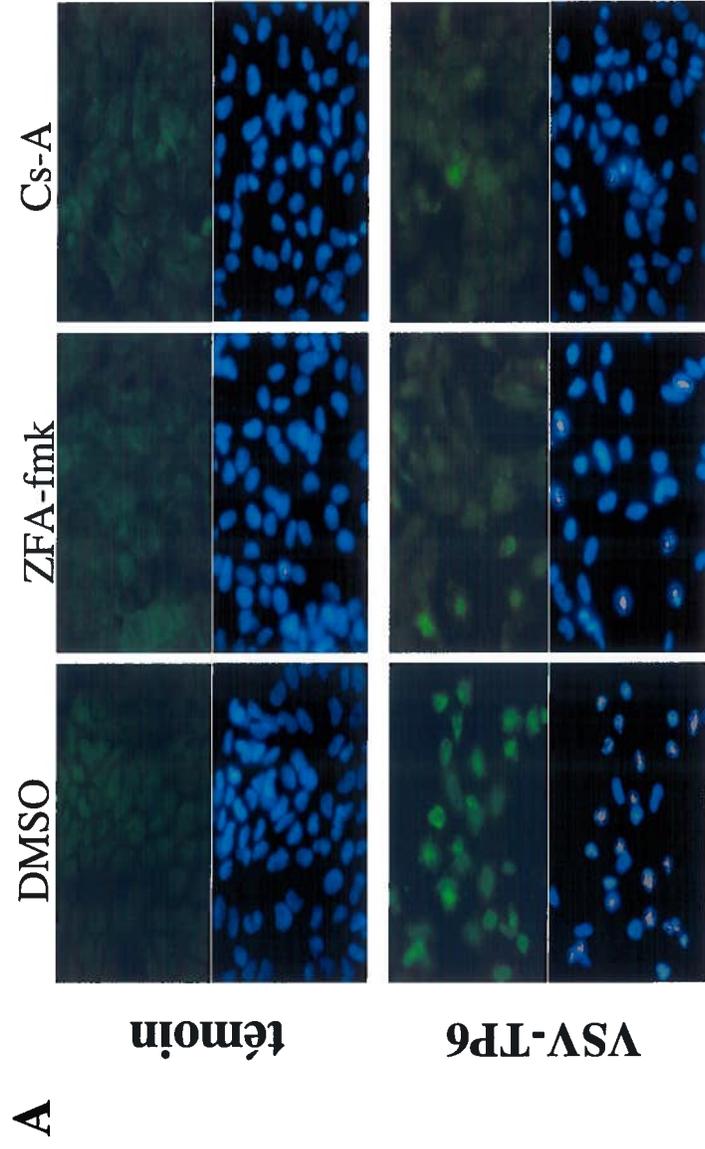


Figure 6. La relocalisation de la protéine Bax vers la mitochondrie est retardée en présence de cyclosporine A (CsA) favorisant ainsi une survie cellulaire accrue suite à l'infection par VSV-TP6. (A) Immunolocalisation de Bax par immunofluorescence à l'intérieur de cellules témoins et suite à l'infection par VSV-TP6 (18h.p.i.). (B) Evaluation de survie cellulaire suite à l'infection par VSV-TP6 en absence ou en présence de CsA.

12.6 Modèle d'induction d'apoptose par VSV

La figure 7 qui suit présente un modèle proposé pour tenter d'englober l'ensemble des résultats en rapport à l'induction d'apoptose lors de l'infection par un VSV-Indiana possédant une protéine M non mutante et qui ne peut donc établir de persistance. Le schéma de la figure 7 présente d'une part les conclusions les plus plausibles auxquelles nos résultats nous permettent d'arriver et d'autre part des déductions spéculatives faites à partir de résultats préliminaires et de l'état des connaissances en matière d'apoptose.

Figure 7. Modèle global proposé pour expliquer l'induction d'apoptose suite à l'infection par VSV. Suite à l'infection par VSV, la translocation de Bax vers la mitochondrie survient rapidement sans impliquer les caspases et est associée au relargage de cytochrome de la mitochondrie vers le cytosol et activation éventuelle de la caspase-3 et fragmentation d'ADN. L'expression ectopique de Bcl-2 retarde de façon importante la translocation de Bax vers la mitochondrie. Cette surexpression de Bcl-2 retarde aussi l'activation de caspase-3 et de caspase-8; ce qui suggère que la voie mitochondriale d'induction d'apoptose soit la voie principale et que la caspase-8 est activée via cette voie pour servir de système d'amplification du stimulus apoptotique. La caspase-8 est au moins en partie activée via la caspase-3 et inversement. L'expression ectopique de cFLIP (inhibiteur spécifique de la caspase-8) altère aussi l'activation de la caspase-8 et de la caspase-3. Selon nos résultats préliminaires présentés au chapitre IV, la translocation de Bax pourrait être à relier à l'activation des cathepsines B et L ou d'autres facteurs lysosomiaux et/ou par une chute du potentiel membranaire au niveau de la membrane interne de la mitochondrie entraînant l'ouverture du PTP. Comme la calpaïne semble activée suite à l'infection, elle pourrait cliver le facteur Bax au niveau de la mitochondrie et augmenter son pouvoir proapoptotique. Cette activation possible de calpaïne peut survenir suite à une augmentation rapide et importante du calcium au niveau du cytosol et pourrait activer la caspase-12 reliée à la voie d'induction d'apoptose impliquant le stress au niveau du réticulum endoplasmique. Cette activation possible de la caspase-12 pourrait entre autres participer à l'activation de la caspase-8. L'activation de la caspase-8 pourrait aussi être partiellement associée à voie apoptotique reliée aux récepteurs de mort.

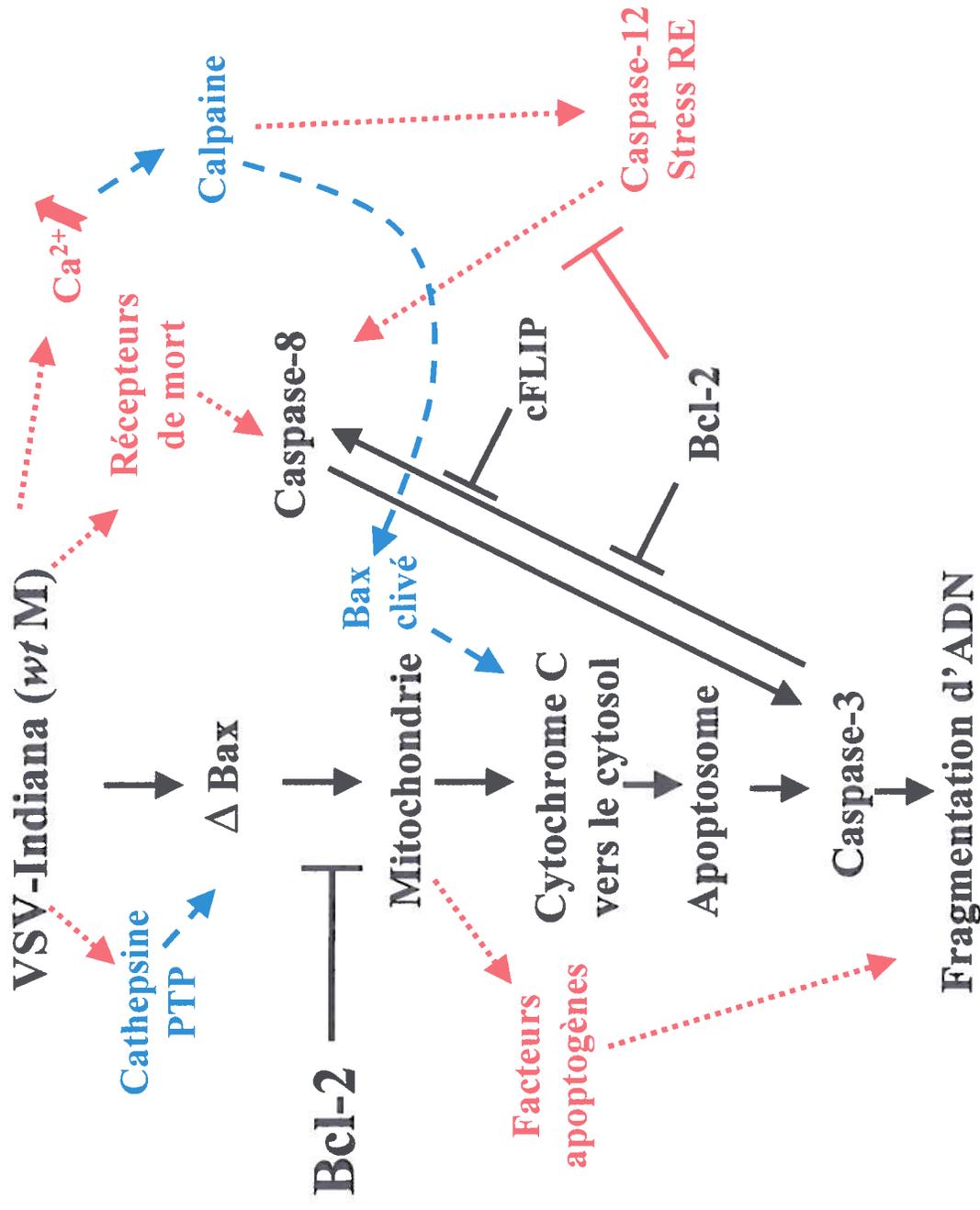


Fig. 7. Modèle proposé pour l'apoptose induite lors de l'infection par VSV-Indiana type sauvage.
 Mécanismes apoptotiques les plus plausibles selon nos résultats expérimentaux des chapitres II et III
 Mécanismes apoptotiques proposés selon les résultats préliminaires présentés au chapitre IV
 Mécanismes apoptotiques spéculatifs selon la discussion du chapitre IV

12.7 Infection persistante possible de VSV à l'intérieur de cellules issues du SNC

Indépendamment des mécanismes d'apoptose induits lors d'une infection par VSV, nos résultats suggèrent fortement qu'une induction inefficace du processus fait partie des facteurs permettant la mise en place d'une infection persistante par divers variants moins cytotoxiques. Deux points majeurs pouvant découler de toutes nos données sont à considérer pour tenter de dresser un portrait global permettant de comprendre les conséquences possibles liées à l'établissement d'une infection persistante par VSV à l'intérieur de cellules issues du SNC. Même si l'on sait maintenant qu'une induction d'apoptose peut survenir au SNC chez des souris infectées par la voie intranasale par VSV-Indiana (Bi *et al.*, 1995b) et par un variant naturel pathogène du sérotype New Jersey en entraînant des lésions importantes, voire même la mort (Sur *et al.*, 2003), on connaît le pouvoir neuroinvasif de VSV depuis longtemps (Stanners *et Goldberg*, 1975) et l'on sait que dans certaines conditions ce virus peut persister au niveau du SNC.

Cette possibilité qu'a VSV de persister au niveau de tissus sains du SNC (Barrera *et Letchworth*, 1996; Fultz *et al.*, 1982) mais surtout, comme le démontre les résultats exposés dans cette thèse, sa capacité à persister à l'intérieur de cellules immortalisées provenant d'une tumeur issue du SNC, souligne l'importance de bien comprendre comment s'établit et se maintient cette infection persistante. En effet, la possible utilisation de VSV-Indiana en tant qu'agent antitumoral confère à ce dernier point une importance réelle. En effet, la présence de virus infectieux au niveau de cellules tumorales résiduelles (Balachandran *et Barber*, 2000) peut laisser croire à la création éventuelle d'un réservoir viral qui pourrait servir à établir une infection persistante par des mutants moins cytotoxiques du VSV au niveau du SNC avec toutes les implications possibles en rapport à des problèmes potentiels d'ordre auto-immunitaire, tel que ceux décrits dans le tableau 6 du chapitre I (Talbot *et al.*, 2001).

12.7.1 Infection persistante de virus oncolytique

Les études de l'équipe de Glen Barber décrivant l'utilisation de VSV dans le traitement antitumoral chez la souris présentent des résultats fort encourageants quant à la possibilité de réduction, voire d'élimination de tumeur *in vivo*. De plus, il est intéressant de noter qu'une prise d'échantillon de tissus à 21 jours post-traitement par VSV, n'a pas permis de détecter de particules virales infectieuses dans les tissus sains environnants la tumeur. Toutefois, entre 2×10^4 et 5×10^5 particules infectieuses par gramme de tissus ont été détectées dans les tissus tumoraux résiduels (Balachandran *et al.*, 2000b; 2001). Ce dernier point amène peut-être une ombre au tableau en ce qui a trait à l'utilisation de VSV contre le cancer *in vivo*. En effet, la présence de virus infectieux au niveau des cellules tumorales résiduelles peut laisser croire à la création éventuelle d'un réservoir viral qui pourrait servir à établir une infection persistante par des mutants moins cytotoxiques du VSV. En effet, VSV est un de ces virus pour lesquels un grand nombre de mutants peuvent être générés sur un court laps de temps; le haut taux d'erreur de la polymérase virale (10^{-3}) (Wagner, 1987), étant partiellement responsable de cette situation. *In vivo*, la pression sélective intracellulaire jumelée à celle exercée par le système immunitaire, pourrait également contribuer à favoriser l'apparition de mutants moins cytotoxiques et moins facilement détectables par le système immunitaire. Il est donc essentiel, d'étudier de manière approfondie les mécanismes d'induction de mort cellulaire par apoptose ou autre lors de l'infection de lignées cellulaires par VSV pour bien comprendre quels phénomènes pourraient être associés à l'établissement d'une infection persistante. Le virus de la rougeole est également à l'étude pour utilisation potentielle antitumorale. Cependant, il est clair que dans certains cas, les cellules tumorales infectées par le virus de la rougeole ne meurent pas et deviennent une sorte de réservoir où le virus établit une infection persistante (Russell, 2002). Cette seconde hypothèse pourrait s'avérer vraie pour le VSV et souligne l'importance de bien comprendre tous les mécanismes menant à la mort cellulaire par apoptose lors d'une infection virale.

12.7.2 Infection persistante et problèmes auto-immunitaires

À l'aide de modèle animal, il a été mis en évidence que VSV pouvait persister au niveau du SNC (Barrera et Letchworth, 1996; Fultz *et al.*, 1982; Stanners et Goldberg, 1975). Bien que la production de particules infectieuses soit absente, il n'en demeure pas moins que l'on peut retrouver des ARN après plusieurs mois chez une proportion des individus. Or, cette présence virale pourrait occasionnellement engendrer la production d'antigènes viraux, une situation dont le risque est probablement faible mais qui peut tout de même potentiellement devenir néfaste si elle entraîne des réactions immunitaires impliquant aussi bien les cellules résidentes du SNC que des cellules effectrices du système immunitaire (Talbot *et al.* 2001).

Les lymphocytes T activés (Hickey, 2001; Brown 2001) ou naïfs et « au repos » (Owens et Babcock, 2002) peuvent traverser la BHE et avoir accès au SNC pour aider à éliminer une infection virale après avoir reçu un signal de co-activation pour être efficacement activées (Krakowski et Owens, 2000; Brabb *et al.*, 2000). Des problèmes d'ordre auto-immunitaires pourraient bien expliquer certains événements survenant suite à une infection par VSV. En effet, dans un système *in vitro*, utilisant une lignée de cellules produisant des protéines constituant de la myéline, le virus induit, chez des lymphocytes T, une réponse efficace contre la protéine basique de la myéline. *In vivo*, ces mêmes lymphocytes réagissent fortement contre le virus de la stomatite vésiculaire. Il est donc tentant d'établir un lien et de penser que VSV pourrait participer à l'induction d'une réaction auto-immunitaire au niveau du SNC (Rott *et al.*, 1994).

De plus, lorsqu'il y a infection virale au SNC, les astrocytes peuvent agir sur les cellules endothéliales de la barrière hématoencéphalique pour que celles-ci laissent pénétrer les cellules immunitaires activées, dont les lymphocytes T, encore plus facilement (Joseph *et al.*, 1997). Les astrocytes expriment le CMH I mais, de façon constitutive, les neurones et les oligodendrocytes n'expriment habituellement pas ou très peu cet antigène. L'expression du CMH I peut cependant être induite lors d'infection par le virus de la rougeole et le VSV (Bilzer and Stitz, 1996) et le MHV (Redwine *et al.*, 2001), permettant de faciliter l'élimination du virus infectieux mais avec la possibilité d'endommager des cellules importantes du SNC.

De plus, les astrocytes augmentent leur niveau d'expression de molécules du CMH II lorsque mis en présence de certains virus (Sun *et al.*, 1997). Comme ces molécules sont reconnues par les lymphocytes CD4+ responsables de la démyélinisation dans certaines maladies auto-immunitaires, la surexpression de CMH II des astrocytes pourrait participer à l'incidence de telles pathologies suite à l'établissement d'une infection persistante par VSV. Toutefois, les astrocytes semblent capables d'inactiver certains lymphocytes T ayant pénétré au SNC et causant une encéphalite allergique expérimentale (Xiao *et al.*, 1998).

Les exemples du MHV et du TMEV sont notoires pour illustrer le type de problèmes d'ordre auto-immunitaire pouvant survenir lors d'une infection virale persistante au SNC. L'infection persistante par le TMEV semble pouvoir induire la pathologie via les mécanismes de propagation de déterminants (*epitope spreading*) (Tompkins *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 1997) ou de mimétisme moléculaire (Olson *et al.*, 2002). Dans le premier cas, des lymphocytes T CD4+ réagissent contre des antigènes du soi qui étaient préalablement séquestrés alors que dans le mimétisme moléculaire, il y a méprise d'un épitope du soi pour un épitope viral à cause de la reconnaissance de portions très homologues par les lymphocytes. La souche virulente GDVII induit une encéphalite rapide et fatale en infectant les neurones où le processus d'apoptose serait déclenché. Certaines souches moins virulentes, comme la souche DA peuvent infecter les oligodendrocytes qui produisent la myéline enveloppant les axones neuronaux. Ces cellules finissent par être affectées par la présence du virus de la souche DA et la mort par apoptose s'en suit chez une portion des oligodendrocytes, affectant ainsi la production de myéline. (Tsunoda *et al.*, 1997) L'équipe de Rodriguez (Murray *et al.*, 1998) prétend que la maladie neurologique et démyélinisante induite par le TMEV impliquerait des cellules T CD8+. Durant l'infection persistante impliquant le TMEV au SNC, la pathologie serait induite par l'absence de réponse immunitaire protectrice liée au CMH I (donc aux CD8+) et par une réponse liée au CMH II (donc aux CD4+) qui induit directement les dommages (Murray *et al.*, 1998).

Il est tout à fait clair que le système immunitaire, particulièrement par l'entremise des lymphocytes T, est aussi impliqué dans la pathologie démyélinisante associée à la

persistance du MHV au SNC (Wu and Perlman, 1999; Wu *et al.*, 2000). D'ailleurs, les résultats d'une étude de Watanabe et collaborateurs (Watanabe *et al.*, 1983) suggèrent que des cellules T spécifiques à la myéline puissent être détectées suite à une infection par le MHV-JHM chez le rat. Des résultats récents laissent présager que ces lymphocytes T pourraient être dirigés contre la protéine basique de la myéline (PBM, mieux connue sous l'acronyme MBP) (Gruslin *et al.*, en préparation 2003).

Avant que les différents lymphocytes puissent traverser la BHE, il existe un autre système pour aider à contrer l'infection virale au SNC. L'immunité innée semble jouer un rôle important pour protéger contre l'infection du SNC par les virus et en particulier contre le VSV (Plakhov *et al.*, 1995; Komatsu *et al.*, 1996). La production d'oxydes nitriques (NO) représente une arme efficace pour altérer la réplication virale à court terme. Ils peuvent être produits de façon constitutive par les neurones et les cellules endothéliales et de façon inductible par les astrocytes et les microglies et sont produits par des enzymes, les NO synthétases (NOS) dont il existe au moins trois types. En perturbant la réplication de VSV ou d'autres virus, ils représentent un moyen efficace d'éliminer le virus sans qu'il y ait cytolysse (Bi *et al.*, 1995b; Barna *et al.*, 1996). Des études en rapport à l'infection par un alphavirus (Levine *et al.*, 1991) et par celui de la rage (Dietzschold et Koprowski, 1992) ont d'ailleurs déjà montré qu'il y aurait un mécanisme non cytotoxique et non lié au CMH permettant, dans certains cas, d'éliminer le virus des neurones infectés sans les lyser.

Suite à l'infection de neurones du SNC par VSV chez la souris, il y a augmentation d'activité de NOS de type III dans les astrocytes. Cette intensification de production de NO pourrait être reliée à l'influence de cytokines puisque l'on sait que l'expression des NOS est augmentée dans des astrocytes mis en culture en présence d'interleukine-12 (IL-12), de TNF- α ou encore d'IFN γ . Les NO produits par les astrocytes pourraient diffuser vers les autres cellules, dont les neurones, pour aider à contenir l'infection. Cette production de NO par les astrocytes pourrait également jouer un rôle sur la perturbation de la barrière hémato-encéphalique dont il a été fait mention auparavant. Bien que la production de NO par les cellules gliales apparaisse efficace pour contrer un virus, il convient de souligner que lorsque cette production devient trop

importante elle peut aussi entraîner des effets cytotoxiques au cerveau (Bilzer and Stitz, 1996). L'inhibition des iNOS produites lors de l'infection par le virus de Theiler peut d'ailleurs participer à réduire l'inflammation et à la démyélinisation habituellement causées par cette infection virale (Rose *et al.*, 1998). De plus, l'infection des microglies par le VIH induit l'apoptose des neurones avoisinants par un processus impliquant soit des protéines virales solubles et le TNF- α (New *et al.*, 1998) ou les NO provenant des astrocytes environnants (Hori *et al.*, 1999) Il est donc plausible de croire que les NO et certaines cytokines pourraient induire directement ou indirectement des effets secondaires néfastes sur le tissu cérébral sain lors d'une infection par des mutants persistants de VSV.

12.7.3 Mutations dans la protéine M et persistance de VSV

Le phénotype *ts*, nécessaire en conjugaison avec la mutation M, pour induire une persistance sur les lignées fibroblastiques produisant ou non de l'interféron (Desforges *et al.*, 2001), n'est pas nécessaire pour qu'une infection persistante survienne sur des cultures primaires d'astrocytes (Desforges, 1999) de même que sur la lignée de cellules neuronales H4 (Desforges *et al.*, 2002). La mutation dans M devient donc la seule caractéristique permettant de différencier les virus capables d'établir une persistance de ceux qui ne le sont pas. Or, lorsqu'une protéine virale est mutée, sa capacité à interagir avec des facteurs cellulaires peut très certainement l'être. Les mutations dans la protéine M peuvent donc faire en sorte que celle-ci ne puisse plus interagir de la même façon avec certaines protéines cellulaires occasionnant un changement radical dans l'interaction virus-cellule.

Le *canine distemper virus* (CDV) ainsi que le virus de la rougeole représentent deux exemples de virus dont la persistance au SNC est associée d'une façon ou d'une autre à des modifications dans la protéine M. Dans le cas du CDV, une étude comparative utilisant cinq souches différentes a révélée que toutes les souches pouvant persister possédaient des mutations dans le gène N et dans la région 5' non codante du gène M ainsi qu'un cadre de lecture ouvert (*open reading frame*) de 52 acides aminés à l'intérieur du gène M (Stettler *et al.*, 1997) Tel que présenté dans le chapitre I (section

5.4, p. 25) le virus de la rougeole peut, dans de rares cas, établir une persistance au SNC et induire une panencéphalite subaiguë sclérosante (PESS). Une étude analysant plusieurs souches associées à des cas de PESS a mis en évidence que le gène M portait invariablement plusieurs mutations (Ayata *et al.*, 1998). Plusieurs études ont également mis en cause différents problèmes associés à une mauvaise production de protéine M (Cattaneo *et al.*, 1986; Sheppard *et al.*, 1985; Carter *et al.*, 1983) chez les virus de la rougeole persistants associé à une production de particules infectieuses très atténuée. Puisque le virus de la rougeole peut se propager efficacement de cellule à cellule par un processus efficace de fusion entre les neurones sans nécessiter la formation de virions infectieux, il semble que l'accumulation de mutations dans le gène M participe au maintien de l'infection persistante en altérant de façon très importante la production de particules infectieuses, rendant très difficile la détection d'antigènes viraux par le système immunitaire.

La protéine M de VSV a des effets pléiotropes et semble importante pour affecter des fonctions cellulaires essentielles. En plus de son rôle en tant que protéine structurale dans le virion, la protéine M de VSV possède de nombreuses fonctions lors de l'infection de cellules par le virus. Son implication a déjà été démontrée dans l'inhibition de la transcription (Ahmed et Lyles, 1998; Ferran et Lucas-Lenard, 1997; Black et Lyles, 1992), l'inhibition de synthèse protéique (Connor et Lyles, 2002; Francoeur *et al.*, 1987), l'effet cytopathique par arrondissement cellulaire (Lyles et McKenzie, 1997), le blocage du transport de macromolécules entre le noyau et le cytoplasme (von Kobbe *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 2000; Her *et al.*, 1997) en étant dirigée vers le noyau (Glodowski *et al.*, 2002) et récemment dans l'induction d'apoptose (Kopecky et Lyles, 2003a; Desforges *et al.*, 2002; Kopecky *et al.*, 2001). Or, nos propres travaux et ceux de l'équipe de Doug Lyles ont déjà démontré qu'une ou des mutations au niveau de M engendrait une perte partielle du potentiel d'induction d'apoptose (Desforges *et al.*, 2002; Kopecky *et al.*, 2001) et de la capacité à inhiber la transcription (Lyles *et al.*, 1996). De plus, la capacité de la protéine M de VSV à inhiber le transport bidirectionnel requiert la présence d'une méthionine à la position 51 (Petersen *et al.*, 2001; 2000). Le mutant T1026R1 possède une mutation sur la protéine M à la position 51 où une méthionine est remplacée par une

arginine. Ce virus compte parmi ceux qui peuvent induire une infection persistante dans les cultures primaires d'astrocytes (Desforges, 1999) et à l'intérieur de cellules H4 (Desforges *et al.*, 2002). En plus de sa capacité altérée à engendrer l'apoptose et l'inhibition de transcription, le mutant T1026R1 (utilisé par Petersen et collaborateurs (2001) semble ne pas pouvoir inhiber la voie de transport entre le noyau et le cytoplasme. La perte de cette fonction peut assurément faire en sorte que les cellules infectées vont pouvoir réagir et mettre en place des systèmes de protection pour survivre et le virus pourra établir une persistance.

Il a aussi été observé (Greenstein *et al.*, 1981) que T1026R1 engendre une infection à plus long terme et une paralysie chez des souris BALB/c alors que la souche sauvage Indiana cause une encéphalite aiguë puis est éliminée ou cause la mort en 2 à 3 jours. T1026R1 semble entre autre affecté dans sa réplication et cette restriction pourrait provenir d'un empêchement temporaire d'une interaction obligatoire de la transcriptase virale avec un ou des facteurs cellulaires. La mutation sur M altérant la fonction d'inhibition de synthèse protéique, essentielle à VSV pour établir son effet cytopathique, pourrait aussi avoir un impact alors que l'effet de T1026-R1 varie selon le type de cellules infectées. Dans ce cas aussi, des facteurs cellulaires pourraient être impliqués (Greenstein *et al.*, 1981). De plus, il a été démontré que des protéines M incomplètes, M2 (débutant à la méthionine 33 de la protéine M complète) et M3 (débutant à la méthionine 51), sont générées durant l'infection par VSV. Ces protéines jouent un rôle important dans l'effet cytopathique induit par le VSV. Or, chez des mutants où ces méthionines sont mutées artificiellement, la production des protéines M2 et/ou M3 est réduite, voire absente et l'effet cytopathique par arrondissement cellulaire est réduit de façon importante (Jayakar et Whitt, 2002). Sachant que cet arrondissement est génétiquement associé à l'induction d'apoptose (Kopecky et Lyles, 2003b), on peut supposer que le mutant T1026R1, portant la mutation M₅₁R, ne produit pas de protéine M3 (débutant à la méthionine 51 de la protéine M complète), ce qui explique au moins en partie la baisse dans le niveau d'induction d'apoptose par rapport aux variants Indiana portant une protéine M non mutée.

Le virus TP3 représente une autre catégorie de mutants, portant des mutations en région C-terminale de la protéine M. Les mutations valine pour phénylalanine à l'acide aminé 221 et sérine pour arginine à la position 226, se retrouvent sur la protéine M. La protéine M est multifonctionnelle. Que la mutation soit présente dans la portion amino-terminale ou carboxy-terminale, l'altération possible de sa structure chez nos différents mutants peut causer des modifications dans des interactions avec des facteurs cellulaires à différents niveaux et rendre le virus moins virulent et moins efficace à induire l'apoptose.

En plus d'illustrer les différences entre différents variants de la souche VSV-Indiana quant à leur capacité à induire l'apoptose et de ce fait d'établir ou non une infection persistante, les chapitres II et III décrivent aussi la capacité de la souche de type sauvage New Jersey à faire de même. La souche New Jersey est reconnue pour être moins virulente que Indiana (Fultz et Holland, 1985) et ne possède qu'une identité variant de 32% à 68% selon la protéine étudiée (Feldhaus et Lesnaw, 1998; Gill and Banerjee, 1986). Ces différentes données sont peut-être à relier à la capacité du virus New Jersey à pouvoir établir une persistance alors que la souche Indiana en est incapable. Quelles que soient les raisons sous-jacentes, il est en tous cas évident que la capacité d'induction d'apoptose du sérotype New Jersey est beaucoup moins importante que celle de Indiana et comme le suggèrent les articles des chapitres II et III, cette capacité réduite fait partie des facteurs associés à l'établissement d'une infection persistante dans un modèle utilisant des cellules humaines issues du SNC.

CONCLUSION

Le VSV représente un outil intéressant pour étudier l'infection persistante. En étudiant ce type d'infection, établie par des mutants de la protéine M de la souche Indiana du VSV et par la souche moins virulente New Jersey, on a voulu identifier des facteurs viraux et cellulaires déterminants pour sa mise en place. La protéine M peut normalement interagir avec de nombreux facteurs cellulaires et participer activement à l'infection aiguë et rapide par le VSV. Elle est un facteur important lié à la virulence et à la capacité du virus à induire ou non une infection persistante sur différents types cellulaires, dont certaines cellules du SNC. Ayant établi que le degré d'apoptose induit chez les cellules infectées pouvait être associé en partie à la protéine M, il conviendra donc dans l'avenir d'étudier où et comment cette importante protéine virale joue ses rôles et d'identifier des protéines cellulaires avec lesquelles elle peut interagir ou dont elle pourrait moduler l'activation, la synthèse ou l'expression lors de l'induction d'apoptose. Il apparaît que la voie apoptotique intrinsèque régulée au niveau de la mitochondrie est centrale et nécessite, comme lors de nombreux différents stimuli, l'implication du facteur proapoptotique Bax.

Des cellules humaines issues du SNC résistent suffisamment à l'induction d'apoptose suite à l'infection par certains mutants de la protéine M et la souche New Jersey pour qu'il y ait établissement d'une infection persistante (Desforges *et al.*, 2002). Ces résultats sont basés sur l'analyse d'une seule lignée cellulaire et il conviendrait d'en étudier d'autres pour tenter de dresser un portrait plus général. On sait déjà que VSV ne réussit pas à établir une infection persistante sur tous les types cellulaires qu'il peut infecter. Toutefois, le fait que certaines cellules puissent soutenir ce type d'infection souligne qu'il vaut la peine de s'y arrêter. Le fait que VSV-Indiana soit capable d'infecter l'humain (Hanson *et al.*, 1950; Reif *et al.*, 1987; Quiroz *et al.*, 1988; Tesh *et al.*, 1987) et dans au moins un cas d'être relié à l'apparition d'une encéphalite chez un jeune garçon (Quiroz *et al.*, 1988) apporte une note intéressante (bien que triste pour ce jeune garçon). Il est certainement trop tôt pour conclure que VSV engendre de fait des problèmes d'ordre neurologique au SNC chez l'humain. Cependant, comme l'a énoncé l'équipe de

Quiroz, la chose pourrait exister et nos résultats préliminaires sur les cellules neurales humaines laisse tout au moins entrevoir que ce virus pourrait persister au niveau du SNC.

La suggestion d'éventuellement utiliser VSV pour traiter certains cancers et l'intérêt fondamental de comprendre la mise en place et le maintien d'une infection persistante par un virus normalement très cytopathique à l'intérieur de cellules issues du SNC représentent deux raisons majeures justifiant l'entreprise décrite dans cette thèse.

Le portrait n'est certes pas simple et pourrait compter plusieurs voies indépendantes ou qui s'entrecroisent et fonctionnent ensemble pour mener à la mise en place d'une persistance virale par un virus neurotrope et normalement cytopathique tel le VSV. Tenter de relier toutes ces voies métaboliques s'avère une tâche des plus complexes à laquelle nous pensons avoir participé de façon modeste mais tout de même pertinente et significative.

RÉFÉRENCES

ABENDROTH, A., I. Lin, B. Slobedman, H. Ploegh, et A.M. Arvin. 2001. Varicella-zoster virus retains major histocompatibility complex class I proteins in the Golgi compartment of infected cells. J. Virol. vol.75, p. 4878-4888.

AHMED, M., M.O. McKenzie, S. Puckett, M. Hojnacki, L. Poliquin, et D.S. Lyles. 2003. Ability of the matrix protein of vesicular stomatitis virus to suppress beta interferon gene expression is genetically correlated with the inhibition of host RNA and protein synthesis. J.Virol. vol.77, p. 4646-4657.

AHMED, M. et D.S. Lyles. 1998. Effect of vesicular stomatitis virus matrix protein on transcription directed by host RNA polymerases I,II, and III. J.Virol., vol.72, p. 8413-8419.

AHMED, M. et D.S. Lyles. 1997. Identification of a consensus mutation in M protein of vesicular stomatitis virus from persistently infected cells that affects inhibition of host-directed gene expression. Virology vol.237, p. 378-388.

AHMED, R. et J.G. Stevens. 1991. Viral persistence. In Fundamental Virology. Second edition. *Editors:* B.N. Fields, D.M. Knipe *et al.* Raven Press Ltd, New York. Chap. 11 pp.241-265.

AHMED, R., L.A. Morrison, et D.M. Knipe. 1997. Viral persistence. In Viral pathogenesis. *Editors:* N. Nathanson *et al.*, Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia. Chap. 9, pp. 181-205.

ALAVI, J.B. and S.L. Eck. 2001. Gene therapy for high grade gliomas. Exp. Opin. Biol. Ther. vol.1, p. 239-252.

ALCAMI, A., J.A. Symons, et G.L. Smith. 2000. The vaccinia virus soluble alpha/beta interferon (IFN) receptor binds to the cell surface and protects cells from the antiviral effects of IFN. J. Virol. vol.74, p. 11230-11239.

ALCAMI, A., J.A. Symons, p.d. Collins, T.J. Williams, et G.L. Smith. 1998a. Blockade of chemokine activity by a soluble chemokine binding protein from vaccinia virus. J. Immunol. vol.160, p. 624-633.

ALCAMI, A., J.A. Symons, A. Khanna, et G.L. Smith. 1998b. Poxviruses: capturing cytokines and chemokines. Semin. Virol. vol.8, p. 419-427.

ALCAMI, A. et G.L. Smith. 1995. Vaccinia, cowpox and camelpox viruses encode soluble interferon- γ receptors with novel broad species specificity. J. Virol. vol.69, p. 4633-4639.

ALEMANY, R., C. Gomez-Manzano, C. Balague, W.K. Yung, D.T. Curiel, A.P. Kyritsis, et J. Fueyo. 1999. Gene therapy for gliomas: molecular targets, adenoviral vectors, and oncolytic adenoviruses. Exp. Cell Res. vol.252, p. 1-12.

- ALOISI, F., F. Ria, G. Penna, et L. Adorini. 1998. Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 cell activation. J. Immunol. vol.160, p. 4671-4680.
- ALGECIRAS-SCHIMNICH, A., B.C. Barnhart, et M.E. Peter. 2002a. Apoptosis-independent functions of killer caspases. Curr. Opin. Cell Biol. vol.14, p. 721-726.
- ALGECIRAS-SCHIMNICH, A., L. Shen, B.C. Barnhart, A.E. Murmann, J.K. Burkhardt et M.E. Peter. 2002b. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. Mol. Cell Biol. vol.22, p. 207-220.
- ALLSOPP, T.E., M.F. Scallan, A. Williams, et J.K. Fazakerley. 1998. Virus infection induces neuronal apoptosis: A comparison with trophic factor withdrawal. Cell Death Diff. vol.5, p. 50-59.
- ARBOUR, N., R. Day, J. Newcombe, et P.J. Talbot. 2000. Neuroinvasion by human respiratory coronavirus. J. Virol. vol.74, p. 8913-8921.
- ARBOUR, N., G. Côté, C. Lachance, M. Tardieu, N.R. Cashman, et P.J. Talbot. 1999a. Acute and persistent infection of human neural cell lines by Human Coronavirus OC43. J. Virol. vol.73, p. 3338-3350.
- ARBOUR, N., S. Ékandé, G. Côté, C. Lachance, F. Chagnon, M Tardieu, N.R. Cashman, et P.J. Talbot. 1999b. Persistent infection of human oligodendrocytic and neuroglial cell lines by Human Coronavirus 229E. J. Virol. vol.73, p. 3326-3337.
- ASADA, T. 1974. Treatment of human cancer with mumps virus. Cancer vol.34, p. 1907-1928.
- ANDERSON, J.R. 2001. The mechanisms of direct, virus-induced destruction of neurons. Curr. Top. Microbiol. Immunol. vol.253, p. 16-33.
- ASHCROFT, M. et K.H. Vousden. 1999. Regulation of p53 stability. Oncogene vol.18, p. 7637-7643.
- AYATA, M., T. Kimoto, K. Hayashi, T. Seto, R. Murata, et H. Ogura. 1998. Nucleotide sequences of the matrix protein gene of subacute sclerosing panencephalitis viruses compared with local contemporary isolates from patients with acute measles Virus Res. vol.54, p. 107-115.
- AYYAVOO, V., A. Mahboubi, S. Mahalingam, R. Ramalingam, S. Kudchodkar, W.V. Williams, D.R. Green, et D.B. Weiner. 1997. HIV-1 Vpr suppresses immune activation and apoptosis through regulation of nuclear factor kappa B. Nat. Med. vol.3, p. 1117-1123.

BALACHANDRAN, S., M. Porosnicu, et G.N. Barber. 2001. Oncolytic activity of vesicular stomatitis virus is effective against tumors exhibiting aberrant p53, Ras, or Myc function and involves the induction of apoptosis. J. Virol. vol.75, p. 3474-3479.

BALACHANDRAN, S. et G.N. Barber. 2000. Vesicular stomatitis virus (VSV) therapy of tumors. IUBMB Life vol.50, p. 135-138.

BALACHANDRAN, S., P. Christopher-Roberts, T. Kipperman, K.N. Bhalla, R.W. Compans, D. R. Archer, et G.N. Barber. 2000a. Alpha/Beta interferons potentiate virus-induced apoptosis through activation of hte FADD/caspase-8 death signalling pathway. J. Virol. vol.74, p. 1513-1523.

BALACHANDRAN, S., P.C. Roberts, L.E. Brown, H. Truong, A.K. Pattnaik, D.R. Archer, et G.N. Barber. 2000b. Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. Immunity vol.13, p. 129-141.

BANERJEE, A.K. 1997. Role of host proteins in gene expression of nonsegmented negative strand RNA viruses. Adv. Virus Res. vol.48, p. 169-204.

BARBER, G.N. 2001. Host defense, viruses and apoptosis. Cell death Diff. vol.8, p. 113-126.

BARGE, A., J. Gagnon, A. Chaffotte, P. Timmins, J. Langowski, R.W. Ruigrok, et Y. Gaudin. 1996. Rod-like shape of vesicular stomatitis virus matrix protein. Virology vol.219, p. 465-470.

BARKER, D.D. et A.J. Berk. 1987. Adenovirus proteins from both E1B reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection. Virology vol. 156, p. 107-121.

BARKETT, M. et T.D. Gilmore. 1999. Control of apoptosis by Rel / NF-kB transcription factors. Oncogene vol.18, p. 6910-6924.

BARNA, M., T. Komatsu et C.S. Reiss. 1996. Activation of type III nitric oxide synthase in astrocytes following a neurotropic viral infection. Virology vol.223, p. 331-343.

BARR, J.N., S.P.J. Whelan, et G.W. Wertz. 1997. Role of the intergenic dinucleotide in vesicular stomatitis virus RNA transcription. J. Virol. vol.71, p. 1794-1801.

BARRERA, J.D.C. et G. Letchworth. 1996. Persistence of vesicular stomatitis virus New Jersey RNA in convalescent hamster. Virology vol.219, p. 453-464.

BARRY, M et R.C Bleackley. 2002. Cytotoxic T lymphocytes: All roads lead to death. Nat. Rev. Immunol. vol.2, p. 401-409.

BEAUSOLEIL, S. 1994. Proteine M de mutants P^r du virus de la stomatite vésiculaire. Modifications génétiques et effets sur la synthèse protéique. Mémoire de maîtrise. Département des Sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal. 71 p.

BELAUD-ROTUREAU, M.A., N. Leducq, F. Macouillard Poulletier de Gannes, P. Diolez, L. Lacoste, F. Lacombe, P. Bernard, et F. Belloc. 2000. Early transitory rise in intracellular pH leads to Bax conformation change during ceramide-induced apoptosis. Apoptosis vol.5, p. 551-560.

BELL, J.C., K.A. Garson, B.D. Lichty, et D.F. Stojdl. 2002. Oncolytic viruses: Programmable tumour hunters. Curr. Gene Ther. vol. 2, p. 243-254.

BENEDICT, C.A., P.S. Norris, et C.F. Ware. 2002. To kill or to be killed: viral evasion of apoptosis. Nat. Immunol. vol.3, p. 1013-1018.

BENNETTE, J.G., P.V. Bush, et R.D. Steele. 1967. Characteristics of a newborn runt disease induced by neonatal infection with an oncolytic strain of reovirus type 3 (REO3MH). I. Pathological investigations in rats and mice. Br. J. Exp. Pathol. vol.48, p. 51-266.

BERGMANN, M., I. Romirer, M. Sachet, R. Fleischhacker, A. Garcia-Sastre, P. Palese, K. Wolff, H. Pehamberger, R. Jakesz, et T. Muster. 2001. A genetically engineered influenza A virus with ras-dependent oncolytic properties. Cancer Res. vol.61, p. 8188-8193.

BERGMANN, M., A. Garcia-Sastre, E. Carnero, H. Pehamberger, K. Wolff, P. Palese, et T. Muster. 2000. Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-mediated inhibition of replication. J. Virol. vol.74, p. 6203-6206.

BERTIN, J., S.M. Mendrysa, D.J. LaCount, S. Gaur, J.F. Krebs, R.C. Armstrong, K.J. Tomaselli, et P.D. Friesen. 1996. Apoptotic suppression by baculovirus P35 involves cleavage by and inhibition of a virus-induced CED-3/ICE-like protease. J. Virol. vol.70, p. 6251-6259.

BEVERS, E.M., P. Comfurius, D.W. Dekkers, et R.F. Zwall. 1999. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. Biochim.Biophys.Acta vol.1439, p. 317-330.

BEVERS, E.M., P. Comfurius, D.W. Dekkers, M. Harmsma, et R.F. Zwall. 1998. Transmembrane phospholipid distribution in blood cells: control mechanisms and pathophysiological significance. Biol.Chem. vol.379, p. 973-986.

BI, X., Y. Rong, J. Chen, S. Dang, Z. Wang, et M. Baudry. 1998. Calpain-mediated regulation of NMDA receptor structure and function. Brain Res. vol.790, p. 245-253.

BI, Z., M. Barna, T. Komatsu et C.S. Reiss. 1995a. Vesicular stomatitis virus infection of the central nervous system activates both innate and acquired immunity. J.Virol. vol.69, p. 6466-6472.

- BI, Z., P. Quandt, T. Komatsu, M. Barna, et C.S. Reiss. 1995b. IL-12 promotes enhanced recovery from vesicular stomatitis virus infection of the central nervous system. J.Immunol. vol.155, p. 5684-5689.
- BIAN, X., L.M. McAllister-Lucas, F. Shao, K.R. Schumacher, Z. Feng, A.G. Porter, V.P. Castle, et A.W. Opipari Jr. 2001. NF-kB activation mediates doxorubicin-induced cell death in N-type neuroblastoma cells. J.Biol.Chem. vol. 276, p. 48921-48929.
- BIDÈRE, N, H.K. Lorenzo, S. Carmona, M. Laforge, F. Harper, C. Dumont, et A. Senik. 2003. Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. J.Biol.Chem. vol.278, p. 31401-31411.
- BILZER, T., et L. Stitz. 1996. Immunopathogenesis of virus diseases affecting the central nervous system. Critical Rev.Immunol. vol.16, p. 145-222.
- BIRON, C.A. et G.C. Sen. 2001. Interferon and other cytokines. In Fundamental Virology Fourth edition. *Editors:* D.M. Knipe, P.M Howley *et al.* Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. Chap. 12 pp.321-351.
- BIRON, C.A. 1998. Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN- α/β), in innate and adaptive immune responses to viral infections. Semin. Immunol. vol. 10, p. 383-390.
- BIEDERER, C., S. Ries, C.H. Brandts, et F. McCormick. 2002. Replication-selective viruses for cancer therapy. J.Mol.Med. vol.80, p. 163-175.
- BISCHOFF, J.R., D.H. Kirn, A. Williams, C. Heise, S. Horn, M. Muna, L. Ng, J.A. Nye, A. Sampson-Johannes, A. Fattaey, et F. McCormick. 1996. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. Science vol.274, p. 373-376.
- BLACK, B.L., G. Brewer, et D.S. Lyles. 1994. Effect of vesicular stomatitis virus matrix protein on host-directed translation *in vivo*. J.Virol. vol.68, p. 555-560.
- BLACK, B.L., R.B. Rhodes, M. McKenzie, et D.S. Lyles. 1993. The role of vesicular stomatitis virus matrix protein in inhibition of host-directed gene expression is genetically separable from its function in virus assembly. J.Virol. vol.67, p. 4814-4821.
- BLACK, B.L., et D.S. Lyles. 1992. Vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits host cell-directed transcription of target genes *in vivo*. J.Virol. vol.66, p. 4058-4064.
- BLAIR, G.E. et K.T. Hall. 1998. Human adenoviruses: Evading detection by cytotoxic T lymphocytes. Semin. Virol. vol.8, p. 387-397.
- BLOMGREN, K., C. Zhu, X. Wang, J.-O. Karlsson, A.-L. Leverin, B.A. Bahr, C. Mallard, et H. Hagberg. 2001. Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia. J.Biol.Chem. vol.276, p.10191-10198.

- BLONDEL, D., G.G. Harmison, et M. Schubert. 1990. Role of matrix protein in cytopathogenesis of vesicular stomatitis virus. J.Virol. vol.64, p. 1716-1725.
- BLOOM, B, et R. Ahmed. 1998. Immunity to infection. Curr.Opin.Immunol. vol.10, p. 419-421.
- BLUMING, A.Z. et J.L. Ziegler. 1971. Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection. The Lancet vol.2,p. 105-106.
- BODAGHI, B., T.R. Jones, D. Zipeto, C. Vita, L. Sun, L. Laurent, F. Arenzana-Seisdedos, J.L. Virelizier, et S. Michelson. 1998. Chemokine sequestration by viral chemoreceptors as a novel viral escape strategy: withdrawal of chemokines from the environment of cytomegalovirus-infected cells. J.Exp.Med. vol.188, p. 855-866.
- BONAVIA, A., N. Arbour, V.W. Yong et P.J. Talbot. 1997. Infection of primary culture of neural cells by human coronavirus 229-E and OC-43. J.Virol. vol.71, p. 800-806.
- BORGATTI, P., G. Zauli, M.L. Colamussi, D. Gibellini, M. Previati, L.L. Cantley, et S. Capitani. 1997. Extracellular HIV-1 Tat protein activates phosphatidylinositol 3- and Akt/PKB kinases in CD4+ T lymphoblastoid Jurkat cells. Eur.J.Immunol. vol.27, p. 2805-2811.
- BORZAKIAN, S. 1993. Synthèse, La persistance virale : un agent étiologique possible pour les maladies auto-immunes. Médecine/Sciences vol.9, p. 907-916.
- BOYA, P., K. Andreau, D. Poncet, N. Zamzani, J.-L. Perfettini, D. Metivier, D.M. Ojcius, M. Jäättela, et G. Kroemer. 2003a. Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion. J.Exp.Med. vol.197, p. 1323-1334.
- BOYA, P., R.-A. Gonzalez-Polo, D. Poncet, K. Andreau, H. LA Viera, T. Roumier, J.-L. Perfettini, et G. Kroemer. 2003b. Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine. Oncogene vol.22, p. 3927-3936.
- BRABB, T., P. von Dassow, N. Ordonez, B. Schnabel, B. Duke, et J. Goverman. 2000. In situ tolerance within the central nervous system as a mechanism for preventing autoimmunity. J. Exp. Med. vol.192, p. 871-880.
- BRAHIC, M. 2002. Theiler's virus infection of the mouse, or: Of the importance of studying animal models. Virology vol.301, p. 1-5.
- BRENNER, C. et G. Kroemer. 2000. Mitochondria—the death signal integrators. Science vol.289, p. 1150-1151.
- BROWN, K.A. 2001. Factors modifying the migration of lymphocytes across the blood-brain barrier. Internatl.Immunopharma. vol.1, p. 2043-2062.

BRUNK, U.T., J. Neuzil, et J.W. Eaton. 2001. Lysosomal involvement in apoptosis. Redox Report vol.6, p. 91-97.

CAI, R., B. Carpick, R.F. Chun, K.-T. Jeang, et B.R.G. Williams. 2000. HIV-1 Tat inhibits PKR activity by both RNA-dependent and RNA-independent mechanisms. Arch.Biochem.Biophys. vol.373, p. 361-367.

CANDÉ, C., I. Cohen, E. Daugas, L. Ravagnan, N. Larochette, N. Zamzani, et G. Kroemer. 2002. Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. Biochimie vol.84, p. 215-222.

CAPANO, M. and M. Crompton. 2002. Biphasic translocation of Bax to mitochondria. Biochem.J. vol.367, p. 169-178.

CARROL, A.R. et R.R. Wagner. 1979. Role of the membrane (M) protein in endogenous inhibition of in vitro transcription by vesicular stomatitis virus. J.Virol. vol.29, p. 134-142.

CARTER, M.J., M.M. Wilcocks et V. ter Meulen. 1983. Defective translation of measles virus matrix protein in a subacute sclerosing panencephalitis cell line. Nature vol.305, p. 153-155.

CATTANEO, R., A. Schmid, G. Rebmann, G. Bazko, V. ter Meulen, W.J. Bellini, S. Rozenblatt, et M.A. Billeter. 1986. Accumulated measles virus mutations in a case of subacute sclerosing panencephalitis cell line. Virology vol.154, p. 97-107.

CAVE, D.R., F.M. Hendrickson and A.S. Huang. 1985. Defective interfering virus particles modulate virulence. J. Virol. vol.55, p. 366-373.

CHA, Y.J., H.S. Kim, H. Rim, B.E. Kim, S.W. Jeong, et I.K. Kim. 2001. Activation of caspase-8 in 3-deazaadenosine-induced apoptosis of U-937 cells occurs downstream of caspase-3 and caspase-9 without Fas receptor-ligand interaction. Exp.Mol.Med. vol.33, p. 284-292.

CHAUDHARY, P.M., M.T. Eby, A. Jasmin, A. Kumar, L. Liu, et L. Hood. 2000. Activation of the NF-kappaB pathway by caspase-8 and its homologs. Oncogene vol.19, p. 4451-4460.

CHANG, T.L.-Y., C.S. Reiss et A.S. Huang. 1994. Inhibition of vesicular stomatitis virus RNA synthesis by protein hyperphosphorylation. J.Virol. vol.68, p. 4980-4987.

CHANG, H.W., J.C. Watson, et B.L. Jacobs. 1992. The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. Proc.Natl.Acad.Sci.USA vol.89, p. 4825-4829.

CHARRON, J. 1996. Établissement d'infections persistantes induites par des mutants du virus de la stomatite vésiculaire. Mémoire de Maîtrise de l'Université du Québec à Montréal. 106 p.

CHEN, C.J. et S. Makino. 2002. Murine coronavirus-induced apoptosis in 17Cl-1 cells involves a mitochondria-mediated pathway and its downstream caspase-8 activation and bid cleavage. Virology vol.302, p. 321-332.

CHEN, M., H. He, S. Zhan, S. Krajewski, J.C. Reed, et R. Gottlieb. 2001. Bid is cleaved by calpain to an active fragment *in vitro* and during myocardial ischemia/reperfusion. J.Biol.Chem. vol.276, p. 30724-30728.

CHEN, Y., T. Douglas, E.W. Jeffes, Q. Xu, C.C. Williams, N. Arpajirakul, C. Delgado, M. Kleinman, R. Sanchez, Q. Dan, R.C. Kim, H.T. Wepsic, et M.R. Jadus. 2002. Living T9 glioma cells expressing membrane macrophage colony-stimulating factor produce immediate tumor destruction by polymorphonuclear leukocytes and macrophages via a "paraptosis"-induced pathway that promotes systemic immunity against intracranial T9 gliomas. Blood vol.100, p. 1373-1380.

CHENG, E.H., J. Nicholas, D.S. Bellows, G.S. Hayward, H.G. Guo, M.S. Reitz, et J.M. Hardwick. 1997. A Bcl-2 homolog encoded by Kaposi sarcoma-associated virus, human herpesvirus 8, inhibits apoptosis but does not heterodimerize with Bax or Bak. Proc.Natl.Acad.Sci.USA vol.94, p. 690-694.

CHIOCCA, E.A. 2002. Oncolytic viruses. Nature Rev.Cancer. vol. 2, p. 938-950.

CHIRILLO, P., S. Pagano, G. Natoli, P.L. Puri, V.L. Burgio, C. Balsano, et M. Levreno. 1997. The hepatitis B virus X gene induces p53-mediated programmed cell death. Proc.Natl.Acad.Sci.USA vol.94, p. 8162-8167.

CHOI, W.-S., E.-H. Lee, C.-W. Chung, Y.-K. Jung, B.K. Jin, S.U. Kim, T.H. Oh, T.C. Saido, et Y.J. Oh. 2001. Cleavage of Bax is mediated by caspase-dependent or -independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl-2. J.Neurochem. vol.77, p. 1531-1541.

CHOI, Y.H., S.J. Lee, P.M. Nguyen, J.S. Jang, J. Lee, M.-L. Wu, E. Takano, M. Maki, P.A. Henkart, et J.B. Trepel. 1997. Regulation of cyclin D1 by calpain protease. J.Biol.Chem. vol.272, p. 28479-28484.

CHONG, L.D. et J.K. Rose. 1994. Membrane association of functional vesicular stomatitis virus matrix protein in vivo. J.Virol. vol.67, p. 407-414.

CHONG, L.D. et J.K. Rose. 1993. Interactions of normal and mutant vesicular stomatitis virus matrix proteins with the plasma membrane and nucleocapsids. J.Virol. vol.68, p. 441-447.

- CHOU, J. et B. Roizman. 1992. The gamma 1 (34.5) gene of herpes simplex virus 1 precludes neuroblastoma cells from triggering total shutoff of protein synthesis characteristic of programmed cell death in neuronal cells. Proc.Natl.Acad.Sci.USA vol.89, p. 3266-3270.
- CHUANG, J.L. et J. Perrault. 1997. Initiation of vesicular stomatitis virus mutant polR1 transcription internally at the N gene in vitro. J.Virol. vol.71, p. 1466-1475.
- CIUREA, A., L. Hunziker, R.M. Zinkernagel, et H. Hengartner. 2001. Viral escape from the neutralizing antibody response: the lymphocytic choriomeningitis virus model. Immunogenetics vol.53, p. 185-189.
- CLARKE, P., S.M. Meintzer, C. Widmann, G.L. Johnson, et K.L. Tyler. 2001. Reovirus infection activates JNK and the JNK-dependent transcription factor c-Jun. J.Virol. vol.75, p. 11275-11283.
- CLARKE, P., S.M. Meintzer, G.L. Johnson, et K.L. Tyler. 2001. Caspase 8-dependent sensitization of cancer cells to TRAIL-induced apoptosis following reovirus-infection. Oncogene vol.20, p. 6910-6919.
- CLARKE, P., S.M. Meintzer, S. Gibson, C. Widmann, T.P. Garrington, G.L. Johnson, et K.L. Tyler. 2000. Reovirus-induced apoptosis is mediated by TRAIL. J.Virol. vol.74, p. 8135-8139.
- CLINTON, G.M., S.P. Little, F.S. Hagen, et A.S. Huang. 1978. The matrix protein of vesicular stomatitis virus regulates transcription. Cell vol.15, p. 1455-1462.
- COFFEY, M.C., J.E. Strong, P.A. Forsyth, et P.W. Lee. 1998. Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. Science vol.282, p. 1332-1334.
- CONDIT. R.C. 2001. Principles of virology. In Fundamental Virology Fourth edition. *Editors: D.M. Knipe, P.M Howley et al.* Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. Chap. 2 pp.19-52.
- CONNOLLY, J.L., S.E. Rodgers, P. Clarke, D.W. Ballard, L.D. Kerr, K.L. Tyler, et T.S. Dermody. 2000. Reovirus-induced apoptosis requires activation of transcription factor NF- κ B. J.Virol. vol.74, p. 2981-2989.
- CONNOR, J.H. et D.S. Lyles. 2002. Vesicular stomatitis virus infection alters the eIF4F translation initiation complex and causes dephosphorylation of the eIF4E binding protein 4E-BP1. J.Virol. vol.76, p. 10177-10187.
- CORY, A.H., T.C. Owen, J.A. Barltrop, et J.G. Cory. 1991. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. Cancer comm. vol.3, p. 207-212.

- COULON, P., V. Deutsch, F. Lafay, C. Martinet-Edelist, F. Wyers, C. Herman, et A. Flamand. 1990. Genetic evidence for multiple functions of the matrix protein of vesicular stomatitis virus. J.Gen.Virol. vol.71, p. 991-996.
- COX, S.E., B. Pearse, et M.R. Munday. 1997. AMP-activated protein kinase in astrocytes. Biochem.Soc.Trans. vol.25, p. S 583.
- CRAVEN, R.C., R.N. Harty, J. Paragas, P. Palese, et J.W. Wills. 1999. Late domain function identified in the vesicular stomatitis virus M protein by use of rhabdovirus-retrovirus chimeras. J.Virol. vol.73, p. 3359-3365.
- CROMPTON, M. 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. Biochem.J. vol.341, p. 233-249.
- CROOK, N.E., R.J. Clem, et L.K. Miller. 1993. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. J.Virol. vol.67, p. 2168-2174.
- CULVER, K.W., Z. Ram, S. Wallbridge, H. Ishii, E.H. Oldfield, et R.M. Blaese. 1992. In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. Science vol.256, p. 1550-1552.
- DAHL, J., A. Jurczak, L.A. Cheng, D.C. Baker, et T.L. Benjamin. 1998. Evidence of a role for phosphatidylinositol 3-kinase activation in the blocking of apoptosis by polyomavirus middle T antigen. J.Virol. vol.72, p. 3221-3226.
- DAVIES, M.V., H.W. Chang, B.L. Jacobs, et R.J. Kaufman. 1993. The E3L and K3L vaccinia virus gene products stimulate translation through inhibition of the double-stranded RNA-dependent protein kinase by different mechanisms. J.Virol. vol.67, p. 1688-1692.
- DEBBAS, M. et E. White. 1993. Wild type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. Genes Dev. vol.7, p. 546-554.
- DEBIASI, R.L., C.L. Edelstein, B. Sherry et K.L. Tyler. 2001. Calpain inhibition protects against virus-induced apoptotic myocardial injury. J.Virol. vol.75, p. 351-361.
- DEBIASI, R.L., M.K. Squier, B. Pike, M. Wynes, T.S. Dermody, J.J. Cohen et K.L. Tyler. 1999. Reovirus-induced apoptosis is preceded by increased cellular calpain activity and is blocked by calpain inhibitors. J.Virol. vol.73, p. 695-701.
- DEMARIA, R., M.R. Rippo, E.H. Schuchman, et R. Testi. 1998. Acidic sphingomyélinase (ASM) is necessary for Fas-induced GD3 ganglioside accumulation an efficient apoptosis of lymphoid cells. J.Exp.Med. vol. 187, p. 897-902.
- DENZLER, K.L. et B.L. Jacobs. 1994. Site-directed mutagenic analysis of reovirus sigma 3 protein binding to dsRNA. Virology vol.204, p. 190-199.

DE OLIVEIRA PINTO, L.M., S. Garcia, H. Lecoeur, C. Rapp, et M.L. Gougeon. 2002. Increased sensitivity of T lymphocytes to tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1)- and TNFR2-mediated apoptosis in HIV infection: relation to expression of Bcl-2 and active caspase-8 and caspase-3. Blood vol.99, p. 1666-1675.

DESFORGES, M., G. Despars, S. Bérard, M. Gosselin, M.O. McKenzie, D.S. Lyles, P.J. Talbot, et L. Poliquin. 2002. Matrix protein mutations contribute to inefficient induction of apoptosis leading to persistent infection of human neural cells by vesicular stomatitis virus. Virology vol.295, p. 63-73.

DESFORGES, M., J. Charron, S. Bérard, S. Beausoleil, D.F. Stojdl, G. Despars, B. Laverdière, J.C. Bell, P.J. Talbot, C.P. Stanners, et L. Poliquin. 2001. Different host-cell shutoff strategies related to the matrix protein lead to persistence of vesicular stomatitis virus mutants on fibroblast cells. Virus Res. vol.76, p. 87-102.

DESFORGES, M. 1999. Infection persistante induite par des mutants de la protéine M du virus de la stomatite vésiculaire sur des lignées fibroblastiques et des cellules représentatives du SNC. Mémoire de maîtrise. Département des Sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal. 175 p.

DEVERGNE, O., E. Hatzivassiliou, K.M. Izumi, K.M. Kaye, M.F. Kleijnen, E. Kieff, et G. Mosialos. 1996. Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. Mol.Cell.Biol. vol.16, p. 7098-7108.

DIETZSCHOLD, B. et H. Koprowski. 1992. Delineation of putative mechanisms involved in antibody-mediated clearance of rabies. Proc.Nat.Acad.Sci.USA vol.89, p. 7252-7255.

DIMITROV, T., P. Krajcsi, T.W. Hermiston, A.E. Tollefson, M. Hannink, et W.S. Wold. 1997. Adenovirus E3-10.4K/14.5K protein complex inhibits tumor necrosis factor-induced translocation of cytosolic phospholipase A2 to membranes. J.Virol. vol.71, p. 2830-2837.

DOBNER, T., N. Horikoshi, S. Rubenwolf, et T. Shenk. 1996. Blockage by adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor. Science vol. 272, p. 1470-1473.

DOLL, S.C. et T.C. Johnson. 1988. Reconstitution with T lymphocytes protects nude mice from a central nervous system disorder induced by a temperature-sensitive vesicular stomatitis virus. J.Gen.Virol. vol.69, p. 1969-1977.

DOUGLAS, J.T., M. Kim, L. Sumerei, D. Carey, et D.T. Curiel. 2001. Efficient oncolysis by a replicating adenovirus in vivo is critically dependent on tumor expression of primary Ad receptors. Cancer Res. vol.61, p. 813-817.

DUBOIS-DALCQ, M., B. Rentier, E. Hooghe-Peters, M.V. Haspel, R.L. Knobler et K. Holmes. 1982. Acute and persistent viral infections of differentiated nerve cells. Rev.Infect.Dis. vol.4, p. 999-1014.

DUBOIS-DALCQ, M., E.L. Hooghe-Peters et R.A. Lazzarini. 1979. Antibody-induced modulation of rhabdovirus infection of neurons in vitro. J.Neuropathol.Exp.Neurol. vol.39, p. 507-522.

DUERKSEN-HUGHES, P., W.S. Wold, et L.R. Gooding. 1989. Adenovirus E1A renders infected cells sensitive to cytolysis by tumor necrosis factor. J.Immunol. vol.143, p. 4193-4200.

DUMONT, P., J.I. Leu, A.C. Della Pietra 3rd, D.L. George, et M. Murphy. 2003. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. Nat.Genet. vol.33, p. 357-365.

DUNCAN, M.R., S.M. Stanish, et D.C. Cox. 1978. Differential sensitivity of normal and transformed human cells to reovirus infection. J.Virol. vol.28, p. 444-449.

DUNNIGAN, D.D., S. Baird, et J. Lucas-Lenard. 1986. Lack of correlation between the accumulation of plus-strand leader RNA and the inhibition of protein and RNA synthesis in vesicular stomatitis virus infected mouse L cells. Virology vol.150, p. 231-246.

EDWARDS, J., F. Denis, et P.J. Talbot. 2000. Activation of glial cells by human coronavirus OC43 infection. J.Neuroimmunol. vol.108, p. 73-81.

ELDADAH, B.A. et A.I. Faden. 2000. Caspase Pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. J.Neurotroma vol.17, p. 811-829.

ELSHAMI, A.A., A. Saavedra, H. Zhang, J.C. Kucharzuk, D.C. Spray, G.I. Fishman, K.M. Amin, L.R. Kaiser, et S.M. Albeda. 1996. Gap junctions play a role in the "bystander effect" of the herpes simplex virus thymidine kinase/gancyclovir system in vitro. Gene Ther. vol.3, p. 85-92.

EMERSON, S.U. 1992. Reconstitution studies detect a single polymerase entry site on the vesicular stomatitis virus genome. Cell vol.31, p. 635-642.

ENDRES, M.J., C.G. Garlisi, H. Xiao, L. Shan, et J.A. Hedrick. 1999. The Kaposi's sarcoma-related herpesvirus (KSHV)-encoded chemokine vMIP-I is a specific agonist for the CC chemokine receptor (CCR)8. J.Exp.Med. vol.189, p. 1993-1998.

FABER, M., R. Pulmanusahakul, S.S. Hodawadekar, S. Spitsin, J.P. McGettigan, M.J. Schnell, et B. Dietzschold. 2002. Overexpression of the rabies virus glycoprotein results in enhancement of apoptosis and antiviral immune response. J.Virol. vol.76, p. 3374-3381.

FADOK, V.A., D.L. Bratton, D.M. Rose, A. Pearson, R.A. Ezekewitz, et P.M. Henson. 2000. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. Nature vol.405, p. 85-90.

FADOK, V.A., D.L. Bratton, A. Konowal, P.W. Freed, J.Y. Westcott, et P.M. Henson. 1998. Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. J.Clin.Invest. vol.101, p. 890-898.

FAULKNER, G., M. Dubois-Dalcq, E. Hooghe-Peters, H.F. McFarland et R.A. Lazzarini. 1979. Defective interfering particles modulate VSV infection of dissociated neuron cultures. Cell. vol.17, p. 979-991.

FELDHAUS, A.L. et J.A. Lesnaw. 1988. Nucleotide sequence of the L gene of Vesicular stomatitis virus (New Jersey): Identification of conserved domains in the New Jersey and Indiana L proteins. Virology vol.163, p. 359-368.

FERNANDEZ, M., M. Porosnicu, D. Markovic, and G.N. Barber. 2002. Genetically engineered vesicular stomatitis virus in gene therapy: application for the treatment of malignant disease. J.Virol. vol.76, p. 895-904.

FERRAN, M.C. et J.M. Lucas-Lenard. 1997. The vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits transcription from the human beta interferon promoter. J.Virol. vol.71, 371-377.

FERRI, K.F. and G. Kroemer. 2001. Organelle-specific initiation of cell death pathways. Nat.Cell Biol. vol.3, p. 255-263.

FIELDS, B.N. et D.M. Knipes. 1991. Introduction. *In* Fundamental Virology. Second edition. *Editors:* B.N. Fields, D.M. Knipe *et al.* Raven Press Ltd, New York. pp.3-8

FISHELSON, Z., G. Attali, et D. Mevorach. 2001. Complement and apoptosis. Mol.Immunol. vol.38, p. 207-219.

FLOETH, F.W., N. Shand, H. Bojar, H.B. Prizack, J. Felsberg, E. Neuen-Jacob, a. Aulich, K.J. Burger, W.J. Bock, et F. Weber. 2001. Local inflammation and de vascularization-in vivo mechanisms of the "bystander effect" in VPC-mediated HSV-Tk/GCV gene therapy for human malignant glioma. Cancer Gene Ther. vol.8, p. 843-851.

FRANCOEUR, A.M., L. Poliquin et C.P. Stanners. 1987. The isolation of interferon-inducing mutants of vesicular stomatitis virus with altered viral P function for the inhibition of total protein synthesis. Virology vol.160, p. 236-245.

FRANK, S., B. Gaume, E.S. Bergmann-Leitner, E.G. Robert, F. Catez, C.L. Smith, et R.J. Youle. 2001. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. Dev.Cell. vol.1, p. 515-525.

FRUH, K., K. Ahn, H. Djaballah, P. Sempe, P.M. van Endert, R. Tampe, P.A. Peterson, et Y. Yang. 1995. A viral inhibitor of peptide transporter for antigen presentation. Nature vol.375, p. 415-418.

FULTZ, P.N. et J.J. Holland. 1985. Differing responses of hamsters to infection by vesicular stomatitis virus Indiana and New Jersey serotypes. Virus Res. vol.3, 129-140.

FULTZ, P.N., J.A. Shaddock, C.Y. Kang, et J.W. Streilen. 1982. Vesicular stomatitis virus can establish persistent infections in Syrian hamsters. J.Gen.Virol. vol.63, 493-497.

FUEYO, J., C. Gomez-Manzano, R. Alemany, P.S. Lee, T.J. McDonnell, P. Mitlianga, Y.X. Shi, V.A. Levin, W.K. Tung, et A.P. Kyritsis. 2000. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. Oncogene vol.19, p. 2-12.

GADALETA, P., M. Vacotto et F. Coulombié. 2002. Vesicular stomatitis virus induces apoptosis at early stages in the viral cycle and does not depend on virus replication. Virus Res. vol.86, p. 87-92.

GAGNON, C.A., G. Lachapelle, Y. Langelier, B.Massie, et S. Dea. 2003. Adenoviral-expressed GP5 of porcine respiratory and reproductive syndrome virus differs in its cellular maturation from the authentic viral protein but maintains known biological functions. Arch.Virol. vol.148, p. 951-972.

GALE, M. Jr, C.M. Blakely, B. Kwieciszewski, S.L. Tan, M. Dossett, N.M. Tang, M.J. Korth, S.J. Polyak, D.R. Gretch, et M.G. Katze. 1998. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. Mol.Cell.Biol. vol.18, p. 5208-5218.

GANLY, I., S.G. Eckhardt, G.I. Rodriguez, D.S. Soudar, R. Otto, A.G. Robertson, O. Park, M.L. Gulley, C. Heise, D.D. Von Hoff, et S.B. Kaye. 2000. A phase I study with Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer. Clin.Cancer Res. vol.6, p. 798-806.

GAO, G. et Q.P. Dou. 2000. N-terminal cleavage of Bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes Bcl-2 independent cytochrome c release and apoptotic cell death. J.Cell.Biochem. vol.80, p. 53-72.

GAO, X., K. Ikuta, M. Tajima, et T. Sairenji. 2001. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induces Epstein-Barr virus reactivation via NF- κ B and AP-1 as regulated by protein kinase C and mitogen-activated protein kinase. Virology vol.286, p. 91-99.

GARCIA-SASTRE, A. 2002. Mechanisms of inhibition of the host interferon α/β -mediated antiviral responses by viruses. Microbes Infect. vol.4, p. 647-655.

GEWURZ, B.E., R. Gaudet, D. Tortorella, E.W. Wang, et H.L. Ploegh. 2001. Virus subversion of immunity: a structural perspective. Curr.Opin.Immunol. vol.13, p. 442-450.

GHADGE, G.D., L. Ma, S. Sato, J. Kim, et R.P. Roos. 1998. A protein critical for a Theiler's virus-induced immune system-mediated demyelinating disease has a cell type-specific antiapoptotic effect and a key role in virus persistence. J.Virol. vol.72, p. 8605-8612.

GHADGE, G.D., P. Malhotra, M.R. Furtado, R. Dhar, et B. Thimmapaya. 1994. In vitro analysis of virus-associated RNA I (VAI RNA) : inhibition of the double-stranded RNA-activated protein kinase PKR by VAI RNA mutants correlates with the in vivo phenotype and the structural integrity of the central domain. J.Virol. vol.68, p. 4137-4151.

GILL, D.S. and A.K. Banerjee. 1986. Complete nucleotide sequence of the matrix protein mRNA of vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype). Virology vol.150, p. 308-312.

GLODOWSKI, D.R., J.M. Petersen, et J.E. Dahlberg. 2002. Complex nuclear localization signals in the matrix protein of vesicular stomatitis virus. J.Biol.Chem. vol.277, p. 46864-46870.

GOLDMACHER, V.S., L.M. Bartle, A. Skaletskaya, C.A. Dionne, N.L. Kedersha, C.A. Vater, J.W. Han, R.J. Lutz, S. Watanabe, E.D. Cahir McFarland, E.D. Kieff, E.S. Mocarski, et T. Chittenden. 1999. A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. Proc.Natl.Acad.Sci.USA vol.96, p. 12536-12541.

GOODING, L.R., T.S. Ranheim, A.E. Tollefson, L. Aquino, P. Duerksen-Hughes, T.M. Horton, et W.S. Wold. 1991. The 10,400- and 14,500-dalton proteins encoded by region E3 of adenovirus function together to protect many but not all mouse cell lines against lysis by tumor necrosis factor. J.Virol. vol.65, p. 4114-4123.

GRAHAM, K.A., A.S. Lalani, J.L. Macen, T.L. Ness, M. Barry, L.Y. Liu, A. Lucas, I. Clark-Lewis, R.W. Moyer, et G. McFadden. 1997. The T1/35kDa family of poxvirus-secreted proteins bind chemokines and modulate leukocyte influx into virus-infected tissues. Virology vol. 229, p. 12-24.

GREENSTEIN, J.I., A.G.S. Baron-Van Evercooren, R.A. Lazzarini, et H.F. McFarland. 1981. Infection of the central nervous system produced by R1 vesicular stomatitis virus. Lab.Invest. vol.44, p. 487-495.

GREGORY, C.D., C. Dive, S. Henderson, C.A. Smith, G.T. Williams, J. Gordon, et A.B. Rickinson. 1991. Activation of Epstein-Barr virus latent genes protects human B cells from death by apoptosis. Nature vol.349, p. 612-614.

GROMEIER, M., S. Lachmann, M.R. Rosenfeld, P.H. Gutin, et E. Wimmer. 2000. Intergeneric poliovirus recombinants for the treatment of malignant glioma. Proc.Natl.Acad.Sci.USA vol.97, p. 6803-6808.

GROMEIER, M., B. Bossert, M. Arita, A. Nomoto, et E. Wimmer. 1999. Dual stem loops within the poliovirus internal ribosomal entry site control neurovirulence. J.Virol. vol.73, p. 958-964.

GROMEIER, M., L. Alexander et E. Wimmer. 1996. Internal ribosomal entry site substitution eliminates neurovirulence in intergeneric poliovirus recombinants. Proc.Natl.Acad.Sci.USA vol.93, p. 2370-2375.

GROSS, S. 1971. Measles and leukaemia. The Lancet vol.1, p. 397-398.

GRUSLIN, É, S. Moisan, Y. St-Pierre, and P.J. Talbot. Activation of self-reactive t cells specific for a cns antigen following mouse mhv infection. En preparation. 2003

GUÉRIN, J.L., J. Gelfi, S. Boullier, M. Delverdier, F.A. Bellanger, S. Bertagnoli, I. Drexler, G. Sutter, et F. Messud-Petit. 2002. Myxoma virus leukemia-associated protein is responsible for major histocompatibility complex class I and Fas-CD95 down-regulation and defines scrapins, a new group of surface cellular receptor abductor proteins. J.Virol. vol.76, p. 2912-2923.

GUO, Y., S.M. Srinivasula, A. Druilhe, T. Fernandes-Alnemri, et E.S. Alnemri. 2002. Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. J.Biol.Chem. vol.277, p. 13430-13437.

HÄCKI, J., L. Egger, L. Monney, S. Conus, T. Rossé, I. Fellay, et C. Borner. 2000. Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. Oncogene vol.19, p. 2286-2295.

HAMID BOULARES, A., M.C. Ferran, et J. Lucas-Lenard. 1996. NF- κ B activation is delayed in mouse L929 cells infected with interferon suppressing, but not inducing, vesicular stomatitis virus strains. Virology vol. 218, p. 71-80.

HAN, Y., S. Weinman, I. Boldogh, R.K. Walker, et A.R. Brasier. 1999. Tumor necrosis factor- α -inducible I κ B α proteolysis mediated by cytosolic m-calpain. J.Biol.Chem. vol.274, p. 787-794.

HANSON, R.P., A.F. Rasmussen, C.A. Brandly, et J.W. Brown. 1950. Human infection with the virus of vesicular stomatitis. J.Lab.Clin.Med. vol.36, p. 754-758.

HARDGRAVE, K.L., B.R. Neas, R.H. Scofield, et J.B. Harley. 1993. Antibodies to vesicular stomatitis virus proteins in patients with systemic lupus erythematosus and in normal subjects. Arthritis Rheum. Vol.36, p. 962-70.

HARTY, R.N., M.E. Brown, J.P. McGettigan, G. Wang, H.R. Jayakar, J.M. Huibregtse, M.A. Whitt, and M.J. Schnell. 2001. Rhabdoviruses and the cellular ubiquitin-proteasome system : a budding interaction. J.Virol. vol.75, p. 10623-10629.

HARTY, R.N., J Paragas, M. Sudol, et P. Palese. 1999. A proline-rich motif within the matrix protein of vesicular stomatitis virus and rabies virus interacts with WW domains of cellular proteins: implications for viral budding. J.Virol. vol.73, p. 2921-2929.

HASHIRO, G., P.C. Loh, et J.T. Yau. 1977. The preferential cytotoxicity of reovirus for certain transformed cell lines. Arch. Virol. vol.54, p. 307-315.

HASPEL, M.V., R. Duff et F. Rapp. 1975. Experimental measles encephalitis: a genetic analysis. Infect Immun. vol.12, p. 785-790.

HAY, S. et G. Kannourakis. 2002. A time to kill: viral manipulation of the cell death program. J.Gen.Virol. vol.83, p. 1547-1564.

HE, B., M. Gross, et B. Roizman. 1997. The gamma (1) 34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1 alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiator factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. Proc.Natl.Acad.Sci.USA vol.94, p. 843-848.

HEISE, C., T. Hermiston, L. Johnson, G. Brooks, A. Sampson-Johannes, A. Williams, L. Hawkins, et D. Kirn. 2000. An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective anti-tumoral efficacy. Nat.Med. vol.6, p. 1134-1139.

HENDERSON, S., D. Huen, M. Rowe, C. Dawson, G. Johnson, et A. Rickinson. 1993. Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. Proc.Natl.Acad.Sci.USA vol.90, p. 8479-8483.

HENGARTNER. 2000. The biochemistry of apoptosis. Nature vol.407, p. 770-776.

HER, L.S., E. Lund, et J.E. Dahlberg. 1997. Inhibition of Ran guanosine triphosphate-dependent nuclear transport by the matrix protein of vesicular stomatitis virus. Science vol.276, p. 1845-1848.

HICKEY, W. 2001. Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. Glia vol.36, p. 118-124.

HIGUCHI, H., J.-H. Yoon, A. Grambihler, N. Werneburg, S.F. Bronk, et G.J. Gores, 2003. Bile acids stimulate cFLIP phosphorylation enhancing TRAIL-mediated apoptosis. J.Biol.Chem. vol.278, p. 454-461.

HILL, A., P. Jugovic, I. York, G. Russ, J. Bennink, J. Yewdell, H. Ploegh, et D. Johnson. 1995. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. Nature vol.375, p. 411-415.

HOLLAND, J.J. et L.P.Villareal. 1974. Persistent noncytotoxic vesicular stomatitis virus infections mediated by defective T particles that suppress virion transcriptase. Proc.Nat.Acad.Sci.USA vol.71, p. 2956-2960.

HORI, K., P.R. Burd, K. Furuke, J. Kutza, K.A. Weih, et K.A. Clouse. 1999. Human immunodeficiency virus-1-infected macrophages induce inducible nitric oxide synthase and nitric oxide (NO) production in astrocytes: astrocytic NO as a possible mediator of neural damage in acquired immunodeficiency syndrome. Blood vol.93, p. 1843-1850.

HOUSEWEART, M.K., A. Vilaythong, X.M. Yin, B. Turk, J.L. Noebels, et R.M. Myers. 2003. Apoptosis caused by cathepsins does not require Bid signaling in an in vivo model of progressive myoclonus epilepsy (EPM1). Cell Death Diff. Epub ahead of print

HOWARD, J., D.E. Justus, A.V. Totmenin, S. Shchelkunov, et G.J. Kotwal. 1998. Molecular mimicry of the inflammation modulatory proteins (IMPs) of poxviruses: evasion of the inflammatory response to preserve viral habitat. J.Leukoc.Biol. vol.64, p. 68-71.

HOWES, K.A., N. Ransom, D.S. Papermaster, J.G. Lasudry, D.M. Albert, et J.J. Windle. 1994. Apoptosis or retinoblastoma : alternative fates of photoreceptors expressing the HPV-16 E7 gene in the presence or absence of p53. Genes Dev. vol.8, p.1300-1310.

HU, F.Q., C.A. Smith, et D.J. Pickup. 1994. Cowpox virus contains two copies of an early gene encoding a soluble secreted form of the type II TNF receptor. Virology vol.204, p. 343-356.

HUANG, Y. et K.K.W. Wang. 2001. The calpain family and human disease. Trends Mol.Med. vol.7, p. 355-362.

HUPRIKAR, J., S.G. Rabinowitz, M.C. DalCanto et M.K. Rundell. 1986. Persistent infection of a temperature-sensitive G31 vesicular stomatitis virus mutant in neural and nonneural cells: biological and virological characteristics. J.Virol. vol. 58, p. 493-499.

HUYNH, M.L., V.A. Fadok, et P.M. Henson. 2002. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. J.Clin.Invest. vol.109, p. 41-50.

ISAACS, A. and J. Lindemann. 1957. Virus interference. 1. The interferon. Proc.Roy.Soc.B. vol. 147, p. 258-273.

ISEGAWA, Y., Z. Ping, K. Nakano, N. Sugimoto, et K. Yamanishi. 1998. Human herpesvirus 6 open reading frame U12 encodes a functional beta-chemokine receptor. J.Virol. vol.72, p. 6104-6112.

ISHIDO, S., C. Wang, B.S. Lee, G.B. Cohen, et J.U. Jung. 2000. Downregulation of major histocompatibility complex class I molecules by Kaposi's sarcoma-associated herpes virus K3 and K5 proteins. J.Virol. vol.74, p. 5300-5309.

JACOTOT, E., L. Ravagnan, M. Loeffler, K.F. Ferri, H.L. Vieira, N. Zamzami, P. Costantini, S. Druillennec, J. Hoebeker, J.P. Briand, T. Irinopoulou, E. Daugas, S.A. Susin, D. Cointe, Z.H. Xie, J.C. Reed, B.P. Roques, et G. Kroemer. 2000. The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. J.Exp.Med. vol.191, p. 33-46.

JAN, J.-T., S. Chatterjee et D.E. Griffin. 2000. Sindbis virus entry into cells triggers apoptosis by activating sphingomyelinase, leading to the release of ceramide. J.Virol. vol.74, p. 6425-6432.

JAN, J.-T., et D.E. Griffin. 1999. Induction of apoptosis by Sindbis virus occurs at cell entry and does not require virus replication. J.Virol. vol.73, p. 10296-10302.

JAYAKAR, H.R. et M.A Whitt. 2002. Identification of two additional translational products from the matrix (M) gene that contribute to vesicular stomatitis virus cytopathology. J.Virol. vol.76, p. 8011-8018

JIMBO, A., E. Fujita, Y. Kouroku, J. Ohnishi, N. Inohara, K. Kuida, K. Sakamaki, S. Yonehara, et T. Momoi. 2003. ER stress induces caspase-8 activation, stimulating cytochrome c release and caspase-9 activation. Exp.Cell Res. vol.283, p. 156-166.

JIMENEZ, G.S., Khan, S.H., Stommel, J.M. et Wahl, G.M. 1999. P53 regulation by post-translational modification and nuclear retention in response to diverse stresses. Oncogene vol.18, p. 7656-7663.

JOE, A.K., H.H. Foo, L. Kleeman, et B. Levine. 1998. The transmembrane domains of Sindbis virus envelope glycoproteins induce cell death. J.Virol. vol.72, p. 3935-3943.

JOHNSON, J.M., C. Nicot, J. Fullen, V. Ciminale, L. Casareto, J.C. Mulloy, S. Jacobson, et G. Franchini. 2001. Free major histocompatibility complex class I heavy chain is preferentially targeted for degradation by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 p12 (I) protein. J.Virol. vol.75, p. 6086-6094.

JOHNSON, D.E. 2000. Noncaspase proteases in apoptosis. Leukemia vol.14, p. 1695-1703.

JOKLIK, W.K. 1991. Interferons. *In* Fundamental Virology. Second edition. *Editors:* B.N. Fields, D.M. Knipe *et al.* Raven Press Ltd, New York. chap 14, pp.343-370.

JOSEPH, J., F.D. Lublin, et R.L. Knobler. 1997. Modulation of T cell-endothelial adhesion by astrocyte conditioned medium. Glia vol.21, p. 408-412.

KADOWAKI, N., S. Antonenko, J.Y-N. Lau, et Y-J. Liu. 2000. Natural interferon α/β -producing cells link innate and adaptive immunity. J Exp.Med. vol. 192, p.219-225.

KAGI, D., et H. Hentgartner. 1996. Different roles for cytotoxic T cells in the control of infections with cytopathic versus noncytopathic viruses. Curr.Opin.Immun. vol. 8, p. 472-477.

KANG, K.H., K.H. Lee, M.Y. Kim, et K.H. Choi. 2001. Caspase-3-mediated cleavage of the NF-kappaB subunit p65 at the NH₂ terminus potentiates naphthoquinone analog-induced apoptosis. J.Biol.Chem. vol.276, p. 24638-24644.

KARBOWSKI, M., Y.J. Lee, B. Gaume, S.-Y. Jeong, S. Frank, A. Nechushtan, A. Santel, M. Fuller, C.L. Smith, et R.J. Youle. 2002. Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. J.Cell Biol. vol.159, p. 931-938.

KARIN, M. et A. Lin. 2002. NF-kB at the crossroads of life and death. Nat.Immunol. vol.3, p. 221-227.

KARPINICH, N.O., M. Tafani, R.J. Rothman, M.A. Russo, et J.L. Farber. 2002. The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochondrial release of cytochrome c. J.Biol.Chem. vol.277, p. 16547-16552.

KATO, M., T. Nonaka, M. Maki, H. Kikuchi, et S. Imajoh-Ohmi. 2000. Caspases cleave the amino-terminal calpain inhibitory unit of calpastatin during apoptosis in human jurkat T cells. J.Biochem. vol.127, p. 297-305.

KAWAKAMI, A., T. Nakashima, H. Sakai, S. Urayama, S. Yamasaki, A. Hida, M. Tsuboi, H. Nakamura, H. Ida, K. Migita, Y. Kawabe, et K. Eguchi. 1999. Inhibition of caspase cascade by HTLV-1 Tax through induction of NF-kB nuclear translocation. Blood vol.94, p. 3847-3854.

KAYE, K.M., O. Devergne, J.N. Harada, K.M. Izumi, R. Yalamanchili, E. Kieff, et G. Mosialos. 1996. Tumor necrosis factor receptor associated factor 2 is a mediator of NF-kappa B activation by latent infection membrane protein 1, the Epstein-Barr virus transforming protein. Proc.Natl.Acad.Sci.USA vol.93, p. 11085-11090

KELLER, S.A., E.J. Schattner, et E. Cesarman. 2000. Inhibition of NF-kB induces apoptosis of KSHV-infected primary effusion lymphoma cells. Blood vol.96, p. 2537-2542.

KENNEDY, N.J., T. Kataoka, J. Tschopp, et R.C. Budd. 1999. Caspase activation is required for T cell proliferation. J.Exp.Med. vol.190, p. 1891-1896.

KERKAU, T., I. Bacik, J.R. Bennink, J.W. Yewdell, T. Hunig, A. Schimpl, et U. Schubert. 1997. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpu protein interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. J.Exp.Med. vol.185, p. 1295-1305.

KERR, J.F., A.H. Wyllie, et A.R. Currie. 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br.J.Cancer vol.26, p. 239-257.

KHALED, A.R., K. Kim, R. Hofmeister, K. Muegge, et S.K. Durum. 1999. Withdrawal of IL-7 induces Bax translocation from cytosol to mitochondria through a rise in intracellular pH. Proc.Natl.Acad.Sci.USA vol.96, p. 14476-14481.

KHURI, F.R., J. Nemunaitis, I. Ganly, J. Arseneau, I.F. Tannock, L. Romel, M. Gore, J. Ironside, R.H. MacDougall, C. Heise, B. Randlev, A.M. Gillenwater, P. Brusco, S.B. Kaye, W.K. Hong, et D.H. Kim. 2000. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. Nat.Med. vol.6, p. 879-885.

KIM, H.J., J.Y. Mun, Y.J. Chun, K. H. Choi, et M.Y. Kim. 2001. Bax-dependent apoptosis induced by ceramide in HL-60 cells. FEBS Letters vol.505, p. 264-268.

KLEDAL, T.N., M.M. Rosenkilde, et T.W. Schwartz. 1998. Selective recognition of the membrane-bound CX3C chemokine, fractalkine, by the human cytomegalovirus-encoded broad-spectrum receptor US28. FEBS Lett. vol.441, p. 209-214.

KLUCK, R.M., M.D. Esposti, G. Perkins, C. Renken, T. Kuwana, E. Bossy-Wetzel, M. Goldberg, T. Allen, M.J. Barber, D.R. Green, et D.D. Nwmeyer. 1999. The pro-apoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol. J.Cell Biol. vol.147, p. 809-822.

KOMATSU, T., Z. Bi et C.S. Reiss. 1996. Interferon- γ induced type I oxide synthase activity inhibits viral replication in neurons. J.Neuroimmun. vol.68, p. 101-108.

KOPECKY, S.A et D.S. Lyles. 2003a. Contrasting effects of matrix protein on apoptosis in HeLa and BHK cells infected with vesicular stomatitis virus are due to inhibition of host gene expression. J.Virol. vol.77, p. 4658-4669.

KOPECKY, S.A et D.S. Lyles. 2003b. The cell-rounding activity of the vesicular stomatitis virus matrix protein is due to the induction of cell death. J.Virol. vol.77, p. 5524-5528.

KOPECKY, S.A, M.C. Willingham et D.S. Lyles. 2001. Matrix protein and another viral component contribute to induction of apoptosis in cells infected with vesicular stomatitis virus. J.Virol. vol.75, p. 12169-12181.

KOYAMA, A.H., T. Fukumori, M. Fujita, H. Irie, et A. Adachi. 2000. Physiological significance of apoptosis in animal virus infection. Microbes Infect. vol.2, p. 1111-1117.

KOYAMA, A.H., H. Irie, T. Fukumori, S. Hata, S. Iida, H. Akari, et A. Adachi. 1998a. Role of virus-induced apoptosis in a host defense mechanism against virus infection. J.Med.Invest. vol.45, p. 37-45.

KOYAMA, A.H., T. Arakawa et A. Adachi. 1998b. Acceleration of virus-induced apoptosis by tumor necrosis factor. FEBS Lett. Vol.426, p. 179-182.

KOYAMA, A.H. 1995 Induction of apoptotic DNA fragmentation by the infection of vesicular stomatitis virus. Virus Res. vol. 37, p. 285-290.

KRAKOWSKI, M.I., et T. Owens. 2000. Naïve T lymphocytes traffic to inflamed central nervous system, but require antigen recognition for activation. Eur.J.Immunol. vol.30, p. 1002-1009.

KRIESER, R. et K. White. 2000 Engulfment mechanism of apoptotic cells. Curr.Opin.Cell Biol. vol.14, p. 734-738.

KRUEGER, A., S. Baumann, P.H. Krammer, et S. Kirchhoff. 2001. FLICE-Inhibitory proteins: Regulators of death receptor-mediated apoptosis. Mol.Cell.Biol. vol.21, p. 8247-8254.

KUWANA, T.,M.R. MacKey, G. Perkins, M.H. Ellisman, M. Latterich, R. Schneiter, D.R. Green, and D.D. Newmeyer. 2002. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer membrane membrane. Cell vol.111, p. 331-342.

LALANI, A.S., K. Graham, K. Mossman, K. Rajarathnam, I. Clark-Lewis, D. Kelvin, et G. McFadden. 1997. The purified myxoma virus gamma interferon receptor homolog M-T7 interacts with the heparin-binding domains of chemokines J.Virol. vol.71, p. 4356-4363.

LAMPERT, P.W., J.K. Sims, et A.J. Kniazeff. 1973. Mechanism of demyelination in JHM encephalitis. Electron microscopic studies. Acta Neuropathol. vol.24, p. 76-85.

LAVI, E., A. Suzumura, M. Hirayama, M.K. Highkin, D.M. Dambach, D.H. Silberberg, et S.R. Weiss. 1987. Coronavirus mouse hepatitis virus (MHV)-A59 causes a persistent, productive infection in primary glial cell cultures. Microb.Pathogen. vol.3, p. 79-86.

LAVI, E., D.H. Gilden, M.K. Highkin, and S.R. Weiss. 1984a. Detection of MHV-A59 RNA by in situ hybridization. Adv.Exp.Med.Biol. vol.173, p. 247-257.

LAVI, E., D.H. Gilden, M.K. Highkin, and S.R. Weiss. 1984b. MHV-A59 pathogenesis in mice. Adv.Exp.Med.Biol. vol.173, p. 237-245

LAVI, E., D.H. Gilden, Z. Wroblewska, L.B. Rorke, and S.R. Weiss. 1984c. Experimental demyelination produced by the A59 strain of mouse hepatitis virus. Neurology vol.34, p. 597-603.

LEBON, A. et D.F. Tough. 2002. Links between innate and adaptive immunity via type 1 interferon. Curr.Opin.Immunol. vol. 14, p. 432-436.

- LEIST, M. et M. Jäättelä. 2001. Triggering of apoptosis by cathepsins. Cell Death. Differ. vol.8, p. 324-326.
- LEMAIRE, C., K. Andreau, V. Souvannavong, et A. Adam. 1998. Inhibition of caspase activity induces a switch from apoptosis to necrosis. FEBS Lett. vol.425, p. 266-270.
- LETCHWORTH, G.J., L.L. Rodriguez, et J. Del C. Barrera. 1999. Vesicular stomatitis. The Vet. J. vol.157, p. 239-260.
- LETCHWORTH, G.J., J.C. Barrera, J.R. Fishel et L. Rodriguez 1996. Vesicular stomatitis New Jersey virus RNA persists in cattle following convalescence. Virology vol. 219, p. 480-484.
- LEVINE, J.A. 2001a. The origin of virology. In Fundamental Virology Fourth edition. *Editors: D.M. Knipe, P.M Howley et al.* Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. Chap. 1 pp.3-18.
- LEVINE, B. 2001b. Apoptosis in viral infections of neurons: A protective or pathologic host response? Curr.Top.Microbiol.Immunol. vol.265, p. 95-118.
- LEVINE, B., J. Hardwick, B. Trapp, T. Crawford, R. Bollinger et D. Griffin. 1991. Antibody mediated clearance of α -virus infection from neurons. Science vol.254, p. 856-860.
- LEVINE, B., Q. Huang, J.T. Isaacs, J.C. Reed, D.E. Griffin et J.M. Hardwick. 1993. Conversion of lytic to persistent alphavirus infection by the Bcl-2 cellular oncogene. Nature vol.361, p. 739-742.
- LEVITSKAYA, J., A. Shapiro, A. Leonchiks, A. Ciechanover, et M.G. Masucci. 1997. Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. Proc.Natl.Acad.Sci.USA vol.94, p. 12616-12621.
- LEVITSKAYA, J., M. Coram, V. Levitsky, S. Imreh, P.M. Steigerwald, G. Klein, M.G. Kurilla, et M.G. Masucci. 1995. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. Nature vol.375, p. 685-688.
- LI, L.Y., X. Luo, et X. Wang. 2001. Endonuclease G is an apoptotic Dnase when released from mitochondria. Nature vol.412, p. 95-99.
- LI, H., S.K. Kolluri, J. Gu, M.I. Dawson, X. Cao, P.D. Hobbs, B. Lin, G. Chen, J. Lu, F. Lin, Z. Xie, J.A. Fontana, J.C. Reed, et X. Zhang. 2000. Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. Science vol.289, p. 1159-1164.

- LI, S., S. Labrecque, M.C. Gauzzi, A.R. Cuddihy, A.H. Wong, S. Pellegrini, G.J. Matlashewski, et A.E. Koromilas. 1999. The human papillomavirus (HPV)-18 E6 oncoprotein physically associates with Tyk2 and impairs Jak-STAT activation by interferon-alpha. Oncogene vol.18, p. 5727-5737.
- LI, T. et A.K. Pattnaik. 1999. Overlapping signals for transcription and replication at the 3' terminus of the vesicular stomatitis virus genome. J.Virol. vol.73, p. 444-452.
- LI, Y., R.C. Pong, J.M. Bergelson, M.C. Hall, A.I. Sagalowsky, C.P. Tseng, Z. Wang, et J.T. Hsieh. 1999. Loss of adenoviral receptor expression in human bladder cancer cells: a potential impact on the efficacy of gene therapy. Cancer Res. vol.59, p. 325-330.
- LI, H., H. Zhu, C.-j. Xu et J. Yuan. 1998. Cleavage of Bid by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. Cell vol.94, p. 491-501.
- LIEBERT, U.G. 2001. Slow and persistent virus infections of neurons- A compromise for neuronal survival. Curr.Top.Microbiol.Immunol. vol.253, p. 35-60.
- LIN, K.-I., J.A. DiDonato, A. Hoffmann, J.M. Hardwick, et R.R. Ratan. 1998. Suppression of steady-state, but not stimulus-induced NF-kB activity inhibits alphavirus-induced apoptosis. J.Cell.Biol. vol.141, p. 1479-1487.
- LOOK, D.C., W.T. Roswit, A.G. Frick, Y. Gris-Alevy, D.M. Dickhaus, M.J. Walter, et M.J. Holtzman. 1998. Direct suppression of STAT1 function during adenoviral infection. Immunity vol.9, p. 871-880.
- LORENCE, R.M., P.A. Rood, et K.W. Kelley. 1988. Newcastle disease virus as an antineoplastic agent: induction of tumor necrosis factor-alpha and augmentation of its cytotoxicity. J.Natl.Cancer Inst. vol.80, p. 1305-1312.
- LU, Y., M. Wambach, M.G. Katze, et R.M. Krug. 1995. Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF2 translation initiation factor. Virology vol.214, p. 222-228.
- LUCAS, M., U. Karrer, A. Lucas, et P. Klenerman. 2001. Viral escape mechanisms- Escapology taught by viruses. Int.J.Exp.Pathol. vol.82, p. 269-286.
- LY, J.D., D.R. Grubb et A. Lawen. 2003. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$) in apoptosis; an update. Apoptosis vol.8, p. 115-128.
- LYLES, D.S. et M.O. McKenzie. 1997. Activity of vesicular stomatitis virus M protein mutants in cell rounding is correlated with the ability to inhibit host gene expression and is not correlates with virus assembly function. Virology vol.229, p.77-89.

LYLES, D.S., M. McKenzie et J. Wallace Parce. Subunit interaction of vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein stabilized by binding to viral protein. J.Virol. vol.66, p. 349-358.

LYLES, D.S., M.O. McKenzie, M. Ahmed et S.C. Woolwine. 1996. Potency of wild-type and temperature-sensitive vesicular stomatitis virus matrix protein in the inhibition of host-directed gene expression. Virology vol.225, p. 172-180.

LYLES, D.S., L. Puddington et B.J. McCreedy Jr. 1988. Vesicular stomatitis virus M protein in the nuclei of infected cells. J.Virol. vol.62, p. 4387-4392.

MAHESHWARI, R.K. et R.M. Friedman. 1980. Effect of interferon treatment on vesicular stomatitis virus (VSV): release of unusual particles with low infectivity. Virology vol.101, p. 399-407.

MAHESHWARI, R.K., F.T. Jay et R.M. Friedman. 1980a. Selective inhibition of glycoprotein and membrane protein of vesicular stomatitis virus from interferon-treated cells. Science vol.207, p. 540-541.

MAHESHWARI, R.K., A.E. Demsey, S.B. Mohanty, et R.M. Friedman. 1980b. Interferon-treated cells release vesicular stomatitis virus particles lacking glycoprotein spikes : correlation with biochemical data. Proc.Natl.Acad.Sci.USA vol.77, p. 2284-2287.

MAHESHWARI, R.K., D.K. Banerjee, C.J. Waechter, K. Olden, et R.M. Friedman. 1980c. Interferon treatment inhibits glycosylation of a viral protein. Nature. vol.287, p. 454-456.

MAJUMDER, P.K., P. Pandey, X. Sun, K. Cheng, R. Datta, S. Saxena, S. Kharbanda, et D. Kufe. 2000. Mitochondrial translocation of protein kinase C in phorbol ester-induced cytochrome c release and apoptosis. J.Biol.Chem. vol.275, p. 21793-21796.

MANDIC, A., K. Viktorsson, L. Strandberg, T. Heiden, J. Hansson, S. Linder, et M.C. Shoshan. 2002. Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: Two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. Mol.Cell.Biol. vol.22, p. 3003-3013.

MARCELLUS, R.C., J.N. Lavoie, D. Boivin, G.C. Shore, G. Ketner, et P.E. Branton. 1998. The early region 4 orf4 protein of human adenovirus type 5 induces p53-independent cell death by apoptosis. J.Virol. vol.72, p. 7144-7153.

MARCHENKO, N.D., A. Zaika, et U.M. Moll. 2000. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. J.Biol.Chem. vol.275, p. 16202-16212.

MARKERT, J.M., J.N. Parker, G.Y. Gillespie, et R.J. Whitley. 2001. Genetically engineered human herpes simplex virus in the treatment of brain tumors. Herpes vol. 8, p. 17-22.

- MARTINO, J.-C. et D.R. Green. 2001. Breaking the mitochondrial barrier. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. vol.2, p. 63-67.
- MARTINO, I., S. Desagher, R. Eskes, B. Antonsson, E. Andre, S. Fakan, and J.C. Martinou. 1999. The release of cytochrome c from mitochondria during apoptosis of NGF-deprived sympathetic neurons is a reversible event. J. Cell Biol. vol.144, p. 883-889.
- MATSUYAMA, S. et J.C. Reed. 2000. Mitochondria-dependent apoptosis and cellular pH regulation. Cell Death Differ. vol.7, p. 1155-1165.
- MATTHEWS, A.E., S.R. Weiss, et Y. Paterson. 2002. Murine hepatitis virus-A model for virus-induced CNS demyelination. J. Neurovirol. vol.8, p. 76-85.
- MAY, P. et May, E. 1999. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. Oncogene vol.18, p. 7621-7636.
- MAYER, B. et R. Oberbauer. 2003. Mitochondrial regulation of apoptosis. News. Physiol. Sci. vol.18, p. 89-94.
- MCCART, J.A., M. Puhlmann, J. Lee, Y. Hu, S.K. Libutti, H.R. Alexander, et D.L. Bartlett. 2000. Complex interactions between the replication oncolytic effect and the enzyme/prodrug effect of vaccinia-mediated tumor regression. Gene Ther. vol.7, p. 1217-1223.
- MCGOWAN, J.J., S.U. Emerson, et R.R. Wagner. 1982. The plus-strand leader RNA of VSV inhibits DNA-dependent transcription of adenovirus and SV40 genes in a soluble whole-cell extract. Cell vol., p. 325-333.
- MELKI, R., Y. Gaudin et D. Blondel. 1994. Interaction between tubulin and the viral matrix protein of vesicular stomatitis virus: possible implications in the viral cytopathic effect. Virology vol.202, p. 339-347.
- MESSUD-PETIT, F., J.Gelfi, M. Delverdier, M.F. Amardeilh, R. Py, G. Sutter, and S. Bertagnoli. 1998. Serp2, an inhibitor of the interleukin-1beta-converting enzyme, is critical in the pathobiology of myxoma virus. J. Virol. vol.72, p. 7830-7839.
- MILLER, L.K. et E. White. 1998. Apoptosis in virus infection. Semin. Virol. vol.8, p. 443-444.
- MILLER, S.D., C.L. Vanderlugt, W. Smith Begolka, W. Pao, R.L. Yauch, K.L. Neville, Y. Katz-Levy, A. Carrizosa, et B.S. Kim. 1997. Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. Nature Med. vol.3, p. 1133-1136.
- MILLER, D.J., K. Asakura et M. Rodriguez. 1995. Experimental strategies to promote nervous system remyelination in multiple sclerosis: insights gained from the Theiler's virus model system. J. Neurosci. vol.41, p. 291-296.

MILLER, S.D. et S.J. Gerety. 1990. Immunologic aspects of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)-induced demyelinating disease. Semin.Virol. vol.1, p. 263-272.

MILNE, R.S., C. Mattick, L. Nicholson, P. Devaraj, A. Alcamì, et U.A. Gompels. 2000. RANTES binding and down-regulation by a novel human herpesvirus-6 beta chemokine receptor. J.Immunol. vol.164, p. 2396-2404.

MOCARSKI, E.S. Jr, 2002. Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. Trends Microbiol. vol.10, p. 332-339.

MOFFATT, O.D., A. Devitt, E.D. Bell, D.L. Simmons, et C.D. Gregory. 1999. Macrophage recognition of ICAM-3 on apoptotic leukocytes. J.Immunol. vol.162, p. 6800-6810.

MOODLEY, Y., P. Rigby, C. Bundell, S. Bunt, H. Hayashi, N. Misso, R. McAnulty, G. Laurent, A. Scaffidi, P. Thompson, et D. Knight. 2003. Macrophage recognition and phagocytosis of apoptotic fibroblasts is critically dependent on fibroblast-derived thrombospondin 1 and CD36. Am.J.Pathol. vol.162, p. 771-779.

MOORE, M.S. 1998. Ran and nuclear transport. Minireview. J.Biol.Chem. vol.273, p. 22857-22860.

MOORE, K.W., P. Viera, D.F. Fiorentino, M.L. Trunstin, T.A. Khan, et T.R. Mosmann. 1990. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. Science vol.248, p. 1230-1233.

MOSSMAN, K., C. Upton, R.M. Buller, and G. McFadden. 1995. Species specificity of ectromella virus and vaccinia virus interferon-gamma binding proteins. Virology vol.208, p. 762-769.

MULLEN, J.T. et K.K. Tanabe. 2002. Viral oncolysis. The Oncologist. vol. 7, p. 106-119.

MULLOY, J.C., T. Kislyakova, A. Cereseto, L. Casareto, A. LoMonico, J. Fullen, M.V. Lorenzi, A. Cara, C. Nicot, C. Giam, et G. Franchini. 1998. Human T-cell lymphotropic/leukemia virus type 1 Tax abrogates p53-induced cell cycle arrest and apoptosis through its CREB/ATF functional domain. J.Virol. vol. 72, p. 8852-8860.

MUNGER, J. et B. Roizman. 2001. The US3 protein kinase of herpes simplex virus 1 mediates the posttranslational modification of BAD and prevents BAD-induced programmed cell death in the absence of other viral proteins. Proc.Natl.Acad.Sci USA vol.98, p. 10410-10415.

MURRAY, P.D., K.D. Pavelko, J. Leibovitz, X. Lin, et M. Rodriguez. 1998. CD4(+) and CD8(+) T cells make discrete contributions to demyelination and neurologic disease in a viral model of multiple sclerosis. J.Virol. vol.72, p. 7320-7329.

NAKAGAWA, T. et J. Yuan. 2000. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. J.Cell.Biol. vol.150, p. 887-894.

NEMUNAITIS, J., F. Khuri, I. Ganly, J. Arseneau, M. Posner, E. Vokes, J. Kuhn, T. McCarty, S. Landers, A. Blackburn, L. Romel, B. Randlev, S. Kaye, et D. Kirn. 2001. Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer. J.Clin.Oncol. vol.19, p. 289-298.

NEMUNAITIS, J., I. Ganly, F. Khuri, J. Arseneau, J. Kuhn, T. McCarty, S. Landers, P. Maples, L. Romel, B. Randlev, T. Reid, S. Kaye, et D. Kirn. 2000. Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial. Cancer Res. vol.60, p. 6359-6366.

NEW, D.R., S.B. Maggirwar, L.G. Epstein, S. Dewhurst, et H.A. Gelbard. 1998. HIV-1 Tat induces neuronal death via tumor necrosis factor-alpha and activation of non-N-methyl-D-aspartate receptors by a NFkappaB-independent mechanism. J.Biol.Chem. vol.273, p. 17852-17858.

NEWCOMB-FERNANDEZ, J.K., X. Zhao, B.R. Pike, K.K. Wang, A. Kampfl, R. Beer, S. Michelle DeFord, et R.L. Hayes. 2001. Concurrent assessment of calpain and caspase-3 activation after oxygen-glucose deprivation in primary septo-hippocampal cultures. J. Cer.Blood Flow Metabol. vol.21, p. 1281-1294.

NEWMAYER, D.D. et S. Ferguson-Miller. 2003. Mitochondria : releasing power for life and unleashing the machineries of death. Cell vol.112, p. 481-490.

NICOTERA, P. 2002. Apoptosis and age-related disorders: role of caspase-dependent and caspase-independent pathways. Toxicol.Lett. vol.127, p. 189-195.

NICOTERA, P. 2000. Caspase requirement for neuronal apoptosis and neurodegeneration. IUBMB Life vol.49, p. 421-425.

NISHIYAMA, Y. 1977. Studies of L cells persistently infected with VSV: factors involved in the regulation of persistent infection. J.Gen.Virol. vol.35, p. 265-279.

NORMAN, K.L. et P.W. Lee. 2000. Reovirus as a novel oncolytic agent. J.Clin.Invest. vol.105, p. 1035-1038.

NUNEZ, G., M.A. Benedict, Y. Hu, et N. Inohara. 1998. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. Oncogene vol.17, p. 3237-3245.

OBUCHI, M., M. Fernandez et G.N. Barber. 2003. Development of recombinant vesicular stomatitis viruses that exploit defects in host defense to augment specific oncolytic activity. J.Virol. vol.77, p. 8843-8856.

- OLDSTONE, M.B.A. and J.C. de la TORRE 1996. Anatomy of viral persistence : mechanisms of persistence and associated disease. Adv.Virol.Res. vol.46, p. 311-343
- OLDSTONE, M. B. A. 1996. Principles of viral pathogenesis. Cell vol.87, p. 799-801.
- OLDSTONE, M.B.A. 1991. Molecular Anatomy of Viral Persistence. J.Virol. vol.65, p. 6381-6386.
- OLDSTONE, M.B.A. 1989. Viral persistence. Cell. vol.56, p. 517-520.
- OLSON, J.K, T.D. Eagar, et S.D. Miller. 2002. Functional activation of myelin-specific T cells by virus-induced molecular mimicry. J.Immunol. vol.169, p. 2719-2726.
- OWENS, T. et A. Babcock. 2002. Immune response induction in the central nervous system. Front.Biosci. vol.7, p. 427-438.
- OYADOMARI, S., E. Araki, et M. Mori. 2002. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic β -cells. Apoptosis vol.7, p. 335-345.
- PAIK, S.-Y., A.C. Banerjee, G.G. Harmison, C.-J. Chen, et M. Schubert. 1995. Inducible and conditional inhibition of human immunodeficiency virus proviral expression by vesicular stomatitis virus matrix protein. J.Virol. vol.69, p. 3229-3237.
- PARK, J.S., E.J. Kim, H.J. Kwon, E.S. Hwang, S.E. Namkoong, et S.J. Um. 2000. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. J.Biol.Chem. vol.275, p. 6764-6769.
- PARKER, G.A., T. Crook, M. Bain, E.A.Sara, P.J. Farrell, et M.J. Allday. 1996. Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA)3C is an immortalizing oncoprotein with similar properties to adenovirus E1A and papillomavirus E7. Oncogene vol.13, p. 2541-2549.
- PARONE, P.A., D. James, et J.C. Martinou. 2002. Mitochondria: regulating the inevitable. Biochimie vol.84, p. 105-111.
- PASQUINUCCI, G. 1971. Possible effect of measles on leukaemia. The Lancet vol.1,p. 136.
- PECORA, A.L., N. Rizvi, G.I. Cohen, N.J. Meropol, D. Sterman, J.L. Marshall, S. Goldberg, P. Gross, J.D. O'Neil, W.S. Groene, M.S. Roberts, H. Rabin, M.K. Bamat, et R.M. Lorence. 2002. Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers. J.Clin.Oncol. vol.20, p. 2251-2266.
- PELUZO, R.W. et S.A. Meyer. 1988. Viral proteins required for the *in vitro* replication of vesicular stomatitis virus defective interfering particle genome RNA. Virology vol.162, p. 369-376.

PENG, K.-W., C. TenEyck, E. Galanis, K.R. Kalli, L.C. Hartman, et S.J. Russell. 2002. Intraperitoneal therapy of ovarian cancer using an engineered measles virus. Cancer Res. vol.62, p. 4656-4662.

PENG, K.-W., G.J. Ahman, L. Pham, P.R. Greipp, R. Cattaneo, et S.J. Russell. 2001. Systemic therapy of myeloma xenografts by an attenuated measles virus. Blood vol.98, p. 2002-2007.

PENNISI, E. 1998. The nucleus's revolving door. Science vol.279, p 1129-1131.

PEREZ, D. et E. White. 1998. E1B 19K inhibits Fas-mediated apoptosis through FADD dependent sequestration of FLICE. J.Cell.Biol. vol.141, p. 1255-1266.

PERLMAN, S. 1998. Pathogenesis of coronavirus-induced infections: Review of pathological and immunological aspects. Adv.Exp.Med.Biol. vol.440, p. 503-513.

PERLMAN, S., G. Jacobsen, A.L. Olson, et A. Afifi. 1990. Identification of the spinal cord as a major site of persistence during chronic infection with a murine coronavirus. Virology vol.175, p. 418-426.

PETERSEN, J.M., L.S. Her et J.E. Dahlberg. 2001. Multiple vesiculoviral matrix proteins inhibit both nuclear export and import. Proc.Natl.Acad.Sci USA vol.98, p. 8590-8595.

PETERSEN, J.M., L.S. Her, V. Varvel, E. Lund, and J.E. Dahlberg. 2000. The matrix protein of vesicular stomatitis virus inhibits nucleocytoplasmic transport when it is in the nucleus and associated with nuclear pore complexes. Mol.Cell.Biol. vol.20, p. 8590-8601.

PINTI, M., M. Nasi, L. Moretti, C. Mussini, D. Petrusca, R. Esposito, et A. Cossarizza. 2000. Quantitation of CD95 and CD95L mRNA expression in chronic and acute HIV-1 infection by competitive RT-PCR. Ann.N.Y.Acad.Sci. vol.926, p. 46-51.

PLAKHOV, I. V., E.E. Arlund, C. Aoki et C.S. Reiss. 1995. The earliest events in vesicular stomatitis virus infection of the murine olfactory neuroepithelium and entry of the central nervous system. Virology vol.209, p. 257-262.

POSER, C.M. 1993. The pathogenesis of multiple sclerosis. Additional considerations. J.Neurol.Sci. vol.115, suppl. p. S3-S15.

POTTER, D.A., J.S. Tirnauer, R. Janssen, D.E. Croall, C.N. Hughes, K.A. Fiacco, J.W. Mier, M. Maki, et I.M. Herman. 1998. Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. J.Cell.Biol. vol.141, p. 647-662.

PREBLE, O.T. et J.S. Youngner. 1975. Temperature sensitive viruses and the etiology of chronic and inapparent infections. J.Infect.Dis. vol.131, p. 467-473.

- PUHLMANN, M., C.K. Brown, M. Gnant, J. Huang, S.K. Libutti, H.R. Alexander, et D.L. Bartlett. 2000. Vaccinia as a vector for tumor-directed gene therapy : biodistribution of a thymidine kinase-deleted mutant. Cancer Gene Ther. vol.7, p. 66-73.
- QUERIDO, E., R.C. Marcellus, A. Lai, R. Charbonneau, J.G. Teodoro, G. Ketner, et P.E. Branton. 1997. Regulation of p53 levels by the E1B 55-kilodalton protein and E4orf6 in adenovirus-infected cells. J.Virol. vol.71, p. 3788-3798.
- QUIROZ, E., N. Moreno, P.H. Peralta, et R.B. Tesh. 1988. A human case of encephalitis associated with Vesicular stomatitis virus (Indiana serotype) infection. Am.J.Trop.Med.Hyg. vol.39, p. 312-314.
- RABINOWITZ, S.G., M.C. DalCanto et T.C. Johnson. 1976. Comparison of central nervous system disease produced by wild-type and temperature-sensitive mutants of vesicular stomatitis virus. Infect.Immun. Vol.13, p. 1242-1249.
- RAHMANI, Z., K.-W. Huh, R. Lasher, et A. Siddiqui. 2000. Hepatitis B virus X protein colocalizes to mitochondria with a human voltage-dependent anion channel, HVDAC3, and alters its transmembrane potential. J.Virol. vol.74, p. 2840-2846.
- RAM, Z., K.W. Culver, E.M. Oshiro, J.J. Viola, H.L DeVroom, E. Otto, Z. Long, Y. Chiang, G.J. McGarrity, L.M. Muul, D. Katz, M Blaese, et E.H. Oldfield. 1997. Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells. Nat.Med. vol.3, p. 1354-1361.
- RAMI, A., R. Agarwal, G. Botez, et J. Winckler. 2000. m-calpain activation, DNA fragmentation, and synergistic effects of caspase and calpain inhibitors in protecting hippocampal neurons from ischemic damage. Brain Res. vol.866, p. 299-312.
- RAMSEUR, J. et R.M. Friedman. 1977. Prolonged infection of interferon-treated cells by vesicular stomatitis virus : possible role of temperature-sensitive mutants and interferon. J.Gen.Virol. vol.37, p. 523-533.
- RAVAGNAN, L., T. Roumier, et G. Kroemer. 2002. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. J.Cell. Physiol. vol.192, p. 131-137.
- RAY, R.B., K. Meyer, R. Steele, A. Shrivastava, B.B. Aggarwal, et R. Ray. 1998. Inhibition of tumor necrosis factor (TNF-alpha)-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. J.Biol.Chem. vol.273, p. 2256-2259.
- REDWINE, J.M., M.J. Buchmeier, et C.F. Evans. 2001. In vivo expression of major histocompatibility complex molecules on oligodendrocytes and neurons during viral infection. Am.J.Pathol. vol.159, p. 1219-1224.

REICHARD, K.W., R.M. Lorence, C.J. Cascino, M.E. Peeples, R.J. Walter, M.B. Fernando, H.M. Reyes, et J.A. Greager. 1992. Newcastle disease virus selectively kills human tumor cells. J.Surg.Res. vol.52, p. 448-453.

REIF, J.S., P.A. Webb, T.P. Monath, J.K. Emerson, J.D. Poland, G.E. Kemp, et G. Cholas. 1987. Epizootic vesicular stomatitis virus in Colorado, 1982: Infection in occupational risk groups. Am.J.Trop.Med.Hyg. vol.36, p. 177-182.

REN, Y., R.L. Silverstein, J. Allen, et J. Savill. 1995. CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. J.Exp.Med. vol.181, p. 1857-1862.

RICHARDSON-BURNS, S.M., D.J. Kominsky, et K.L. Tyler. 2002. Reovirus-induced neuronal apoptosis is mediated by caspase 3 and is associated with the activation of death receptors. J.Neurovirol. vol.8, p. 365-380.

RIGAULT, K.D., D.E. Birk et J. Lenard. 1991. Intracellular distribution of input vesicular stomatitis virus proteins after uncoating. J.Virol. vol.65, p. 2622-2628.

RING, C.J.A. 2002. Cytolytic viruses as potential anti-cancer agents. J.Gen.Virol. vol.83, p. 491-502.

RIVAS, C., J. Gil, Z. Melkova, M. Esteban, et M. Diaz-Guerra. 1998. Vaccinia virus E3L protein is an inhibitor of the interferon (ifn)- induced 2-5A synthetase enzyme. Virology vol.243, p. 406-414.

RIVEST, S. 2001. How circulating cytokines trigger the neural circuits that control the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Psychoneuroendocrinology vol.26, p. 761-788.

RIVEST, S., S. Lacroix, L. Vallières, S. Nadeau, J. Zhang, et N. Laflamme. 2000. How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. vol.223, p. 22-38.

RONCO, L.V., A.Y. Karpova, M. Vidal, et P.M. Howley. 1998. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. Genes Dev. vol.12, p. 2061-2072.

ROSE, J.W., K.E. Hilly, Y. Wada, C.I. Kurtz, I. Tsunoda, R.S. Fujinami, et A.H. Cross. 1998. Nitric oxide synthase inhibitor, aminoguanidine, reduces inflammation and demyelination produced by Theiler's virus infection. J.Neuroimmunol. vol.81, p. 82-89.

ROSE, J.K. et M.A. Whitt. 2001. *Rhabdoviridae* : The viruses and their replication. *In Fundamental Virology* Fourth edition. *Editors: D.M. Knipe, P.M Howley et al.* Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. Chap. 22, pp.665-688.

- ROTT, O., S. Herzog et E. Cash. 1994. Autoimmunity caused by host cell protein-containing viruses. Med.Microbiol.Immun. Vol.183, p. 195-204.
- ROUCOU, X. et J.-C. Martinou. 2001. Conformational change of Bax: A question of life or death. Cell.Death.Differ. vol.8, p. 875-877.
- ROULSTON, A., R.C. Marcellus, et P.E. Branton. 1999. Viruses and apoptosis. Ann. Rev. Microbiol. vol.53, p. 577-628.
- RUIZ-JARABO, C.M., A. Arias, E. Baranowski, C. Escarmis, et E. Domingo. 2000. Memory in viral quasispecies. J.Virol. vol.74, p. 3543-3547.
- RUSSELL, S.J. 2002. RNA viruses as virotherapy agents. Cancer Gene Ther. vol.9, p. 961-966.
- SABIN, A.B. 1959. Reoviruses : A new group of respiratory and enteric viruses formerly classified as ECHO type 10 is described. Science vol.130, p. 1387-1389.
- SAMUEL, C.E. 2001. Antiviral actions of interferons. Clin.Microbiol.Rev. vol. 14, p. 778-809.
- SANTEL, A. et M.T. Fuller. 2001. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. J.Cell Sci. vol.114, p. 867-874.
- SARAIVA, M. et A. Alcami. 2001. CrmE, a novel soluble tumor necrosis factor receptor encoded by poxviruses. J.Virol. vol.75, p. 226-233.
- SARID, R., T. Ben-Moshe, G. Kazimirski, S. Weisberg, E. Appel, D. Kobiler, S. Lustig, et C. Brodie. 2001. VFLIP protects PC-12 cells from apoptosis induced by Sindbis virus: implications for the role of TNF-alpha. Cell.Death.Differ. vol.8, p. 1224-1231.
- SARTORIUS, U., I. Schmitz, et P.H. Krammer. 2001. Molecular Mechanisms of Death-receptor-mediated apoptosis. Chembiochem vol.2, p. 21-29.
- SCALLAN, M.F., T.E. Allsopp et J.K. Fazakerley. 1997. Bcl-2 acts early to restrict Semliki Forest Virus replication and delays virus-induced programmed cell death. J.Virol. vol.71, p. 1583-1590.
- SCHEFFNER, M., B.A. Werness, A.J. Levine, et P.M. Howley. 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. Cell vol.63, p. 1129-1136.
- SCHNEIDER-SCHAULIES, J., S. Niewiesk, S. Schneider-Schaulies, et V. ter Meulen. 1999. Measles virus in the CNS: the role of viral and host factors for the establishment and maintenance of a persistent infection. J.Neurovirol. vol.5, p. 613-622.

SCHNEIDER-SCHAULIES, S. et V. ter Meulen. 1999. Pathogenic aspects of measles virus infections. Arch.Virol.Suppl. vol.15, p. 139-158.

SCHREIBER, M., K. Rajarathnam, et G. McFadden. 1996. Myxomavirus T2 protein, a tumor necrosis factor (TNF) receptor homolog, is secreted as a monomer and dimer that each bind rabbit TNFalpha, but the dimer is a more potent TNF inhibitor. J.Biol.Chem. vol.271, p. 13333-13341.

SCHWARTZ, O., V. Marechal, S. Le Gall, F. Lemonnier, et J.M. Heard. 1996. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. Nat.Med. vol.2, p. 338-342.

SCHWARZ, E.M., C. Badorff, T.S. Hiura, R. Wessely, A. Badorff, I.M. Verma, et K.U. Knowlton. 1998. NF-kB-mediated inhibition of apoptosis is required for encephalomyocarditis virus virulence: a mechanism of resistance in p50 knockout mice. J.Virol. vol.72, p. 5654-5660.

SCOTT, R.S., E.J. McMahon, S.M. Pop, E.A. Reap, R. Caricchio, P.L. Cohen, H.S. Earp, et G.K. Matsushima. 2001. Phagocytic and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. Nature vol.411, p. 207-211.

SESHAGIRI, S. et L.K. Miller. 1997. Baculovirus inhibitors of apoptosis (IAPs) block activation of Sf-caspase-1. Proc.Natl.Acad.Sci.USA vol.94, p. 13606-13611.

SHAND, N., F. Weber, L. Mariani, M. Bernstein, A. Gianella-Borradori, Z. Long, A.G. Sorensen, et N. Barbier. 1999. A phase 1-2 clinical trial of gene therapy for recurrent glioblastoma multiforme by tumor transduction with the herpes simplex thymidine kinase gene followed by gancyclovir. GLI328 European-Canadian study group. Hum.GeneTher. vol.10, p. 2325-2335.

SHAYAKHMETOV, D.M., Z.-Y. Li, S. Ni, et A. Lieber. 2002. Targeting of adenovirus vectors to tumor cells does not enable efficient transduction of breast cancer metastases. Cancer Res. vol.62, p. 1063-1068.

SHEPPARD, R.D., C.S. Raine, M.B. Bornstein, et S.A. Udem. 1985. Measles virus matrix protein synthesized in a subacute sclerosing panencephalitis cell line. Science vol.228, p. 1219-1221.

SHIMIZU, S., T. Ide, T. Yanagida, et Y. Tsujimoto. 2000a. Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. J.Biol.Chem. vol.275, p. 12321-12325.

SHIMIZU, S., A. Konoshi, T. Kodama, et Y. Tsujimoto. 2000b. BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. Proc.Natl.Acad.Sci.USA vol.97, p. 3100-3105.

SHIMIZU, Y., K. Hasumi, Y. Okudaira, K. Yamanishi, et M. Takahashi. 1988. Immunotherapy of advanced gynecologic cancer. Cancer Detect.Prev. vol.12, p. 487-495.

SILLINS, S.L. et T.B. Sculley. 1995. Burkitt's lymphoma cells are resistant to programmed cell death in the presence of the Epstein-Barr virus latent antigen EBNA-4. Int J Cancer vol.60, p. 65-72.

SKALETSKAYA, A., L.M. Bartle, T. Chittenden, A.L. McCormick, E.S. Mocarski, et V.S. Goldmacher. 2001. A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. Proc.Natl.Acad.Sci.USA vol.98, p. 7829-7834.

SMITH, V.P., N.A. Bryant, et A. Alcami. 2000. Ectromelia, vaccinia and cowpox viruses encode secreted interleukin-18-binding proteins. J.Gen.Virol. vol.81, p. 1223-1230.

SMITH, R., R.J. Huebner, W.P. Rowe, W.E. Schatten, et L.B. Thomas. 1956. Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. Cancer vol.9, p. 1211-1218.

SMYTH, M.J., J.M. Kelly, V.R. Sutton, J.E. Davis, K.A. Browne, T.J. Sayers, et J.A. Trapani. 2001. Unlocking the secrets of cytotoxic granule proteins. J.Leukoc.Biol. vol.70, p. 18-29.

SOZZANI, S., W. Luini, G. Bianchi, P. Allavena, T.N. Wells, M. Napolitano, G. Bernardini, A. Vecchi, D. D'Ambrosio, D. Mazzeo, F. Sinigaglia, A. Santoni, E. Maggi, S. Romagnani, et A. Mantovani. 1998. The viral chemokine macrophage inflammatory protein-II is a selective Th2 chemoattractant. Blood vol.92, p. 4036-4039.

SPENCER, J.V., .M. Lockridge, P.A. Barry, G. Lin, M Tsang, M.E. Penfold, et T.J. Schall. 2002. Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus-encoded interleukin-10. J.Virol. vol.76, p. 1285-1292.

SPERANDIO, S., I. de Belle et D.E. Bredesen. 2000. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. Proc.Natl.Acad.Sci.USA vol. 97, p. 14376-14381.

SPRIGGS, M.K. 1996. One step ahead of the game: viral immunomodulatory molecules. Ann.Rev.Immunol. vol.14, p. 101-130.

STANNERS, C.P. et V.J. Goldberg. 1975. On the mechanism of neurotropism of vesicular stomatitis virus in newborn hamsters. Studies with temperature-sensitive mutants. J.Gen.Virol. vol.29, p. 281-296.

STANNERS, C.P., A.J. Farmilo et V.J. Goldberg. 1975. Effects *in vitro* and *in vivo* of a mutant of vesicular stomatitis virus with attenuated cytopathogenicity. In Negative strand viruses. Editors: B.W.J. Mahy and R.D. Barry. Academic Press, London. pp. 785-798.

STANZIALE, S.F. et Y. Fong. 2003. Novel approaches to cancer therapy using oncolytic viruses. Curr.Mol.Med. vol. 3, p. 61-71.

- STETTLER, M., K. Beck, M. Vandeveld, et A. Zurbriggen. 1997. Determinants of persistence in canine distemper virus. Vet.Microbiol. vol.57, p. 83-93.
- STEWART, S.A., B. Poon, J.B. Jowett, et I.S. Chen. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces apoptosis following cell cycle arrest. J.Virol. vol.71, p. 5579-5592.
- STOHLMAN, S.A. et D.R. Hinton. 2001. Viral induced demyelination. Brain Pathol. vol.11, p. 92-106.
- STOJDL, D.F., N. Abraham, S. Knowles, R. Marius, A. Brasey, B.D. Lichty, E.G. Brown, N. Sonenberg, et J.C. Bell. 2000a. The murine double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR is required for resistance to vesicular stomatitis virus. J.Virol. vol.74, p. 9580-9585.
- STOJDL, D.F., B.D. Lichty, S. Knowles, R. Marius, H. Atkins, N. Sonenberg, et J.C. Bell. 2000b. Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. Nat.Med. vol.6, p. 821-825.
- STOKA, V., B. Turk, S.L. Schendel, T.-H. Kim, T. Cirman, S.J. Snipas, L.M. Ellerby, D. Bredesen, H. Freeze, M. Abrahamson, D. Brömme, S. Krajewski, J.C. Reed, X.-M. Yin, V. Turk, et G. Salvesen. 2001. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of Bid, not procaspases, is the most likely route. J.Biol.Chem. vol.276, p. 3149-3157.
- STRACK, P.R., Frey, M.W., Rizzo, C.J., Cordova, B., George, H.J., Meade, R., Ho, S.P., Corman, J., Tritch, R. et Korant, B.D. 1996. Apoptosis mediated by HIV protease is preceded by cleavage of Bcl-2. Proc.Natl.Acad.Sci.USA vol.93, p. 9571-9576
- STRONG, J.E., M.C. Coffey, D. Tang, P. Sabinin, et P.W. Lee. 1998. The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signalling pathway by reovirus. EMBO.J. vol.17, p. 3351-3362.
- STURZL, M., C. Hohenadl, C. Zietz, E. Castanos-Velez, A. Wunderlich, G. Ascherl, P. Biberfeld, P. Monini, P.J. Browning, et B. Ensoli. 1999. Expression of K13/v-FLIP gene of human herpesvirus 8 and apoptosis in Kaposi's sarcoma spindle cells. J.Natl.Cancer Inst. vol.91, p. 1725-1733.
- SUNDARARAJAN, R. et E. White. 2001. E1B 19K blocks Bax oligomerization and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis. J.Virol. vol.75, p. 7506-7516.
- SUR, J.-H., R. Allende et A.R. Doster. 2003. Vesicular stomatitis virus infection and neuropathogenesis in the murine model are associated with apoptosis. Vet.Pathol. vol.40, p. 512-520.
- SUZUKI, K., J. Fueyo, V. Krasnykh, P.N. Reynolds, D.T. Curiel, et R.A. Alemany. 2001. Conditionally replicative adenovirus with enhanced infectivity shows improved oncolytic potency. Clin.Cancer Res. vol.7, p. 120-126.

SYMONS, J.A., A. Alcami, et G.L. Smith. 1995. Vaccinia virus encodes a soluble type 1 interferon receptor of novel structure and broad species specificity Cell vol.81 p. 551-560.

TAFANI, M., J.A. Cohn, N.O. Karpnich, R.J. Rothman, M.A. Russo, et J.L. Farber. 2002. Regulation of intracellular pH mediates Bax activation in HeLa cells treated with staurosporine or tumor necrosis factor- α . J.Biol.Chem. vol.277, p. 49569-49576.

TAKIZAWA, T., K. Ohashi et Y. Nakanishi. 1996. Possible involvement of double-stranded RNA-activated protein kinase in cell death by Influenza virus infection. J.Virol. vol.70, p. 8128-8132.

TALBOT, P.J., D. Arnold et J.P. Antel. 2001. Virus-induced autoimmune reactions in the CNS. Curr.Top.Microbiol.Immunol. vol.253, p. 247-271.

TALBOT, P. 1995. Implication des virus dans la sclérose en plaques. Médecine/Sciences vol.11, p. 837-843.

TANAKA, N., M. Sato, M.S. Lamphier, H. Nozawa, E. Oda, S. Noguchi, R.D. Schreiber, Y. Tsujimoto, et T. Taniguchi. 1998. Type 1 interferons are essential mediators of apoptotic death in virally infected cells. Genes Cells vol.3, p. 29-37.

TANG, G., J. Yang, Y. Minemoto, et A. Lin. 2001. Blocking caspase-3-mediated proteolysis of IKK β suppresses TNF- α -induced apoptosis. Mol.Cell vol.8, p. 1005-1016.

TAYLOR, D.R., S.T. Shi, P.R. Romano, G.N. Barber, et M.M. Lai. 1999. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. Science vol.285, p. 107-110.

TEODORO, J.G. et P.E. Branton. 1997a. Regulation of apoptosis by viral gene products. J.Virol. vol.71, p. 1739-1746.

TEODORO, J.G. et P.E. Branton. 1997b. Regulation of p53-dependent apoptosis, transcriptional repression, and cell transformation by phosphorylation of the 55-kilodalton E1B protein of human adenovirus type 5. J.Virol. vol.71, p. 3620-3627.

TESH, R.B., J.S. Boshell, G.B. Modi, A.A. Morales, D.G. Young, A.A. Corredor, C. Ferro de Carrasquilla, C. de Rodriguez, L.L. Waters, et M.O. Gaitan. 1987. Natural infection of humans, animals and phlebotomine sand flies with the alagoas serotype of vesicular stomatitis virus in Colombia. Am.J.Trop.Med.Hyg. vol.36, p. 653-661.

TEWARI, M., W.G. Telford, R.A. Miller, et V.M. Dixit. 1995. CrmA, a poxvirus-encoded serpin, inhibits cytotoxic T-lymphocyte-mediated apoptosis. J.Biol.Chem. vol.270, p. 22705-22708.

THORNBERRY, N.A., T.A. Rano, E.P. Peterson, D.M. Rasper, T. Timkey, M. Garcia-Calvo, V.M. Houtzager, P.A. Nordstrom, S. Roy, J.P. Vaillancourt, K.T. Chapman, et D.W. Nicholson. 1997. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. J.Biol.Chem. vol.272, p. 17907-17911.

TOMASSINI, B. et R Testi. 2002. Mitochondria as sensors of sphingolipids. Biochimie vol.84, p. 123-129.

TOMAZIN, R., A.B. Hill, P. Jugovic, I. York, P. van Endert, H.L. Ploegh, D.W. Andrews, et D.C. Johnson. 1996. Stable binding of the herpes simplex virus ICP47 protein to the peptide binding site of TAP. EMBO J. vol.15, p. 3256-3266.

TOMPKINS, S.M., K.G. Fuller et S.D. Miller. 2002. Theiler's virus-mediated autoimmunity. Local presentation of CNS antigens and epitope spreading. Ann.N.Y.Acad.Sci. vol.958, p. 26-38.

TRAPANI, J.A. et M.J. Smyth. 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. Nat.Rev Immunol. vol.2, p. 735-747.

TSUNODA, I., C.I. Kurtz et R.S. Fujinami. 1997. Apoptosis in acute and chronic central nervous system disease induced by Theiler's murine encephalomyelitis virus. Virology vol.228, p. 388-393.

TYLER, K.L. et N. Nathanson. 2001. Pathogenesis of viral infections. In Fundamental Virology Fourth edition. *Editors:* D.M. Knipe, P.M Howley *et al.* Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. Chap. 9 pp.199-243.

UBOL, S., C. Sukwattanapan et P. Utaisincharoen. 1998. Rabies virus replication induces Bax-related, caspase dependent apoptosis in mouse neuroblastoma cells. Virus Res. vol.56, p. 207-215.

UBOL, S., P.C. Tucker, D.E. Griffin, et J.M. Hardwick. 1994. Neurovirulent strains of Alphavirus induce apoptosis in bcl-2-expressing cells: role of a single amino acid change in the E2 glycoprotein. Proc.Natl.Acad.Sci.USA vol.91, p. 5202-5206.

UPTON, C., K. Mossman et G. McFadden. 1992. Encoding of a homolog of IFN- γ receptor by myxoma virus. Science vol.258, p. 1369-1372.

UPTON, C., J.L. Macen, M. Shreiber, et G. McFadden. 1991. Myxoma virus expresses a secreted protein with homology to the tumor necrosis factor receptor gene family that contributes to viral virulence. Virology vol. 184, p. 370-382.

VAN EYLL, O. et T. Michiels. 2000. Influence of the Theiler's virus L* protein on macrophage infection, viral persistence, and neurovirulence. J.Virol. vol.74, p. 9071-9077.

VANDER HEIDEN, M.G., X.X. Li, E. Gottlieb, R.B. Hill, C.B. Thomson, et M. Colombini. 2001. Bcl-XL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. J.Biol.Chem. vol.276, p. 19414-19419.

VAUX, D.L. et S.J. Korsmeyer. 1999. Cell death in development. Cell vol.96, p. 245-254.

VOGELSTEIN, B., D. Lane et A.J. Levine. 2000. Surfing the p53 network. Nature vol.16, p. 307-310.

VON HAEFEN, C., T. Wieder, B. Gillissen, L. Stärck, V. Graupner, B. Dörken, et P.T. Daniel. 2002. Ceramide induces mitochondrial activation and apoptosis via a Bax-dependent pathway in human carcinoma cells. Oncogene vol.21, p. 4009-4019.

VON KOBBE, C., J.M. van Deursen, J.P. Rodrigues, D. Sitterlin, A. Bachi, X. Wu, M. Wilm, M. Carmo-Fonseca, et E. Izaurralde. 2000. Vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits host cell gene expression by targeting the nucleoporin Nup98. Mol.Cell vol.6, p. 1243-1252.

WAGNER, R.R. 1991. Rhabdoviridae and their Replication *In* Fundamental Virology. Second edition. *Editors:* B.N. Fields, D.M. Knipe *et al.* Raven Press Ltd, New York. chap 19, pp.489-503.

WAGNER, R.R. 1987. The Rhabdoviruses, an overview. *In* The Rhabdoviruses *Editor* R.R. Wagner, Plenum Press, New York. 544 p.

WANG, K.K.W. 2000. Calpain and caspase: can you tell the difference. Trends Neurosci. vol.23, p. 20-26.

WANG, K.K., R. Posmantur, R. Nadimpali, R. Nath, P. Mohan, R.A. Nixon, R.V. Talanian, M. Keegan, L. Herzog, et H. Allen. 1998. Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. Arch.Biochem.Biophys. vol.356, p. 187-196.

WANG, X.W.,M.K. Gibson, W. Vermeulen, H. Yeh, K. Forrester, H.W. Sturzbecher, J.H. Hoeijmakers, et C.C. Harris. 1995. Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene. Cancer Res. vol.55, p. 6012-6016.

WEBSTER, J.I., L. Tonelli, et E.M. Sternberg. 2002. Neuroendocrine regulation of immunity. Annu.Rev.Immunol. vol.20, p. 125-163.

WECK, P.K. et R.R. Wagner. 1979. Transcription of vesicular stomatitis virus is required to shut off cellular RNA synthesis. J.Virol. vol.30, p. 410-413.

WECK, P.K., A.R. Carroll, D.M. Shattuck, et R.R. Wagner. 1979. Use of UV irradiation to identify the genetic information of vesicular stomatitis virus responsible for shutting off cellular RNA synthesis. J.Virol. vol.30, p. 746-753.

WEINER, L.P. 1973. Pathogenesis of demyelination induced by a mouse hepatitis. Arch.Neurol. Vol.28, p. 298-303.

WESTENDORP, M.O., V.A. Shatrov, K. Schulze-Osthoff, R. Frank, M. Kraft, M. Los, P.H. Krammer, W. Droge, et V. Lehmann. 1995. HIV-1 Tat potentiates TNF-induced NF-kappa B activation and cytotoxicity by altering the cellular redox state. EMBO J. vol.14, p. 546-554.

WHELAN, S. et G.W. Wertz. 1999a. Regulation of RNA synthesis by the genomic termini of vesicular stomatitis virus: Identification of distinct sequences essential for transcription but not replication. J.Virol. vol.73, p. 297-306.

WHELAN, S. et G.W. Wertz. 1999b. The 5' terminal trailer region of vesicular stomatitis virus contains a position-dependent cis-acting signal for assembly of RNA into infectious particles. J.Virol. vol.73, p. 307-315.

WHITTEN, T.M., A.T. Quets et R.H. Schloemer. 1991. Identification of the hepatitis B virus factor that inhibits expression of the beta interferon gene. Virology vol.65, p. 4699-4704.

WHITTON, J.L. et M.B.A. Oldstone. 2001. The immune response to viruses. *In* Fundamental Virology Fourth edition. *Editors:* D.M. Knipe, P.M Howley *et al.* Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. Chap. 11 pp.285-320.

WIEDER, T., F. Essmann, A. Prokop, K. Schmelz, K. Schulze-Osthoff, R. Beyaert, B. Dorken, et P.T. Daniel. 2001. Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3. Blood vol.97, p. 1378-1387.

WILCOX, M.E., W. Yang, D. Senger, N.B. Rewcastle, D.G. Morris, P.M. Brasher, Z.Q. Shi, R.N. Johnston, S. Nishikawa, P.W. Lee, et P.A. Forsyth. 2001. Reovirus as an oncolytic agent against experimental human malignant gliomas. J.Natl.Cancer Inst. vol.93, p. 903-912.

WOOD, D.E. et E. W. Newcomb. 2000. Cleavage of Bax enhances its cell death function. Exp.Cell Res. vol. 256, p.375-382.

WOOD, D.E., A. Thomas, L.A. Devi, Y. Berman, R.C. Beavis, J.C. Reed et E.W. Newcomb. 1998. Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. Oncogene. vol.17, p. 1069-1078.

WU, G.F., A.A. Dandekar, L. Pewe, et S. Perlman. 2000. CD4 and CD8 T cells have redundant but not identical roles in virus-induced demyelination. J. Immunol. vol.165, p. 2278-2286.

WU, G.F. et S. Perlman. 1999. Macrophage infiltration, but not apoptosis, is correlated with immune-mediated demyelination following murine infection with a neurotropic coronavirus. J.Virol. vol.73, p. 8771-8780.

WYLLIE, A.H., J.F. Kerr et A.R. Currie. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. Int.Rev.Cytol. vol.68, p. 251-306.

XIAO, B.G., A. Diab, J. Zhu, P. Van Der Meide, et H. Link. 1998 Astrocytes induce hyporesponses of myelin basic protein-reactive T and B cell function. J.Neuroimmunol. Vol.89, p. 113-121.

XU, X., P. Nash et G. McFadden. 2000. Myxoma virus expresses a TNF receptor homolog with two distinct functions. Virus Genes vol.21, p. 97-109.

YAMAGUCHI, H. et H.-G. Wang. 2001. The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. Oncogene vol.20, p. 7779-7786.

YAMASHIMA, T. 2000. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. Prog.Neurobiol. vol.62, p. 273-295.

YE, Z., W. Sun, K. Suryanarayana, P. Justice, D. Robinson, et R.R. Wagner. 1994. Membrane-binding domains and cytopathogenesis of the matrix protein of vesicular stomatitis virus. J.Virol. vol.68, p. 7386-7396.

YEUNG, M.C., D.L. Chang, R.E. Camantigue, et A.S. Lau. 1999. Inhibitory role of the host apoptogenic gene PKR in the establishment of persistent infection by encephalomyocarditis virus in U937 cells. Proc.Natl.Acad.Sci.USA vol.96, p. 11860-11865.

ZAMZANI, N. et G. Kroemer. 2003. Apoptosis; Mitochondrial membrane permeabilization-The (w)hole story. Curr.Biol. vol.13, p. R71-R73.

ZAULI, G., D. Gibellini, D. Milani, M. Mazzoni, P. Borgatti, M. La Placa, et S. Capitani. 1993. Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein protects lymphoid, epithelial, and neuronal cell lines from death by apoptosis. Cancer Res. vol.53, p. 4481-4485.

ZENG, J., P. Fournier et V. Schirmacher. 2002. Induction of interferon-alpha and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human blood mononuclear cells by hemagglutinin-neuraminidase but not F protein of Newcastle disease virus. Virology vol.297, p. 19-30.

ZHOU, G. et B. Roizman. 2000. Wild-type herpes simplex virus 1 blocks programmed cell death and release of cytochrome C but not the translocation of mitochondrial apoptosis-inducing factor to the nuclei of human embryonic lung fibroblasts. J.Virol. vol.74, p. 9048-9053.

ZHOU, Q., J.F. Krebs, S.J. Snipas, A. Price, E.S. Alnemri, K.J. Tomaselli, et G.S. Salvesen. 1998. Interaction of the baculovirus anti-apoptotic protein p35 with caspases. Specificity, kinetics, and characterization of the caspase/p35 complex. Biochemistry vol.37, p. 10757-10765.

ZHU, N, C.F. Ware et M.M. Lai. 2001. Hepatitis C virus core protein enhances FADD-mediated apoptosis and suppresses TRADD signaling of tumor necrosis factor receptor. Virology vol.283, p. 178-187.

ZHU, N., A. Khoshnan, R. Schneider, M. Matsumoto, G. Dennert, C. Ware, et M.M. Lai. 1998. Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. J.Virol. vol.72, p. 3691-3697.

ZHU, H., Y. Shen et T. Shen. 1995. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. J.Virol. vol.69, p. 7960-7970.

ANNEXE

Les pages qui suivent présentent une copie de l'article présenté au chapitre II du présent document ainsi qu'une copie de l'article *Different host-cell/ shutoff strategies related to the matrix protein lead to persistence of vesicular stomatitis virus mutants on fibroblast cells*, issu du travail réalisé au cours de ma maîtrise et paru dans *Virus Research*, vol.76, p. 87-102. Ces deux copies d'article sont annexées pour que les quelques lecteurs de cette thèse puissent avoir accès à une information supplémentaire qui pourrait s'avérer pertinente pour la bonne compréhension du document.

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.