

Université de Montréal

Étude de la sensibilité à l'infection de lignées cancéreuses humaines par différents
isolats de réovirus

Par

Sapha Barkati

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade
Maître ès science (M.sc.) en microbiologie et immunologie

Février, 2005

©, Sapha Barkati, 2005



W
4
US8
2006
v164

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Étude de la sensibilité à l'infection de lignées cancéreuses humaines par différents
isolats de réovirus

Présenté par :
Sapha Barkati

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

François Coutlée

.....
Président-rapporteur

Bernard Massie

.....
Membre du jury

Guy Lemay

.....
Directeur de recherche

Mémoire accepté le :

À mes chers parents
Avec tout mon amour

Résumé

Les réovirus de mammifères, à pathogénicité limitée chez l'être humain, ont une forte capacité à se répliquer chez les cellules transformées. En effet, la transformation cellulaire par l'oncogène *ras*, ou tout autre élément de cette voie de signalisation, inhibe la protéine kinase cellulaire ARN db dépendante (PKR) et permet la réplication du réovirus. D'autre part, la décapsidation du virus est grandement dépendante des cystéines protéases dont l'expression et l'activité sont fortement augmentées à l'intérieur des cellules cancéreuses avec une voie de signalisation de Ras activée. La sensibilité de ces cellules à l'infection pourrait découler non seulement de l'inhibition de l'activité antivirale de la PKR, inductible à l'interféron, mais aussi d'une augmentation de l'expression et de l'activité des protéases. Notons que plus de 50% des cancers présentent une voie de signalisation de Ras activée. Les études que nous avons effectuées chez des cellules fibroblastiques (NIH-3T3) de souris transformées ou non par l'oncogène *H-ras* démontrent que la décapsidation virale est effectivement plus efficace chez les cellules NIH-Ras que chez les cellules parentales. La deuxième partie de cette étude a permis d'examiner les déterminants de sensibilité potentiels à l'infection par le réovirus chez des lignées cellulaires cancéreuses humaines en comparant un réovirus de type sauvage (H8-2), un réovirus hypersensible à l'interféron (P4L-12) et un réovirus sélectionné pour une décapsidation plus efficace (PI3-1). Les lignées cellulaires cancéreuses présentent différents profils de sensibilité à l'infection par chacun des trois isolats de réovirus. La synthèse des protéines virales, l'efficacité d'infection et la capacité à tuer les différentes lignées cellulaires cancéreuses infectées furent établies pour chacun des isolats. De plus, il apparaît que les deux souches de virus mutants sont plus fortement restreintes que la souche sauvage dans leur réplication au sein de cellules mononucléaires du sang périphérique. Globalement, cette étude descriptive suggère que nous pourrions éventuellement être capable de déterminer laquelle des souches virales permettra d'offrir un traitement optimal pour un cancer donné.

Mots clé : Réovirus, Ras, PKR, Interféron, Cystéines protéases, Décapsidation Oncolyse, Cancer

Abstract

Mammalian reoviruses are known for their limited pathogenicity in humans and have been demonstrated to have oncolytic properties. Cellular transformation by *ras* oncogene as well as upstream or downstream elements of Ras signalling pathway inhibits PKR, a dsRNA-dependent protein kinase, which then allows reovirus replication. Furthermore, reovirus disassembly is highly dependent on cysteine proteases which are overexpressed and overactivated in a large panel of human cancers with activated Ras pathway. It could be considered that susceptibility of cancer cells with an activated Ras pathway is not only attributable to inhibition of antiviral activity of interferon-inducible PKR, but can also be a result of overexpression and overactivation of cysteine proteases. A significantly high percentage of cancers, over 50%, show an activated Ras pathway. Our studies demonstrated that reovirus disassembly occurs with enhanced kinetics when mouse fibroblasts, NIH-3T3, are transformed with H-*ras* oncogene. In the second part of the study, we evaluated the potential determinants of susceptibility of different cancer cell lines to reovirus infection using three different isolates: a wild type reovirus (H8-2), an interferon-hypersensitive mutant (P4L-12) and a mutant reovirus that demonstrate enhanced kinetics of viral disassembly (PI3-1). These results indicate that cancer cell lines exhibit different pattern of susceptibility to these three reovirus isolates. Synthesis and accumulation of viral protein, infection efficiency and ability to kill infected cells were established for all three isolates. Moreover, it appears that the two reovirus mutants are considerably more restricted in their replication in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) than wild type reovirus. Overall, this study suggests by its descriptive nature that we could eventually be able to determinate the optimal reovirus isolates that will offer the better treatment for any given cancer.

Key words: Reovirus, Ras, PKR, Interferon, Cysteine protease, Viral disassembly, Oncolysis, Cancer

Table des matières

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES FIGURES	X
LISTE DES TABLEAUX	XII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIII
REMERCIEMENTS	XVI
CHAPITRE 1 – INTRODUCTION	1
1.1 Réovirus et réplication virale	3
1.1.1 Classification	3
1.1.2 Génome, nomenclature et protéines	4
1.1.2.1 Protéines structurales	7
1.1.2.2 protéines non-structurales	13
1.1.3 Éléments structuraux du réovirus	15
1.1.4 Cycle de réplication du réovirus	17
1.1.4.1 Adsorption, entrée et décapsidation	17
1.1.4.2 Transcription précoce des segments du génome	19
1.1.4.3 Synthèse des protéines virales et formation d'un complexe précoce	20
1.1.4.4 Réplication et transcription tardive	21
1.1.4.5 Assemblage.....	21
1.1.4.6 Relâche du virion mature.....	22
1.1.5 La persistance	23
1.2 Réovirus, PKR et Interféron	25
1.2.1 Structure et fonction de PKR.....	25
1.2.2 Induction et activation de PKR.....	26
1.2.3 Inhibition de eIF-2 α par PKR.....	28
1.2.4 Interféron	29
1.2.4.1 Gène et protéine.....	29
1.2.4.2 Induction.....	30
1.2.4.3 Mécanisme d'action.....	31
1.2.4.4 Rôle comme agent anti-viral.....	31
1.2.5 Virus modulant l'activité de PKR	33
1.2.6 Modulation de PKR par la protéine $\sigma 3$ du réovirus	34
1.2.7 Réovirus et sensibilité à l'interféron.....	35
1.2.7.1 Hypersensibilité à l'interféron et souche P4L-12	36

1.2.7.2 Résistance à l'interféron et souche ts453	37
1.3 Réovirus, un agent oncolytique naturel	37
1.3.1 La protéine Ras : structure et fonction.....	38
1.3.2 Voie de signalisation de Ras.....	40
1.3.3 Ras, cancers humains et réovirus.....	43
1.4 Les cathepsines et les réovirus	46
1.4.1 Les cystéines protéases.....	48
1.4.2 Cathepsines, mutation dans <i>ras</i> et cancer	48
1.5 Projet de recherche	50
CHAPITRE 2 – MATÉRIEL ET MÉTHODES	51
2.1 Virus et cellules.....	52
2.1.1 Virus	52
2.1.1.1 Réovirus sérotype 3 (Dearing).....	52
2.1.1.2 P4L-12	52
2.1.1.3 H8-2.....	52
2.1.1.4 PI 3-1	52
2.1.2 Cellules.....	53
2.1.2.1 Cellules L929.....	54
2.1.2.2 Cellules NIH-3T3 parentales et transformées.....	54
2.1.2.3 Cellules A-498.....	54
2.1.2.4 Cellules COLO 205	55
2.1.2.5 Cellules MCF-7	55
2.1.2.6 Cellules MOLT-4	55
2.1.2.7 Cellules NCI-H23	56
2.1.2.8 Cellules NIH :OVCA-3.....	56
2.1.2.9 Cellules PC3	56
2.1.2.10 Cellules SF-268	57
2.1.2.11 Cellules SK-MEL-2	57
2.1.2.12 Cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC).....	57
2.2 Protéolyse de la capsid externe du réovirus durant son entrée dans la cellule chez les cellules NIH-3T3 parentales et transformées	57
2.2.1 Production du virus radioactif	58
2.2.2 Infection des cellules avec le virus radiomarqué	58
2.2.2.1 Infection et récolte des cellules.....	58
2.2.2.2 Électrophorèse sur gel de poly-acrylamide avec SDS	59
2.2.2.3 Autoradiographie	60
2.3 Sensibilité des cellules NIH-3T3 et NIH-Ras à des inhibiteurs de l'activité des protéases	60
2.3.1 Traitement des cellules au chlorure d'ammonium.....	60
2.3.2 Traitement des cellules à la chloroquine	60

2.4 Sensibilité des virus H8-2, P4L-12 et PI3-1 au E64.....	61
2.4.1 Traitement au E-64 et infection	61
2.4.2 Marquage métabolique des cellules infectées.....	61
2.5 Sensibilité des virus H8-2, P4L-12 et PI3-1 à l'interféron.....	62
2.5.1 Traitement à l'interféron et infection.....	62
2.6 Sensibilité des cellules cancéreuses à l'infection par les trois isolats de réovirus	62
2.6.1 Analyse de la synthèse et accumulation des protéines du réovirus chez ces cellules	62
2.6.1.1 Coloration des protéines au bleu de Coomassie.....	63
2.6.1.2 Transfert sur membrane de nitrocellulose.....	63
2.6.1.3 Immunobuvardage et anticorps utilisés	64
2.6.2 Détermination de la viabilité des cellules infectées.....	64
2.6.3 Analyse de l'efficacité de l'infection des cellules cancéreuses par les différents isolats de réovirus.....	65
2.6.3.1 Infection des cellules cancéreuses sur plaque de 96 puits avec différentes dilutions du virus	65
2.6.3.2 Repiquage sur plaque de cellules L929	65
2.6.3.3 Calcul du titre sur les cellules L929.....	66
2.7 Sensibilité des PBMC à l'infection par les trois isolats de réovirus	66
2.7.1 Analyse de la synthèse et accumulation des protéines virales par immunobuvardage	66
2.7.2 Observation des protéines produites dans une période de temps donnée par marquage métabolique	67
CHAPITRE 3 – RÉSULTATS.....	68
3.1 Étude de l'effet de la transformation par l'oncogène <i>ras</i> sur la machinerie endocytaire de la cellule.....	69
3.1.1 Le réovirus sérotype 3 Dearing (T3D) démontre une meilleure cinétique de décapsidation chez les cellules NIH-3T3 transformées par l'oncogène Harvey- <i>ras</i> (NIH-Ras) que chez les cellules parentales.....	69
3.1.2 Les cellules NIH-Ras présentent une sensibilité nettement plus grande à la chloroquine et au chlorure d'ammonium (agents augmentant le pH des endosomes) que les cellules parentales	71
3.2 Étude de la sensibilité des trois différents isolats de réovirus (H8-2, P4L-12 et PI3-1) au E64 et à l'interféron	74
3.2.1 Le virus PI3-1 peut se répliquer en présence de E-64 contrairement aux virus H8-2 et P4L-12	75
3.2.2 Le virus P4L-12 est hypersensible à l'interféron tandis que les virus H8-2 et PI3-1 montrent une sensibilité modérée	77
3.3 Analyse de la sensibilité des différentes lignées cellulaires cancéreuses aux trois isolats de réovirus	79
3.3.1 Caractéristiques des lignées cellulaires cancéreuses étudiées	81

3.3.2 Il existe des différences de sensibilité au réovirus entre chaque lignée cellulaire cancéreuse, mais aussi pour chaque isolat de réovirus dans une même lignée cellulaire	82
3.3.2.1 MCF-7 (adénocarcinome mammaire).....	84
3.3.2.2 NCI-H23 (adénocarcinome du poumon)	84
3.3.2.3 PC-3 (adénocarcinome de la prostate).....	85
3.3.2.4 SKMEL-2 (mélanome malin)	86
3.4 Les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) sont sensibles à l'infection par la souche H8-2, mais démontrent une résistance aux souches P4L-12 et PI3-1.....	96
CHAPITRE 4 - DISCUSSION.....	99
4.1 Introduction.....	100
4.2 La décapsulation du réovirus.....	101
4.3 Étude chez les lignées cancéreuses humaines	105
4.3.1 Cellules MCF-7 et carcinome mammaire.....	106
4.3.2 Cellules NCI-H23 et adénocarcinome du poumon	110
4.3.3 Cellules PC-3 et carcinome de la prostate	111
4.3.4 Cellules SK-MEL-2 et mélanome malin	113
4.4 Conclusion.....	114
4.5 Perspectives.....	115
RÉFÉRENCES.....	118

Liste des figures

Figure 1 Diagramme représentant la protéine $\mu 1$	11
Figure 2 : Différentes structures du réovirus et protéines associées	17
Figure 3 : Cycle de réplication du réovirus.....	22
Figure 4 : Inhibition de eIF-2 α par PKR.....	28
Figure 5 : Voie de signalisation de Ras.....	42
Figure 6 : Analyse de la décapsidation du réovirus sérotype 3 (Dearing) radiomarqué à l'intérieur des cellules L929, NIH et NIH-Ras..	71
Figure 7 : Pourcentage de survie des cellules L929, NIH et NIH-Ras traitées à différentes concentrations de chlorure d'ammonium (NH ₄ Cl) pendant une période de 48 heures..	73
Figure 8 : Pourcentage de survie des cellules L929, NIH et NIH-Ras traitées à différentes concentrations de chloroquine pendant une période de 24 heures... ..	74
Figure 9 : Effet de l'inhibiteur de cystéines protéases, E-64 sur la synthèse des protéines virales par les isolats de réovirus H8-2, P4L-12 et PI3-1.....	77
Figure 10 : Effet de l'interféron sur la synthèse des protéines virales par les isolats de réovirus H8-2, P4L-12 et PI3-1.....	79
Figure 11: Sensibilité des cellules MCF-7 à l'infection par les trois différents isolats de réovirus (H8-2, P4L-12 et PI3-1).	88
Figure 12: Sensibilité des cellules NCI-H23 à l'infection par les trois différents isolats de réovirus (H8-2, P4L-12 et PI3-1).	90
Figure 13 : Sensibilité des cellules PC-3 à l'infection par les trois différents isolats de réovirus (H8-2, P4L-12 et PI3-1).	92
Figure 14 : Sensibilité des cellules SK-MEL-2 à l'infection par les trois différents isolats de réovirus (H8-2, P4L-12 et PI3-1).	94
Figure 15 : Analyse de la synthèse et de l'accumulation des protéines virales chez les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC), suite à l'infection par les isolats de réovirus H8-2, P4L-12 et PI3-1..	97

Figure 16: Analyse de la synthèse des protéines virales chez les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC), suite à l'infection par les isolats de réovirus H8-2, P4L-12 et PI3-1 à des MOI de 10, 50 et 100.. 98

Liste des tableaux

Tableau I : Les protéines du réovirus.....	14
Tableau II : Virus modulant l'activité de PKR et mécanisme d'action	33
Tableau III : Pourcentage des types de cancer associé à un gène muté de la voie de signalisation de Ras.....	43
Tableau IV : Lignées cellulaires cancéreuses utilisées pour l'étude.....	82

Liste des abréviations

ADAR1.....	<i>dsRNA-dependent adenosine deaminase</i>
ADN.....	Acide désoxyribonucléique
ARN.....	Acide ribonucléique
ARNdb.....	ARN double brin
ARNm.....	ARN messenger
ATCC.....	<i>American type culture collection</i>
ATP.....	Adénosine triphosphate
BRV.....	<i>Baboon reovirus</i>
DICT ₅₀	Dose infectieuse en culture tissulaire 50%
DRAF1.....	<i>double strand RNA activated factor-1</i>
dsRBM.....	<i>double stranded RNA binding motif</i>
EBV.....	<i>Epstein Barr Virus</i>
EGFR.....	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
eIF-2 α	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit α</i>
eIF-2B.....	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2B</i>
eIF-4E.....	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
ERK-1 et 2.....	<i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
FITC.....	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
GAP.....	<i>GTPases-activating protein</i>
GDP.....	Guanosine diphosphate
GEF.....	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
Grb-2.....	<i>growth-factor-receptor-bound protein 2</i>
GTP.....	Guanosine triphosphate
H-Ras.....	Harvey-Ras
HER-2.....	<i>Human epidermal growth factor receptor-2</i>
HSR.....	<i>Hypersensitive region</i>
IFN.....	Interféron
IFNAR.....	<i>Interferon alpha and beta receptor 1</i>
IRF.....	<i>Interferon regulatory factor</i>

ISRE.....	<i>IFN stimulated response element</i>
ISVP.....	<i>Infectious subviral particle</i>
JAK.....	<i>Janus family of tyrosine kinase</i>
JAM-1.....	<i>Junction adhesion molecule-1</i>
KCS.....	<i>Kinase conserved sequence</i>
K-Ras.....	<i>Kirsten-Ras</i>
MAPKK.....	<i>Mitogen activated protein kinase kinase</i>
MEK-1 et 2.....	<i>Mitogen activated protein/ERK kinase</i>
MEP.....	<i>Major excreted protein</i>
MMP-2.....	<i>Matrix metalloproteinase 2</i>
MOI.....	<i>Multiplicity of infection</i>
MPR.....	<i>Mannose-6-phosphate receptor</i>
NBV.....	<i>Nelson Bay Virus</i>
NCI.....	<i>National cancer institute</i>
NFAT.....	<i>Nuclear factor of activated T cell</i>
NF- κ B.....	<i>Nuclear factor κB</i>
NK.....	<i>Natural killer</i>
NTPase.....	<i>Nucléoside triphosphatase</i>
PACT.....	<i>PKR activator</i>
PBMC.....	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS.....	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDGFR.....	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PDK-1 et 2.....	<i>3-phosphoinositide-dependent kinase-1/2</i>
PHA.....	<i>Phytohémagglutinine</i>
PI3-K.....	<i>p85-p110 phosphatidylinositol 3 kinase</i>
PKR.....	<i>Protéine kinase ARNdb dépendante</i>
RalGEF.....	<i>Ral guanine nucleotide exchange factor</i>
RIPA.....	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
SDS.....	<i>Sodium dodécylsulfate</i>
SDS-PAGE.....	<i>SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SNC.....	<i>Système nerveux central</i>

Sos.....	<i>Son of Sevenless</i>
STAT.....	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
T1L.....	Réovirus sérotype 1 Lang
T2J.....	Réovirus sérotype 2 Jones
T3A.....	Réovirus sérotype 3 Abney
T3D.....	Réovirus sérotype 3 Dearing
T4N.....	Réovirus sérotype 4 Ndelle
TBS.....	<i>Tris buffered saline</i>
TLR3.....	<i>toll-like receptor 3</i>
TRBP.....	<i>Tar binding protein</i>
UFP.....	Unité formatrice de plaque
UI.....	Unité internationale
VIH.....	Virus de l'immunodéficience humaine

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, Dr Guy Lemay pour m'avoir permis de faire ma maîtrise au sein de son laboratoire, pour sa disponibilité et pour m'avoir supporté dans mes choix.

Merci à Carole Danis pour son support technique, à Mélanie Welman, à Etienne Rouault et à Julie Binette pour leurs conseils judicieux, les longues discussions, leur support moral et leur encouragement. Merci à Nicholas Svitek, Penny Rudd et Sandra Fernandez pour leur aide précieuse. Durant ces années vous avez été pour moi beaucoup plus que des collègues de travail, mais aussi de bons amis.

Merci à mon grand ami Christian et à tous mes autres amis pour leur support et merci à mes sœurs Maroie et Amel pour leur encouragement.

Un énorme merci à mes parents qui ont toujours eu une grande confiance en moi, qui ont toujours été présents dans les bons comme dans les mauvais moments et qui m'ont toujours supporté et encouragé peu importe le chemin que je décidais de prendre.

Je désire spécialement remercier Alex pour être toujours présent à mes côtés, pour son support, son encouragement et pour les merveilleux moments que nous partageons ensemble.

Chapitre 1 – Introduction

Les premiers isolats de réovirus proviennent des voies respiratoires et gastro-intestinales et ne sont pas associés à des maladies chez l'humain [1]. En 1959, Albert Sabin, connu pour ses travaux sur le vaccin de la poliomyélite, se base sur ces observations pour lui octroyer le nom de réovirus [1]. Le préfixe réo est effectivement utilisé pour témoigner de ce fait puisqu'il s'agit d'un acronyme anglais pour orphelin (pas d'association à une maladie) respiratoire et entérique (*respiratory and enteric orphan*). Des études subséquentes, dont les fondements éthiques sont discutables démontrent que le virus est effectivement non pathogène et cause tout au plus des symptômes qui s'apparentent à un léger rhume [2]. Par ailleurs, étant donné que plus de 70% des adultes dans les pays industrialisés possèdent des anticorps contre les réovirus, il ne semble pas que l'exposition à ces virus entraîne des répercussions sur la santé [3]. Par contre, des études ont démontré récemment une corrélation possible entre les réovirus et des affections telles que la méningite [4] et l'atrésie biliaire chez l'enfant [5]. Des recherches plus avancées seront indispensables pour confirmer ces associations puisqu'elles demeurent controversées.

Malgré son intérêt clinique limité, l'étude de ce virus a permis de grandes avancées dans les domaines de la virologie et de la biologie moléculaire. Étonnamment, ces dernières années, les réovirus attirent de plus en plus l'attention dans le domaine médical non pas en tant qu'agent pathogène, mais plutôt comme agent oncolytique dans la lutte contre le cancer.

Les quelques pages qui suivent permettront de dresser un portrait des réovirus, de comprendre les bases moléculaires de son potentiel oncolytique et d'apprécier les implications thérapeutiques possibles de ce virus dans le combat contre un des pires fléaux en occident, le cancer.

1.1 Réovirus et réplication virale

1.1.1 Classification

Les réovirus font partie des *Reoviridae*, une famille de virus à ARN bicaténaire segmenté qui, contrairement aux autres familles de virus à ARN double brin est la seule connue pour infecter des mammifères. De plus, elle comprend le plus large éventail, et le plus diversifié en ce qui concerne la spécificité d'hôte comparativement au cinq autres familles de ce groupe de virus. En effet, des poissons aux oiseaux en passant par les reptiles, les insectes, les plantes et les mammifères, les *Reoviridae*, ubiquitaires à la surface de la terre, ont la capacité d'infecter un large spectre de vivants [6]. Neuf genres composent les *Reoviridae* soit les *Orthoreovirus*, *Aquavirus*, *Cypovirus*, *Fijivirus*, *Oryzavirus*, *Rotavirus*, *Orbivirus*, *Coltivirus* et les *Phytoreovirus*. Regroupés dans cette même famille sur la base de certaines similarités au niveau génétique, biologique, biochimique et structural, ces genres se différencient substantiellement les uns des autres. Le virus de la fièvre du Colorado (*Orbivirus*) et le rotavirus sont d'importants pathogènes humains retrouvés à l'intérieur de cette famille [6].

Le genre *Orthoreovirus* inclut le membre prototypique de la famille des *Reoviridae* soit les *Orthoreovirus* de mammifères non-fusogéniques. Chez un virus, la fusogénicité reflète en fait sa capacité d'amener des cellules infectées à former de larges syncytia multinuclés. C'est une propriété qui n'est pas retrouvée habituellement chez les virus non enveloppés, n'ayant pas de glycoprotéine de fusion, mais qui est quand même observée chez certains *Orthoreovirus* de mammifères, d'oiseaux et de reptiles [6]. Les *Orthoreovirus* aviaires constituent un large groupe à l'intérieur du genre *Orthoreovirus*. Par contre, ils sont bien moins caractérisés que les isolats de mammifères non-fusogéniques et, contrairement à ceux-ci, sont pour la plupart fusogéniques. Les virus de Nelson Bay (NBV) ainsi que le réovirus de babouin (BRV) constituent deux groupes phylogénétiques additionnels à l'intérieur du genre *Orthoreovirus* [7]. D'autres isolats provenant de serpents ont aussi été assignés à ce genre, des études plus poussées devront déterminer leur

appartenance ou non appartenance à l'un ou l'autre des groupes phylogénétiques déjà établis [8].

Avec l'isolement et la caractérisation d'autres virus à ARN bicaténaire, le nom réovirus qui, à l'origine, représentait en fait les *Orthoreovirus* de mammifères non-fusogéniques, a été retenu pour la famille des *Reoviridae*. Pour éviter une ambiguïté au niveau de la nomenclature, le préfixe ortho- a été ajouté au nom original pour désigner les premiers réovirus isolés. Il n'en demeure pas moins que les *Orthoreovirus* sont encore communément appelé réovirus, et il en sera de même à l'intérieur de ce texte.

Les *Orthoreovirus* de mammifères non-fusogéniques peuvent être classés en quatre sérotypes distincts, les sérotypes 1, 2 et 3 ayant été identifiés par des tests de séroneutralisation et d'inhibition d'hémagglutination [1]. On retrouve donc un réovirus isolé d'un enfant en santé et qui constitue le prototype pour le réovirus de type 1 Lang (T1L). Un isolat d'un enfant ayant la diarrhée est le prototype pour le réovirus de type 2 Jones (T2J) et les sérotypes 3 Dearing et Abney (T3D et T3A) ont été isolés respectivement à l'origine d'un enfant ayant la diarrhée et d'un autre ayant une maladie des voies respiratoires supérieures [1, 9]. Concernant le réovirus de type 4 Ndelle (T4N), il a été isolé pour la première fois au Cameroun en 1974 du foie et du cerveau d'une souris et assigné à la famille des *Reoviridae* y étant morphologiquement lié. Par la suite il a été classé à l'intérieur du genre *Orbivirus*, mais à tort puisqu'une très forte homologie de séquence protéique avec les *Orthoreovirus* de mammifères non-fusogéniques, additionné d'analyses antigéniques concluantes, le classe aujourd'hui à l'intérieur de ce genre [10].

1.1.2 Génome, nomenclature et protéines

Les réovirus de mammifères ont un génome de dix segments d'ARN bicaténaire dont la taille totale est d'environ 23,5 Kpb et le tout est contenu dans deux capsides concentriques de symétrie icosaédrique dont le diamètre, excluant la protéine σ_1 , est d'environ 85 nm [6]. La première évidence de la nature bicaténaire de l'ARN vient de la coloration de cellules infectées à l'orange d'acridine [11]. Par la

suite, les propriétés physicochimiques de l'ARN ainsi que sa résistance à la nucléase S1 viennent confirmer les résultats des études précédentes [12, 13]. Les dix segments sont divisés en trois classes de grandeur et, selon qu'ils soient longs, moyens ou courts ils seront définis en tant que segment L (*large*), M (*medium*) et S (*small*). Il y a au total trois segments L (L1, L2, L3), trois segments M (M1, M2, M3) ainsi que quatre segments S (S1, S2, S3, S4). Ces dix segments sont linéaires et ont leurs deux extrémités libres. De plus, des études d'hybridation ont démontré que chacun des dix segments est unique à l'intérieur de la capsid virale [14]. Parmi les dix segments, huit codent chacun pour une seule protéine et les deux autres pour deux protéines. La nature segmentée du génome des réovirus fait en sorte qu'il peut y avoir réassortiment des segments entre deux souches de réovirus. La capacité des souches de réovirus de s'échanger des segments a été et constitue encore un outil très utile dans l'étude des gènes impliqués dans la pathogénèse virale. En effet, le réassortiment a été démontré pour la première fois avec deux mutants thermosensibles de réovirus infectant simultanément des cellules fibroblastiques de souris, les cellules L929 [15]. Les réassortants ont par la suite été évalués pour leur infectivité à température non permissive. Si infection il y a, la mutation conférant la thermosensibilité se trouve sur deux segments différents du virus et, de la même façon, l'absence d'infection signifierait que la mutation se retrouve sur le même segment. C'est donc ainsi qu'a pu être démontré l'échange de segments entre deux souches virales infectant la même cellule, les segments d'ARN bicaténaires agissant comme des éléments génétiques distincts lors d'un réassortiment [16]. La différence dans la migration des segments suite à une électrophorèse sur gel entre deux souches virales permet la reconnaissance de l'origine des segments des réassortants.

Chaque segment des réovirus a, à son extrémité 5' du brin positif, une coiffe diméthylée tout comme celle formée sur les ARNm cellulaire par des enzymes nucléaires de la cellule [17, 18]. Dans le cas des réovirus, la coiffe est formée par des enzymes du virus à l'intérieur de la particule virale. Cette coiffe est importante pour une traduction efficace des protéines virales à partir du brin positif d'ARN puisqu'elle permet la reconnaissance par le facteur cellulaire d'initiation de la traduction eIF-4E. De plus, la coiffe permet d'augmenter la stabilité de l'ARN et de

le protéger contre les 5' exonucléases [19]. La coiffe serait de même importante au niveau de l'empaquetage de l'ARN dans les particules virales et de la synthèse du brin négatif puisque des ARN viraux non coiffés, ou dont leur coiffe possède un troisième groupement méthyle ajouté par une enzyme cellulaire, se retrouvent accumulés à l'intérieur de la cellule infectée et sont absentes des particules virales matures [20]. L'extrémité 5' du brin négatif présente quant à elle un groupement diphosphate non-bloqué. Des études ont démontré que cette extrémité est probablement bloquée par une structure non connue [18]. La présence d'une extrémité diphosphate et non triphosphate, initialement présente suite à la synthèse du brin négatif serait probablement due à une activité ARN triphosphatase phosphorylase portée à l'intérieur de la particule virale. L'extrémité 3' des ARNm viraux n'est pas terminée d'une queue polyadénylée comme le sont les ARNm cellulaire. Cette extrémité poly-A promouvoit la transcription des ARNm cellulaires et permet une plus grande stabilité. Les ARNm viraux doivent donc forcément utiliser des stratégies alternatives pour monopoliser la machinerie cellulaire de traduction [6].

Comme il a été mentionné ci-haut, douze protéines sont codées par le réovirus. Parmi tous ces produits de traduction, huit protéines ($\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 3$, $\mu 1$, $\mu 2$, $\sigma 1$, $\sigma 2$ et $\sigma 3$) sont structurales, c'est-à-dire constituant la particule virale mature, et quatre (μNS , μNSC , σNS et $\sigma 1s$) sont non-structurales et jouent donc probablement un rôle durant les étapes intracellulaires de réplication. La nomenclature des protéines suit de près celle des segments en ce sens qu'elles sont définies par une lettre, mais cette fois grecque, représentant leur échelle de grandeur soit λ pour *large*, μ pour *medium* et σ pour *small* suivie d'un nombre représentant souvent leur migration relative sur gel électrophorétique. Comme la numérotation des segments et des protéines a été effectuée de façon indépendante, un segment donné ne correspond pas toujours à la protéine codée par ce dit segment, par exemple, le segment L3 code pour la protéine $\lambda 1$ [6].

Chaque ARNm provenant de la transcription complète de chaque segment viral possède un long cadre de lecture ouvert faisant presque la totalité de la séquence de l'ARN de polarité positive. La traduction suit le même modèle que chez les

eucaryotes incluant les séquences régulatrices en amont et en aval du codon d'initiation. Le segment S1 comprend deux cadres de lectures ouverts qui se chevauchent et code donc pour deux protéines, $\sigma 1$ et $\sigma 1s$. Le codon d'initiation pour $\sigma 1s$ n'est pas dans le même cadre de lecture que celui pour $\sigma 1$ et la protéine est traduite de façon moins efficace étant donné un contexte d'initiation de la traduction moins favorable [21]. En ce qui concerne le gène M3, deux protéines sont aussi traduites, μNSC et μNS , mais cette fois, les codons d'initiation se trouvent dans le même cadre de lecture et μNSC est traduite à partir du deuxième ou troisième AUG [22]. D'autres petits cadres de lecture ouverts sont retrouvés à l'intérieur des segments de réovirus, mais il n'y a pas d'indication de leur traduction à l'intérieur des cellules. Il n'y a pas de preuve en ce qui concerne la traduction protéique à partir du brin d'ARN de polarité négative, ces brins ne sont pas retrouvés dans le cytoplasme des cellules infectées au cours du cycle de réplication [23].

Les extrémités 5' et 3' nontraduites du brin d'ARN de polarité positive représentent une faible proportion du génome. La longueur de l'extrémité non-traduite varie d'un segment à l'autre, n'est pas la même en 5' et en 3' et varie très peu entre les segments homologues provenant de différents isolats. Ces extrémités non-traduites incluent probablement des séquences importantes pour l'empaquetage de l'ARN, la reconnaissance par l'ARN polymérase pour la synthèse des brins positifs et négatifs et l'efficacité de traduction [6]. Ainsi, il a été démontré que l'extrémité 3' non-traduite du gène S4 contient des séquences qui régulent l'efficacité de traduction de l'ARNm S4 ce qui suggère la présence de composantes cellulaires qui interagiraient avec ces séquences pour moduler la traduction [24]. D'autres associations entre de telles séquences et les fonctions médiées par celles-ci restent à démontrer.

1.1.2.1 Protéines structurales

Les protéines structurales composant les deux capsides concentriques peuvent être classées selon qu'elles font partie de la capsid interne ou externe du virion. La capsid interne est formée par les protéines $\lambda 1$, $\lambda 3$, $\mu 2$ et $\sigma 2$ tandis que la capsid externe comporte les protéines $\lambda 2$, $\mu 1$, $\sigma 1$ et $\sigma 3$. Le virion mature est doté de toutes ses protéines structurales. Toutefois, sa décapsidation partielle en ISVP (*infectious*

subvirion particles) et ensuite en nucléoïde ou core (particule transcriptionnellement active) mène graduellement au changement de conformation et à la perte de certaines protéines notamment celles se trouvant au niveau de la capsid externe [7]. Ces structures du réovirus seront décrites en détail à la prochaine section. Le tableau I à la fin de cette section résumera les principales fonctions et caractéristiques de chacune des protéines du réovirus.

La protéine $\lambda 3$, une protéine de 142 kd, est l'ARN polymérase ARN dépendante du virus et est présente en douze copies à l'intérieur de la capsid interne [25, 26]. Des études utilisant un mutant thermosensible dont la mutation se trouve au niveau du gène L1 montrent que celui-ci est sévèrement limité dans la synthèse d'ARN bicaténaire à température non permissive [27]. Il semble que la protéine $\lambda 3$ est ancrée à la face interne du nucléoïde et se trouve ainsi en contact avec trois molécules de la protéine de la capsid interne $\lambda 1$, chevauchant ainsi un axe de symétrie quintuple [28].

Composante primaire de la capsid interne, la protéine $\lambda 1$ (142 kd) se dénombre à 120 copies par particule virale [26, 29]. Des études utilisant une forme recombinante de $\lambda 1$ ont montré que celle-ci nécessite la protéine $\sigma 2$ pour former une structure icosaédrique [30]. En plus de l'interaction avec $\sigma 2$ et $\lambda 3$ (mentionnée ci-haut), $\lambda 1$ semble être en contact avec les protéines $\lambda 2$ de la capsid externe et $\mu 2$ de la capsid interne [31]. Des analyses de réassortants ont démontré que le segment L3 encodant la protéine $\lambda 1$ exerce une influence sur les activités nucléoside triphosphatase (NTPases) médiées par le nucléoïde [32]. Des activités 5' ARN-triphosphatase, nucleoside triphosphate phosphohydrolase et helicase ont été observées *in vitro* pour cette protéine [33, 34]. Ces études suggèrent que cette protéine jouerait un rôle dans les premières étapes de l'assemblage de la coiffe et du déroulement de l'ARN durant la synthèse des brins positifs et/ou négatifs. Enfin cette protéine aurait une activité de liaison à l'ARN mono- ou bicaténaire non spécifique à l'ARN du réovirus [35].

La protéine $\mu 2$ (83 kd) est représentée par un faible nombre de copie par particule virale (seulement 24) et se trouve à la face interne, avec $\lambda 3$, de la capsid formée par la protéine $\lambda 1$ [26]. Des études avec un mutant thermosensible dont la

mutation se situe au niveau du segment M1 codant effectivement pour la protéine $\mu 2$ montrent que ce mutant ne peut synthétiser l'ARN viral à température non permissive [36]. De plus, des études subséquentes soulignent une influence de cette protéine au niveau des activités transcriptase et NTPase du nucléoïde [37, 38]. Ces données suggèrent que $\mu 2$ serait soit un cofacteur ou soit une sous-unité de l'ARN polymérase virale, $\lambda 3$. Tout comme $\lambda 1$, $\mu 2$ aurait des activités NTPases et 5'-ARN triphosphatase *in vitro* ainsi qu'une activité de liaison à l'ARN mono- ou bicaténaire non spécifique à l'ARN de réovirus [28, 39].

Située à la surface externe de la capsid interne, $\sigma 2$ (47 kd), une protéine au nombre de 150 copies par virion se trouve sous forme de nodule et, en association avec $\lambda 1$, forme la structure icosaédrique de la capsid interne [31]. En plus de se lier à $\lambda 1$, 60 copies de $\sigma 2$ partagent une région d'interaction avec la protéine $\lambda 2$. De plus, il semblerait que la protéine $\sigma 2$ se lie à la base d'une protéine majeure de la capsid externe, $\mu 1$ et de cette façon aurait un rôle dans l'ancrage de cette molécule dans la particule virale [31]. Une liaison à l'ARN bicaténaire existerait, mais celle-ci serait de faible affinité [40]. Somme toute, la ou les fonctions de cette protéine codée par le segment S2 restent peu comprises.

Formant les projections originant du nucléoïde jusqu'à la capsid externe, la protéine $\lambda 2$ (144 kd) s'assemble en pentamère au douze sommets de l'icosahédre pour un total de 60 molécules par virion [26]. Ces projections dont la structure rappelle des tourelles constituent les pores par lesquelles les ARNm synthétisés à l'intérieur du nucléoïde atteignent le cytosol pour la traduction subséquente par la machinerie cellulaire. Tout au long de son passage à l'intérieur du tunnel formé par la structure pentamérique de cette protéine, l'ARNm acquiert sa coiffe de part les différentes activités enzymatiques portées par ces projections. En effet, la protéine $\lambda 2$ (encodée par le segment L2) serait responsable de trois des quatre réactions enzymatiques nécessaires à l'ajout de la coiffe soit, l'ARN 5'-guanylyltransférase, la 7-N-méthyltransférase et la 2'-O-méthyltransférase [41, 42]. Cette protéine aurait une interaction avec chacune des sept autres protéines structurales des réovirus [31].

La protéine $\mu 1$ (76 kDa) constitue une des protéines majeures de la capsid externe des réovirus. L'autre protéine majeure, $\sigma 3$ se trouve liée à $\mu 1$ dans un rapport

1 :1. En effet, ces deux protéines sont présentes au nombre de 600 molécules par particule virale et sont organisées en hétérohexamère (trois molécules de $\mu 1$ associées à trois molécules de $\sigma 3$) [43]. De part leur interaction, ces deux protéines exercent plusieurs fonctions tant au niveau de la stabilité de la particule qu'au niveau de la décapsidation et du contrôle de la traduction [43]. Il a été observé qu'à la surface du virion mature, 95% de la protéine $\mu 1$ est clivée en un fragment $\mu 1C$ (région C-terminale de $\mu 1$, 72 kDa) et un plus petit fragment $\mu 1N$ (région N-terminale de $\mu 1$, 4.2 kDa) [44]. Par ailleurs, dans le cytoplasme des cellules infectées, 90% des protéines $\mu 1$ libres ne sont pas clivées ce qui suggère que le clivage $\mu 1N$ - $\mu 1C$ est lié à la formation du complexe $\mu 1$ - $\sigma 3$ et nécessite la myristylation de l'extrémité N-terminale de $\mu 1$ [45-48]. Le clivage de la protéine à cette jonction semble être autocatalytique [45]. Or, des études antérieures avaient suggéré que le niveau de protéines $\mu 1$ non clivées lié à $\sigma 3$ est supérieur lorsque les échantillons ne sont pas soumis à de hautes températures avant électrophorèse sur gel [49]. Effectivement, des observations récentes vont plus loin et démontrent, en changeant les conditions de dissociation du virion, qu'il est possible de passer de 95% de protéines $\mu 1$ clivées à seulement 50% et ce en modifiant le pH et la température de dissociation [50]. Ils concluent alors que l'autoclivage des réovirus, contrairement à celui des virus animaux non enveloppés d'autres familles, ne fait pas partie des étapes de maturation pour générer des virions stables et infectieux, mais ferait partie d'un des changements structuraux nécessaire à la décapsidation, menant ultimement à la pénétration de la membrane [50]. En outre, cette même étude démontre que sur des ISVPs purifiés auxquels la protéine $\sigma 3$ a été retirée, le clivage $\mu 1N$ - δ (partie N-terminale $\mu 1C$) a tout de même lieu, ce qui constitue une preuve supplémentaire de la nature autocatalytique du clivage [50]. Par ailleurs, antérieurement à cette étude, cette équipe avait démontré que le clivage $\mu 1N$ - $\mu 1C$ n'est pas nécessaire à l'assemblage de la particule virale, mais essentiel au niveau de la perméabilisation et de la pénétration de la membrane cellulaire. Cette même équipe a noté que la relâche du fragment $\mu 1N$ myristylé, observé chez les réovirus, fait partie des étapes de pénétration de la membrane partagées par plusieurs virus animaux non enveloppés [51].

Après exposition à des protéases *in vivo* ou *in vitro*, les protéines $\mu 1$ et $\mu 1C$ sont clivées, mais cette fois en C-terminal pour engendrer le fragment de 60kDa, $\mu 1\delta$ (dérivé du clivage de $\mu 1$) ou δ (dérivé du clivage de $\mu 1C$) en N-terminal ainsi que le fragment C-terminale, ϕ (13 kDa) [52]. La signification de ce clivage reste inconnue, puisque contrairement à ce qui a déjà été formulé [52], il semblerait que ce clivage ne soit pas nécessaire à la perméabilisation ou à l'activation de la transcriptase puisque des ISVPs dont la jonction δ - ϕ serait demeurée intacte présentent une infectivité normale [53, 54]. Par ailleurs, des études récentes proposent un mécanisme où la relâche du fragment δ jouerait un rôle à des étapes ultérieures à l'entrée, soit au niveau de la localisation du nucléoïde soit pour empêcher la toxicité cellulaire due au conformère hydrophobe de $\mu 1$ [55, 56]. En effet, son accumulation en grosse quantité dans le cytoplasme et dans le noyau plusieurs heures après l'infection suggèrent que δ joue probablement un rôle dans les étapes suivant la pénétration de la particule virale dans le cytoplasme [55]. La figure 1 permet d'apprécier les différents sites de clivage de $\mu 1$ et les produits de clivage associés.

Enfin, la protéine $\mu 1$ a été associée à l'activation de la transcriptase. En effet, des études de recombinants ont montré que le segment M2 détermine la différence d'activation de la transcriptase entre les différents isolats de réovirus [25].

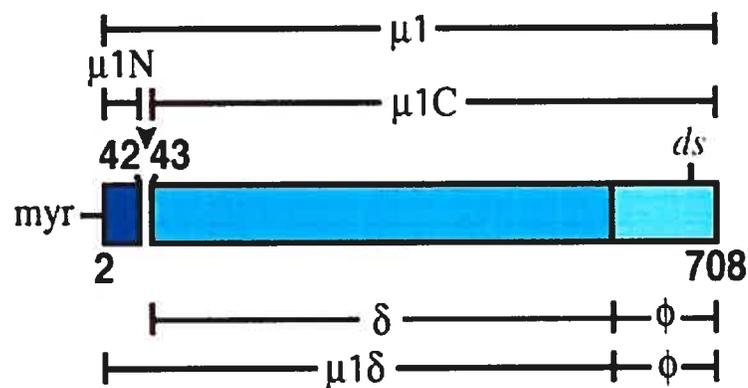


Figure 1 Diagramme représentant la protéine $\mu 1$ ¹

¹ J. Mol. Biol. (2005). 345 (3) :p.461-74

Comme énoncé précédemment, $\sigma 3$ (41 kDa) constitue une protéine majeure de la capsid externe où elle interagit avec la protéine $\mu 1$, bien entendu, mais aussi avec la protéine $\lambda 2$ et probablement avec $\sigma 1$ [57, 58]. En effet, l'association $\mu 1$ - $\sigma 3$ est primordiale pour l'assemblage de la capsid externe autour du nucléoïde [48, 59]. Des études génétiques de réassortants ont montré que le segment S4, codant pour la protéine $\sigma 3$, détermine la différence de sensibilité à l'inactivation du virion par la chaleur et le SDS (détergent) [60]. De plus il a été suggéré que cette même protéine jouerait un rôle important en stabilisant le virus en vue de survivre à l'environnement externe [61]. Outre son rôle au niveau de l'assemblage, il semble que la liaison $\mu 1$ - $\sigma 3$ induise un changement de conformation au niveau de la protéine $\sigma 3$ la rendant ainsi sensible aux protéases [62]. La protéolyse de $\sigma 3$ s'effectue à l'intérieur des endosomes, avant la pénétration des particules virales dans le cytoplasme, et nécessite les protéases cellulaires lysosomales de type cystéine protéase qui sont, pour la plupart, dépendantes d'un faible pH [63-65]. Par ailleurs, l'établissement de virus persistants a permis de localiser entre autre une mutation au niveau du gène S4, mutation qui conférerait à la protéine $\sigma 3$ une sensibilité accrue à la protéolyse [66].

Des études biochimiques ont révélé que $\sigma 3$ se lie à l'ARN bicaténaire et ce, indépendamment de la séquence [67] et que cette liaison serait localisée en C-terminal du fragment au niveau de deux motifs riches en acides aminés basiques [68]. Cette propriété de $\sigma 3$ est impliquée dans la régulation de la traduction et la résistance à l'interféron puisque la séquestration de l'ARN double brin empêche l'activation de PKR (protéine kinase ARNdb dépendante inducible à l'interféron), enzyme inhibant la traduction protéique [69-72]. La capacité d'inhiber la traduction semble intimement liée à la localisation intracellulaire de $\sigma 3$ et non à son niveau d'expression [73]. D'un autre côté, il a été démontré que $\sigma 3$ joue un rôle déterminant dans la traduction des ARNm tardifs de réovirus qui eux n'ont pas la structure coiffe [74]. Aussi, l'inhibition de la liaison de $\sigma 3$ à l'ARN bicaténaire constituerait un autre niveau où l'association $\mu 1$ - $\sigma 3$ a son importance [75]. Les fonctions de $\sigma 3$ liées à l'inhibition de PKR seront approfondies dans d'autres sections. Enfin, des études récentes ont identifié un groupement acétyl à l'extrémité N-terminale de $\sigma 3$, acétylation confirmée par une étude subséquente [76, 77]. La

fonction de ce groupement n'est pas connue, il a tout de même été proposé que l'acétylation pourrait servir à discriminer les rôles que $\sigma 3$ peut jouer durant le cycle de réplication de réovirus [77].

La dernière protéine structurale dont il sera question est en fait la protéine d'attachement à la cellule, $\sigma 1$ (49 kDa) codée par le gène S1 [78]. Cette protéine se trouve sous forme trimérique à chacun des douze sommets de l'icosahédre pour un total de 36 protéines par virion [26, 79]. Sa morphologie est caractérisée par une tête globulaire et une queue en N-terminale. Cette protéine peut adopter deux différentes conformations, soit repliée comme on la retrouve au niveau du virion soit en fibre allongée que l'on observe sur les ISVPs [57]. La protéine $\sigma 1$ constitue le principal antigène contre lequel les anticorps neutralisants sérotype-spécifique sont dirigés [80]. De plus, la propriété d'hémagglutination des érythrocytes par les réovirus est liée à cette protéine de la capsid externe [81]. Les récepteurs cellulaires connus pour la protéine $\sigma 1$ sont l'acide sialique (acide N-acétyl neuraminique) et JAM 1 (*junction adhesion molecule 1*) [82-84]. Enfin, il a été rapporté que la liaison de $\sigma 1$ à ses récepteurs (acide sialique et/ou JAM1) induirait l'apoptose par le biais de l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et c-Jun [85-88]. De plus l'induction de l'apoptose par l'activation de NF- κ B serait maximale chez une souche virale capable de lier à la fois l'acide sialique et JAM1 à la surface de la cellule [84]. Des études subséquentes ont démontré que les étapes de la décapsidation et non celles de la réplication sont nécessaires à l'induction de l'apoptose suite à l'infection par les réovirus [89].

1.1.2.2 protéines non-structurales

Les protéines non-structurales comme leur nom l'indique, ne font pas partie de la composition des capsides concentriques, mais jouent des rôles (encore plus ou moins bien connus) au niveau du cycle de réplication du virus. La protéine σ NS (41 kDa) codée par le gène S3, se lie à l'ARN monocaténaire et semble être une protéine majeure en ce qui concerne la formation d'inclusions virales cytoplasmiques où la réplication virale a lieu [90]. Elle aurait possiblement une fonction, avec $\sigma 3$ et μ NS, dans la préparation du transcrit pour la synthèse de l'ARN de polarité négative et

l'empaquetage dans le nucléoïde [91]. La protéine μ NS (80 kDa) codée par le segment M3 est aussi un déterminant majeur dans la formation d'inclusions virales [92]. Il a été démontré que cette protéine se lie au nucléoïde établissant un délai dans la synthèse de la capsid interne et, par conséquent, permettant ainsi de continuer la transcription de l'ARN viral [93]. Des études très récentes ont montré que μ NS recrutent certaines protéines virales aux inclusions virales pour l'assemblage [94]. Une autre protéine encodée par le segment M3, μ NSC (75 kDa) est détectée durant l'infection, mais aucune fonction ne lui a été attribuée [22]. Enfin, σ 1s (14 kDa) est codée par le gène S1, elle potentialiserait l'inhibition de la synthèse d'ADN cellulaire ainsi que les effets cytopathiques. Par ailleurs, il semble que cette protéine soit impliquée dans l'arrêt de la cellule en phase G2/M et que cet arrêt se fait indépendamment de l'induction de l'apoptose [95].

Tableau I : Les protéines du réovirus

<i>Segment encodant</i>	<i>Protéine</i>	<i>Masse (Kda)</i>	<i>Nombre de copies/virion</i>	<i>Localisation</i>	<i>Fonction et caractéristiques</i>
<i>L1</i>	λ 3	142	12	Capsid interne	ARN polymérase ARN dépendante
<i>L2</i>	λ 2	144	60	Capsid externe et core	ARN 5' guanylyltransférase 7-N-méthyltransférase 2'-O-méthyltransférase Influence les activités NTPases
<i>L3</i>	λ 1	142	120	Capsid interne	5'ARN-triphosphatase, ARN hélicase et nucleoside triphosphate phosphohydrolase <i>in vitro</i> Liaison à ARN mono- ou bicaténaire
<i>M1</i>	μ 2	83	24	Capsid interne	Influence les activités transcriptase et NTPase 5'ARN-triphosphatase <i>in vitro</i> Liaison à ARN mono- ou bicaténaire
<i>M2</i>	μ 1	76	600	Capsid externe	Perméabilisation et pénétration de la membrane cellulaire Activation de la transcriptase
<i>M3</i>	μ NS	80	0	Nonstructurale	Formation d'inclusions virales Liaison au core Recrutement des protéines

	μ NSC	75	0	Nonstructurale	pour l'assemblage Fonction inconnue
<i>S1</i>	$\sigma 1$	49	36	Capside externe	Attachement à la cellule Détermine le sérotype Hémagglutinine Induction de l'apoptose
	$\sigma 1s$	14	0	Nonstructurale	Inhibition synthèse ADN cellulaire et effets cytopathiques Rôle dans arrêt en G2/M
<i>S2</i>	$\sigma 2$	47	150	Capside interne	Ancrage de la protéine $\mu 1$ Liaison à ARN db
<i>S3</i>	σNS	41	0	Nonstructurale	Liaison à ARN sb Formation d'inclusions virales Rôle dans préparation du transcrit pour synthèse d'ARN de polarité négative et empaquetage
<i>S4</i>	$\sigma 3$	41	600	Capside externe	Stabilité du virion Sensibilité à la dégradation par les protéases Liaison à l'ARN db et contrôle de la traduction Rôle dans traduction des ARNm tardifs non coiffés

1.1.3 Éléments structuraux du réovirus

Réovirus peut se présenter sous trois structures particulières à l'intérieur d'un cycle de réplication soit le virion mature, l'ISVP ou particule subvirale infectieuse et le nucléoïde communément appelé le core. Les ISVPs et le core peuvent être générés *in vitro* suite à un traitement avec des protéases alcalines telles que la chymotrypsine [96]. Ces formes sont générées durant l'entrée du virus dans la cellule hôte et jouent un rôle essentiel dans l'initiation de l'infection, d'où l'intérêt accordé à ces différentes formes [61]. Chacune des structures accompagnées de leur fonction et des protéines qui leur sont associées seront décrites. La figure 2 illustre ces différentes structures en microscopie cryoélectronique et reconstruction tridimensionnelle et offre un schéma des différentes protéines qui leur sont associées.

Toutes les protéines structurales sont présentes au niveau du virion mature. Des molécules trimériques de $\sigma 3$ se trouvent liées à la partie supérieure des trimères de $\mu 1$, couvrant pratiquement la totalité de sa surface [43]. Comme il a été mentionné

plus tôt, la protéine $\mu 1$ n'aurait pas encore subi un clivage en $\mu 1N$ - $\mu 1C$. La protéine responsable de l'adhésion à la cellule, $\sigma 1$, est elle aussi sous forme de trimère et présente une conformation de plutôt repliée à allongée [57, 97]. Elle se trouve ancrée de par sa base au centre de chaque tourelle formée par un pentamère de $\lambda 2$.

Les ISVPs sont surtout caractérisées par la perte de la protéine $\sigma 3$ suite à sa dégradation par des protéases dans l'environnement extracellulaire ou au niveau des endosomes [57]. L'élimination de $\sigma 3$ à la surface du virion par des protéases semble être une étape importante au niveau de la décapsidation puisqu'elle permet l'exposition de la protéine $\mu 1$ qui peut ensuite interagir avec la membrane pour la pénétration [49]. De plus, le clivage δ - ϕ , laissant ces deux fragments liés à la particule virale, et une forme plus allongée de la fibre $\sigma 1$ sont observés [52, 57]. Des études récentes proposent un modèle selon lequel les ISVPs subirait un changement de conformation pour donner des ISVP' [51]. Ces particules auraient perdu la protéine $\sigma 1$ due à un changement de conformation de $\lambda 2$ et porteraient un conformère hydrophobe de la protéine $\mu 1$ [56, 57]. Il semble que ce changement de conformation de $\mu 1$ qui expose une région hydrophobe augmente par la même la sensibilité du fragment δ à la protéolyse qui aurait lieu à ce moment. La pénétration de la membrane et la relâche subséquente dans le cytoplasme nécessite un autre changement de conformation des ISVPs' cette fois en ISVPs*. Les ISVPs* sont caractérisées par le clivage de la totalité de $\mu 1\delta$ en $\mu 1N$ - δ et la relâche du fragment $\mu 1N$ myristylé [51, 56]. La relâche du fragment δ se produit probablement au moment de la pénétration de la membrane ou au niveau du cytoplasme [55].

Enfin, le core est caractérisé par la perte de $\sigma 3$, $\sigma 1$ et $\mu 1$ et, il ne reste que la protéine $\lambda 2$ de la capsid externe à sa surface. Le canal formé par la structure pentamérique de cette protéine se trouve donc ouvert, permettant à l'ARN naissant de sortir de cette structure transcriptionnellement active pour rejoindre le cytoplasme de la cellule infectée [57].

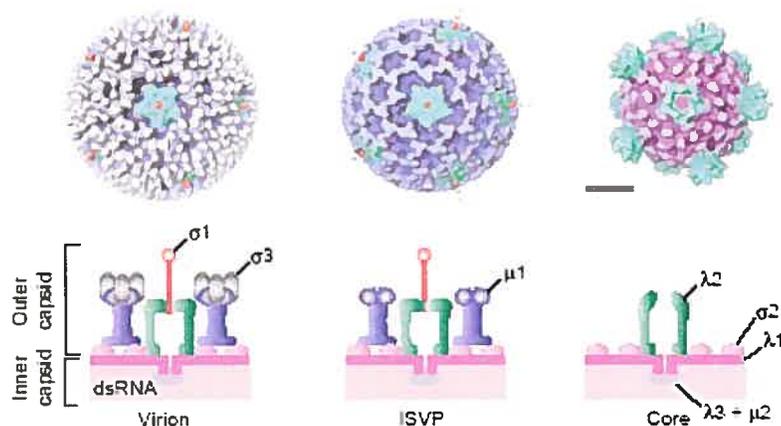


Figure 2 : Différentes structures du réovirus et protéines associées²

1.1.4 Cycle de réplication du réovirus

Les différentes étapes du cycle de réplication du réovirus sont illustrées à la figure 3. Ce schéma constitue une représentation globale, le détail sera fourni par le texte.

1.1.4.1 Adsorption, entrée et décapsidation

La première étape d'une infection productive par les réovirus consiste en l'attachement de la protéine $\sigma 1$ par ses domaines de liaison aux récepteurs à l'acide sialique (liaison sur la queue de $\sigma 1$) et à JAM1 (liaison à la tête de $\sigma 1$) à la surface de la cellule [84, 98]. Des études ont démontré que l'attachement des réovirus est un processus pouvant comprendre plusieurs étapes : d'abord un attachement à l'acide sialique (co-récepteur) de faible affinité médiant le premier contact entre le virus et la cellule hôte et ensuite, la liaison d'une autre protéine cellulaire, JAM1 (récepteur), à la tête globulaire de $\sigma 1$ permettant l'entrée du virus dans la cellule [5, 99]. En effet des études préalables avaient démontré que le virus peut se lier à une multitude de protéines à la surface de la cellule, mais qu'un faible nombre d'entre elles sont effectivement internalisées par la suite, suggérant un processus où le simple attachement du virus à la cellule est nécessaire, mais non suffisant à l'internalisation

² Trends Microbiol. (2003). **11** (8) : p.374-82

de celui-ci [100]. Le récepteur du facteur de croissance épidermale, EGFR (*epidermal growth factor receptor*), est une sialoglycoprotéine reconnue et utilisée pour l'internalisation du réovirus [101, 102].

Suite à l'attachement du virus, il s'en suit un changement de conformation de la portion C-terminale de $\sigma 1$ et ce changement de conformation se propage à l'extrémité N-terminale où la molécule est ancrée, pour ensuite atteindre les autres protéines de la capsid externe, les rendant ainsi plus susceptibles à l'action des protéases [103, 104].

L'entrée du virion à l'intérieur de la cellule se fait par endocytose médiée par des vésicules membranaires recouvertes de clathrine [63, 105]. Les vésicules de clathrine évoluent successivement vers des endosomes précoces et éventuellement tardifs. Les endosomes précoces permettent soit le recyclage à la surface de la cellule, soit le passage aux endosomes tardifs dont le pH est plus faible [106]. Le virus est ensuite relâché au niveau des lysosomes, là où les protéases dépendantes d'un faible pH pourront procéder à sa décapsidation [63]. Les cystéines protéases dépendantes d'un faible pH médient la décapsidation du réovirus et cette étape est cruciale en ce qu'elle génère des ISVPs qui ont la capacité de pénétrer la membrane [52].

L'entrée des ISVPs n'implique pas l'endocytose, mais plutôt un mécanisme direct de pénétration de la membrane plasmique [107]. En effet, dans le tractus intestinal où une multitude d'enzymes protéolytiques et un faible pH règnent, le virus est souvent retrouvé sous forme d'ISVPs. Des études ont montré que leur passage dans le milieu intracellulaire n'est pas affecté par la présence d'inhibiteurs de la pénétration (substances augmentant le pH des endosomes) [63].

Le produit final de l'entrée des virions ou des ISVPs à l'intérieur du cytoplasme de la cellule est le core ou le nucléoïde. En effet, la dégradation de la capsid externe par les protéases cellulaires active la transcriptase et les enzymes virales nécessaires à la transcription et à la réplication du génome viral [6]. Il a été observé que la transcriptase du réovirus pouvait être activée soit par la chaleur, soit par le traitement avec des protéases telles que la chymotrypsine [25, 108]. En ce qui concerne le traitement aux protéases générant des cores comme produit final, il semble que l'activation de la transcriptase soit fortement corrélée avec la perte de la protéine

majeure de la capside externe, $\mu 1$ [25, 109] permettant donc d'initier la transcription précoce.

1.1.4.2 Transcription précoce des segments du génome

Les transcrits primaires sont détectés deux heures après le début de l'infection, atteignent un maximum à 6-8 heures pour enfin diminuer à un niveau non détectable à 12 heures post-infection [6]. Ces premiers transcrits servent à la fois d'ARNm pour la synthèse des protéines précoces ainsi que de matrice pour la synthèse du brin d'ARN de polarité négative [23]. Évidemment, c'est le brin d'ARN de polarité négative qui sert de matrice à la transcription de l'ARNm. Les ARNm synthétisés lors de cette première phase ont la particularité d'avoir leur extrémité 5' munie d'une coiffe. L'ARN bicaténaire parental est conservé à l'intérieur du nucléoïde [110]. Chaque étape de la transcription et de l'ajout de la coiffe sur les ARNm est médiée par les enzymes virales se trouvant à l'intérieur du core. L'action séquentielle de ces enzymes qui synthétisent l'ARNm et y ajoute la coiffe en 5' nécessite que celles-ci se trouvent à proximité les unes des autres. Un modèle de synthèse d'ARNm où les enzymes sont fixes et la matrice en mouvement est l'idée généralement acceptée [28]. D'abord, la nature double brin de l'ARN fait en sorte qu'une hélicase est nécessaire à la séparation des brins. Des études récentes semblent attribuer cette fonction à la protéine $\lambda 1$. Ensuite, comme il a été préalablement mentionné, la protéine $\lambda 3$ constitue le site catalytique de l'ARN polymérase ARN double brin dépendante, la protéine $\mu 2$ serait un cofacteur de la transcriptase. Peu après le début de la transcription, les étapes de l'ajout de la coiffe débutent sur l'ARN naissant qui, à ce point n'est que de quelques nucléotides de long. Dans un premier temps, une ARN triphosphatase phosphohydrolase enlève un phosphate inorganique en 5', laissant une extrémité diphosphatée. Ce type d'activité a été observé pour les protéines $\lambda 1$ et $\mu 2$ *in vitro*. Les réactions faisant intervenir la guanylyltransférase ainsi que les méthyltransférases 1 et 2 complètent les étapes de la formation de la coiffe et ont lieu à l'intérieur de la tourelle formée par la structure pentamérique de $\lambda 2$, la protéine qui exécute ces fonctions. La transcription consiste donc en un processus dynamique, où la formation de la coiffe, s'associe à la synthèse

de l'ARNm via un parcours préétabli par la position des différentes enzymes. Cette structure permet à cette molécule nouvellement synthétisée, d'atteindre graduellement le cytoplasme de la cellule infectée à travers l'ouverture de la tourelle formée par $\lambda 2$. Chacun des dix segments du génome de réovirus représente une unité transcriptionnelle indépendante. Durant les quelques premières heures de l'infection, les segments L1, M3, S3 et S4 semblent préférentiellement transcrits, les six autres segments nécessitant une synthèse protéique *de novo* [111]. Le site intracellulaire cytoplasmique où a lieu la transcription primaire reste inconnu.

1.1.4.3 Synthèse des protéines virales et formation d'un complexe précoce

Peu après le début de l'infection, il y a une augmentation graduelle de la synthèse des protéines virales au détriment de la traduction des protéines cellulaires. Les protéines nouvellement synthétisées sont décelées environ deux heures postinfection et, après dix heures, la plupart des protéines synthétisées dans la cellule sont d'origine virale [6]. Le mécanisme par lequel la traduction des ARNm viraux domine la traduction des ARNm cellulaire est peu compris. De même, il existe une différence entre les fréquences de traduction des ARNm viraux, indiquant plusieurs niveaux de régulation à l'intérieur de ces transcrits. Les protéines nouvellement synthétisées s'associeront aux dix ARNm viraux pour former la structure répliquative secondaire permettant la synthèse du brin d'ARN de polarité négative [112]. Il a été démontré que les protéines μ NS, σ NS et $\sigma 3$ s'associent rapidement aux ARNm viraux pour former de petits complexes nucléoprotéiques et que la présence d'ARN bicaténaire par la suite, est associée à la détection de $\lambda 2$ [91]. Il est à noter que l'association entre les protéines $\lambda 1$ et $\sigma 2$ est importante pour la formation du core et qu'elle permet la liaison subséquente des projections pentamériques de $\lambda 2$ [30]. Il a été récemment démontré que la protéine μ NS recrute les protéines de la capsid interne $\lambda 1$, $\sigma 2$ ainsi que la protéine $\lambda 2$ au site d'inclusion et jouerait donc un rôle au niveau de l'assemblage du nucléoïde et la réplication [94]. La séquence temporelle des événements reste à définir.

1.1.4.4 Réplication et transcription tardive

Chaque brin d'ARN simple brin servira donc de matrice à la synthèse de son brin complémentaire afin de reproduire l'ARN génomique. La réaction de réplicase est assurée par la protéine $\lambda 3$ qui, cette fois, exerce le rôle d'ARN polymérase ARN simple brin dépendante [113]. Le rôle d'autres protéines dans la synthèse du brin d'ARN de polarité négative reste à élucider.

Arrivée à l'extrémité du brin d'ARN de polarité négative, l'ARN polymérase se positionne pour effectuer la synthèse des ARNm tardifs, c'est la transcription tardive. La transcription secondaire ou tardive génère 95% des ARNm produits durant l'infection et est instaurée par les particules sous-virales nouvellement synthétisées à l'intérieur desquelles est contenu le génome d'ARN bicaténaire segmenté [6]. Ces particules sous-virales exhibent à leur surface une faible quantité de la protéine $\lambda 2$ et des autres protéines de la capsid externe. Les enzymes assurant l'ajout de la coiffe ne sont pas activées et, partant, les ARNm tardifs ne seraient pas munis d'une coiffe [114]. En effet, des changements au niveau de la machinerie traductionnelle de la cellule, suite à l'infection par réovirus, entraînant une traduction préférentielle des ARNm non coiffés, pourraient expliquer ce phénomène [115]. Par contre, il a récemment été proposé que la protéine μNS servirait à augmenter la production des ARNm coiffés puisqu'elle a la capacité de se lier au nucléotide et d'inhiber l'assemblage de la capsid externe sans toutefois interrompre les activités de transcription et d'ajout de la coiffe [93].

1.1.4.5 Assemblage

Les étapes menant à l'assemblage de la capsid externe du virus ne sont pas tout à fait comprises. Il semble que l'association entre les protéines majeures de la capsid $\mu 1$ et $\sigma 3$, importante pour l'assemblage, peut se produire indépendamment de la protéine $\sigma 1$ et induit un réarrangement des projections pentamériques dans une conformation similaire à celle observée chez le virion mature [54]. Toutefois, il est présentement établi que le clivage de la molécule de $\mu 1$ en $\mu 1N$ - $\mu 1C$, suite à l'association avec $\sigma 3$ n'est pas requis pour l'assemblage [51]. En effet, des études très récentes ont noté que ce clivage n'a pas lieu nécessairement à ce moment, mais

plutôt au moment de la décapsidation, les conditions de dissociation du virion pour électrophorèse sur gel dénaturant ayant probablement créées ce clivage [50]. L'ajout des protéines de la capsid externe met donc un terme à la transcription.

1.1.4.6 Relâche du virion mature

Le cycle de multiplication du réovirus se termine par la lyse de la cellule infectée due à la relâche du virion mature dans le milieu extracellulaire environ 24 heures post-infection. Malgré son potentiel lytique, le réovirus peut induire la persistance chez certains types de cellules. La persistance implique que le virus d'une part et la cellule d'autre part s'adaptent pour pouvoir coexister; il en sera question dans la prochaine section.

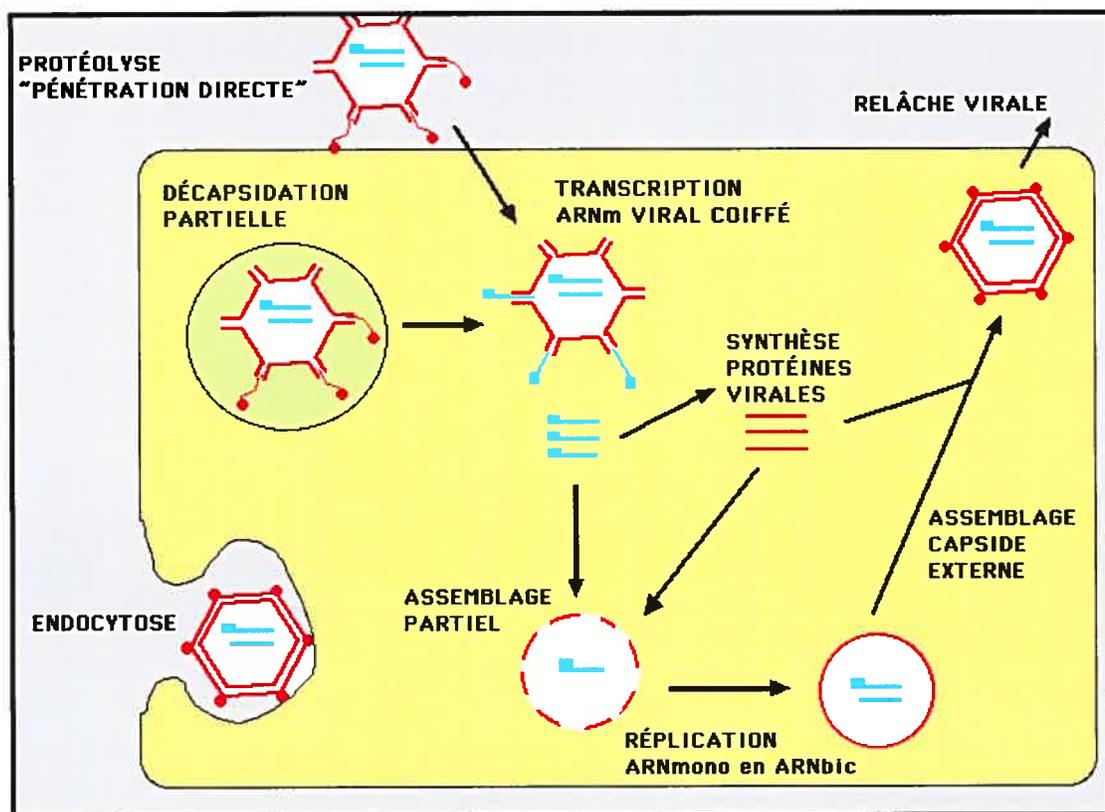


Figure 3 : Cycle de réplication de réovirus³

³ Tiré de Médecine/Sciences (2002). 18 (12) :p.1282-6

1.1.5 La persistance

L'établissement de réovirus persistants dans des cellules L929 (fibroblastes de souris) a lieu lorsque ces cellules sont infectées avec des stocks viraux ayant infecté successivement des cellules à forte multiplicité d'infection [116, 117]. Les passages successifs à de hautes multiplicités d'infection permettent la génération d'une grande variété de mutants et, parmi ceux-ci, des virus ayant acquis la capacité de co-évoluer avec la cellule hôte dans une relation de persistance [117, 118]. Les réovirus peuvent établir la persistance chez plusieurs types cellulaires [119]. Chez les cellules L929, très permissives à l'infection par le réovirus, la persistance est établie sur une fraction minime des cellules infectées. Par contre, d'autres types cellulaires, notamment les cellules SC1 et MDCK, qui présentent une meilleure résistance aux effets cytopathiques de réovirus semblent montrer une plus grande proportion de cellules infectées de façon persistante [120, 121]. Ces données démontrent qu'en plus des mutations acquises par le virus pour établir la persistance, il existe forcément des facteurs intrinsèques à la cellule hôte lui permettant de pouvoir co-évoluer avec le virus. Il a effectivement été démontré que la cellule hôte joue un rôle important dans la maintenance de cet état puisque des cellules L929 infectées de façon persistante et libérées de l'infection virale (*cured*) suite au traitement avec un sérum anti-réovirus, présentent une résistance à l'infection par un virus de type sauvage due à des mutations qu'elles ont acquises [122]. Des études ultérieures ont établi que ces cellules sont sensibles à l'infection par des ISVPs générées à partir de virions de type sauvage, suggérant ainsi une altération dans la capacité de ces cellules à décapsider efficacement le virus par leurs protéases endosomales [123, 124]. Il est maintenant établi que des cellules L929 mutantes, sélectionnées durant une infection persistante par le réovirus, présentent des défauts dans la maturation de la cathepsine L, une cystéine protéase lysosomale nécessaire à la décapsulation du virus [125]. Bien entendu, parallèlement à ces études, des travaux ont été menés sur les virus persistants dans l'objectif de comprendre la nature des mutations portées par ces virus qui leur permettent de coexister de façon persistante avec ces cellules. Les premières études à ce sujet ont permis de noter des mutations au niveau du gène S4, codant pour la protéine $\sigma 3$ du réovirus, et au niveau du gène

S1, codant pour la protéine $\sigma 1$ [126]. Ces mêmes travaux suggèrent un rôle crucial pour le gène S4 dans l'établissement de la persistance et un rôle dans le maintien de cette persistance pour le gène S1 [126]. Une autre équipe dont les travaux sur les cellules infectées de façon persistantes ont été décrits précédemment, montre dans la même étude que les virus persistants, aussi appelés virus PI, ont acquis le potentiel de se répliquer dans des cellules normales traitées au chlorure d'ammonium, agent augmentant le pH des endosomes et bloquant ainsi les étapes précoces de l'infection par des virions de type sauvage [123]. Il a ensuite été démontré par des études de réassortants que des mutations dans les protéines $\sigma 3$ et $\sigma 1$ sont présentes chez les virus PI et qu'elles confèrent à ceux-ci la capacité de se répliquer à l'intérieur de cellules traitées au chlorure d'ammonium [66]. De plus, il a été observé que la protéine $\sigma 3$ des virus PI est dégradée par la chymotrypsine avec une meilleure cinétique que celle des virus de type sauvage et qu'une mutation de tyrosine à histidine de l'acide aminé 354 (Y354H) de $\sigma 3$ est nécessaire et suffisante à la croissance du virus en présence de chlorure d'ammonium [66]. Des études préalables avaient montré que des mutations au niveau du gène $\sigma 1$ qui altèrent la stabilité de l'oligomère, sont importantes pour une infection efficace des cellules mutantes sélectionnées durant une infection persistante [127]. En plus de la résistance des virus PI au chlorure d'ammonium, une capacité de ces virus à se répliquer en présence de E64, un inhibiteur de cystéine protéases est observée [64]. Cette propriété corrèle exclusivement avec le gène S4, suggérant que les événements dépendants d'un faible pH des endosomes, impliquent les protéines $\sigma 1$ et $\sigma 3$, tandis que les étapes dépendantes des cystéines protéases intracellulaires impliquent seulement la protéine $\sigma 3$ [64]. Le virus PI3-1, un des virus PI utilisés dans cette étude, porte une seule mutation, la conversion Y354H, supportant l'importance de cette mutation dans l'altération de la susceptibilité de la capsid virale à la protéolyse durant les étapes de l'entrée [64]. Notons que des ISVPs générées à partir de virion de type sauvage (inhibés par le E64) se répliquent normalement à l'intérieur de cellules traitées au E64.

Des passages consécutifs de réovirus dans des cellules L929 traitées au E64, montrent qu'il est possible de sélectionner des virus qui possèdent une mutation

Y354H, confirmant l'importance de cette mutation dans la susceptibilité de $\sigma 3$ à la protéolyse [128]. De plus, il s'avère que la protéolyse de ces virus, nommés virus D-EA, par la cathepsine L se produit avec une meilleure cinétique que le virus de type sauvage. Autre fait intéressant, la cathepsine D, aspartique protéase, dégrade la protéine $\sigma 3$ des virus D-EA, mais n'exerce aucun effet sur les virus de type sauvage [128]. Il a donc été suggéré que la mutation Y354H est suffisante pour conférer au réovirus une sensibilité à la protéolyse par la cathepsine D. Des études plus poussées confirment les données déjà obtenues sur la mutation Y354H et montrent que la mutation en question induit un changement conformationnel de la protéine $\sigma 3$ [129].

1.2 Réovirus, PKR et Interféron

Des études sur la modulation de la synthèse protéique cellulaire médiée par poliovirus a mené à la découverte que l'ARN bicaténaire viral permet spécifiquement l'inhibition de la traduction protéique cellulaire, inhibition devenant plus prononcée lorsque les cellules sont traitées à l'interféron [130]. Des études plus poussées ont démontré que cette molécule, une protéine kinase, peut être activée après l'ajout d'ARN double brin et, partant, elle sera appelée protéine kinase ARNdb-dépendante ou PKR.

1.2.1 Structure et fonction de PKR

PKR est une protéine sérine thréonine kinase de 551 acides aminés et d'environ 65 kDa codée par un seul gène se trouvant sur le chromosome 2p21 [131]. Structuralement, cette protéine est composée d'un domaine de régulation en N-terminal, qui contient deux sites de liaison à l'ARN double brin et d'un domaine catalytique en C-terminal responsable de l'activité kinase [131, 132]. Exprimée à de faibles niveaux dans tous les tissus de mammifères examinés, PKR est transcriptionnellement induite par l'interféron [133, 134]. Son rôle dans l'inhibition de la traduction protéique via la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction, eIF-2 α , est sans doute le plus étudié. Toutefois, plusieurs autres fonctions

lui sont attribuées, vu la capacité de cette kinase, une fois activée, à phosphoryler plusieurs substrats. Notons entre autre des implications au niveau de la régulation de la transcription [135-137], de la régulation de la croissance et de la différenciation, du cycle et de la prolifération cellulaire [138] ainsi que dans l'induction de l'apoptose [139]. Un rôle de suppresseur de tumeur a été proposé pour PKR lorsqu'il a été démontré que la surexpression d'un mutant dominant négatif entraîne la transformation des cellules NIH-3T3 (fibroblastes de souris) [140]. L'importance biologique des activités de PKR est aussi suggérée par l'existence d'une multitude d'inhibiteurs cellulaires et viraux de cette protéine [139]. À la lumière de ces différentes fonctions, il n'est donc pas surprenant que cette protéine médie des activités anti-virale et anti-cancéreuse.

1.2.2 Induction et activation de PKR

Présente de façon constitutive, mais à un niveau basal à l'intérieur de la cellule, PKR est plus fortement exprimée suite à son induction par l'interféron de type 1 et de type 2 (se référer à la section suivante pour l'interféron). Mentionnons que seulement l'induction par l'interféron de type I sera traitée ici. Le promoteur de PKR comprend deux éléments nécessaires à la transcription de la protéine : un élément activateur appelé ISRE (*IFN stimulated response element*) pour les interférons de type 1, il est responsable de l'inductibilité de la transcription de PKR et un élément KCS (*kinase conserved sequence*) qui affecte tant l'expression basale qu'inductible de PKR, il est requis pour l'activité optimale du promoteur de PKR [141-143]. Les interférons de type 1 activent sélectivement des facteurs de transcription latents, Stat 1 et Stat 2, qui s'associent à p48 ou IRF9 (*interferon regulatory factor 9*) pour se fixer sur les séquences ISRE des promoteurs des nombreux gènes induits par l'interféron dont PKR [144]. En plus de la régulation de cette protéine kinase par l'activation de la transcription induite par l'interféron, la synthèse de PKR est autorégulée au niveau de sa traduction par un mécanisme dépendant de sa forme activée [145, 146].

Comme son nom l'indique, PKR est dépendante de l'ARN bicaténaire pour être activée, ARN provenant des intermédiaires de réplication double brin de certains virus [134]. Des formes d'ARN monocaténaire qui possèdent des régions de structure secondaire peuvent elles aussi activer PKR [147]. Il n'y a pas de séquences particulières d'ARNdb requises pour la fixation sur PKR; toutefois, certains ARN sont plus efficaces en terme d'activation que d'autres. Par ailleurs, la taille du fragment d'ARN est importante pour l'activation, la longueur minimale étant de 30 à 50 paires de base et la longueur optimale d'environ 80 paires de base [148]. De faibles niveaux d'ARNdb sont requis pour l'activation de PKR; de grosses quantités d'ARN bicaténaire pourraient en fait inhiber son activation et supprimer sa fonction kinase [149]. Un mécanisme additionnel d'activation, indépendant de l'ARN double brin, a été rapporté et est médié par la protéine PACT (*PKR activator*) [150]. La liaison à l'ARN double brin à la portion N-terminale de la protéine, aux deux sites spécifiques de liaison à l'ARN bicaténaire appelé dsRBM (*double stranded RNA binding motif*), amène un changement de conformation et permet le démasquage du domaine catalytique de PKR. Une fois activée, PKR forme un homodimère qui permet son autophosphorylation sur plusieurs résidus sérine et threonine critiques, rendant donc cette kinase capable de catalyser la phosphorylation de ses substrats. [151]. Des études indiquent que les domaines de liaison à l'ARN double brin, en plus d'être nécessaires à l'activation par l'ARN bicaténaire, pourraient permettre le recrutement de cette protéine au ribosome, et par le fait même la rapprocher de son substrat eIF-2 α . Une fois activée, PKR a le potentiel de phosphoryler bon nombre de substrat et, outre eIF-2 α , notons PKR elle-même, I κ B (inhibiteur de NF κ B), la protéine Tat de VIH, NFAT (*nuclear factor of activated T cell*) et les histones [152, 153]. De par la phosphorylation de l'inhibiteur de NF κ B, PKR permet l'activation et la translocation nucléaire de ce facteur de transcription et, par conséquent la transcription d'une multitude de gènes antiviraux dont celui codant pour l'interféron β . Le mécanisme d'induction de l'apoptose par PKR implique la phosphorylation de eIF-2 α et l'activation de NF κ B par cette kinase et permet ainsi une régulation positive de plusieurs gènes impliqués dans l'apoptose notamment, Fas, Bax et p53 [139].

1.2.3 Inhibition de eIF-2 α par PKR

Lors de l'initiation de la traduction, eIF-2 forme un complexe tertiaire avec le GTP et l'ARN de transfert initiateur, Met-ARNt, dans le but de placer ce dernier sur la sous-unité 40S du ribosome avant la liaison à l'ARNm. À une étape subséquente du processus d'initiation, le GTP est hydrolysé en GDP qui reste lié à eIF-2 après que celui-ci soit relâché du ribosome. La molécule GDP a une forte affinité pour eIF-2 dans des conditions physiologiques et doit être échangée pour un GTP par l'action de eIF-2B (*guanine exchange factor*). La phosphorylation par PKR de la petite sous-unité α de eIF-2 sur le résidu sérine en position 51, transforme ce substrat en un inhibiteur de eIF-2B et résulte en l'accumulation d'un complexe inactif eIF-2B.eIF-2.GDP. Comme eIF-2 est habituellement plus abondant que eIF-2B, seulement une phosphorylation partielle de eIF-2 α est suffisante pour inhiber la quasi-totalité de l'activité de eIF-2B. C'est donc ainsi que la traduction protéique est inhibée par la protéine kinase ARN double brin dépendante [154]. La figure 4 illustre le mécanisme d'inhibition de eIF-2 α par PKR.

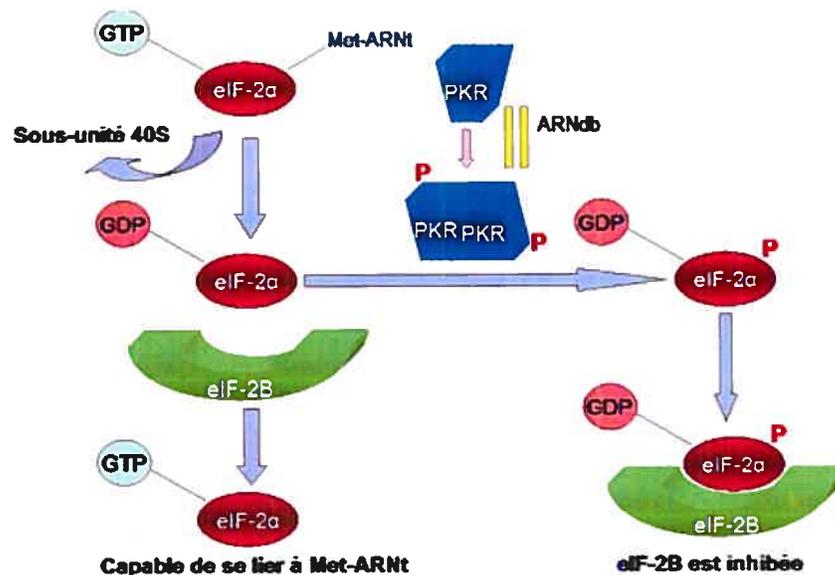


Figure 4 : Inhibition de eIF-2 α par PKR

1.2.4 Interféron

C'est en 1957 qu'Isaacs et Lindenmann ont découvert que des cellules en culture exposées à un virus partiellement inactivé pouvaient sécréter une protéine qui protégeait les cellules voisines contre l'infection par des virus infectieux [155]. Le nom interféron a été attribué à cette molécule puisque celle-ci interfère effectivement avec le cycle viral. Le rôle principal de l'interféron consiste donc à éviter la propagation et la multiplication des virus.

1.2.4.1 Gène et protéine

Le terme interféron (IFN) désigne une famille de cytokine composée de deux sous-classes distinctes interagissant chacune avec leur propre récepteur, les IFN de type 1 (α et β) et les IFN de type 2 (γ). Les IFN de type 1 sont exprimés par tous les types de cellules en réponse à une infection virale tandis que l'IFN de type 2 n'est exprimé que chez les cellules T et NK (*natural killer*) en réponse à une stimulation antigénique [152]. Notons que les monocytes sont la source majeure d'IFN α (15-20 kDa) et les autres types cellulaires, notamment les fibroblastes produisent majoritairement l'IFN β (20-25 kDa). La réponse à l'interféron de type 1 est immédiate tandis que l'activation du système immunitaire par l'IFN de type 2 est plus tardive, mais renforce l'action rapide de l'IFN de type 1 [155]. Il sera question ici de l'interféron produit en réponse à une infection virale, l'interféron de type 1.

L'interféron β est le produit d'un gène unique alors que 13 gènes constituent la famille des IFN α . Les interférons β et $\alpha 4$ sont les premiers à être sécrétés suite à l'initiation d'une infection virale, suivi de l'expression des autres membres de la famille des IFN α . Il semble que l'interféron α agisse comme un monomère, quant à l'IFN β , il fonctionnerait en tant qu'homodimère [155]. Des études chez la souris ont démontré que les membres de la famille des IFN α ne compensent pas pour la perte de l'IFN β , suggérant un rôle unique à l'IFN β essentiel pour une réponse optimale à l'infection virale [156].

1.2.4.2 Induction

L'ARN double brin intracellulaire fourni par le génôme viral ou formé à la suite de la transcription ou de la réplication du génôme viral est reconnu pour être l'inducteur de l'IFN α/β [157]. L'induction par de l'ARN db synthétique est connue pour avoir les mêmes effets sur la cellule et, dans un contexte expérimental, est souvent utilisée pour simuler une infection virale. Suite à une infection virale, IRF3 (55 kDa), un facteur de transcription cytoplasmique de la famille des IRF (*IFN regulatory factors*), constitutivement exprimé chez tous les types de tissu, est activé par phosphorylation à sa portion C-terminale sur des résidus sérine par une protéine kinase [158]. Des études très récentes suggèrent que la liaison de l'ARN bicaténaire au TLR3 (*toll-like receptor 3*) entraîne sa phosphorylation sur les résidus tyrosine et permettrait le recrutement de la voie PI3K-Akt pour l'activation de IRF3 [159]. La phosphorylation d'IRF3 va entraîner sa dimérisation et sa translocation au noyau où elle se liera à CBP/p300, un co-activateur transcriptionnel, pour former le complexe DRAF1 (*double strand RNA activated factor-1*) [155]. L'activation transcriptionnelle est dépendante de la formation de ce complexe qui se lie sur la séquence ISRE au niveau des promoteurs des IFN de type 1 pour permettre leur transcription. Des études récentes suggèrent que PKR est primordial pour l'induction de l'IFN β médiée par le réovirus chez des myocytes primaires [160]. En effet, comme il a été décrit précédemment, PKR, une fois activée, phosphoryle I κ B et, par conséquent permet la libération du facteur de transcription NF κ B qui active la transcription de plusieurs gènes antiviraux dont l'IFN β . Il est intéressant de noter que l'infection par réovirus permet l'activation de NF κ B [161].

Concernant l'induction de l'interféron par le réovirus, il semble que la capacité à induire ces molécules dépend de la souche virale et du type cellulaire ou de l'hôte infecté. Par exemple, chez les fibroblastes de souris en culture, le réovirus de sérotype 3 est un meilleur inducteur que le sérotype 1; il n'en reste pas moins que tous les sérotypes peuvent induire l'interféron [162]. Des études effectuées chez la souris ont démontré que l'induction de myocardite aigue par le réovirus corrèle avec la synthèse d'ARN viral et non avec la génération de virus infectieux dans les myocytes. Cette équipe propose que la capacité du réovirus à induire l'interféron

détermine en partie le potentiel de ce virus à causer la myocardite aigue [163]. Jusqu'à présent, il est impossible de définir exactement quel(s) gène(s) du réovirus ou quelle étape du cycle de multiplication détermine son potentiel inducteur d'interféron [162].

1.2.4.3 Mécanisme d'action

Une fois l'interféron synthétisé, il sera secrété dans le milieu extracellulaire où il pourra agir sur les cellules voisines en se liant à son récepteur spécifique. Malgré leur structure différente, les interférons de type 1 α et β se lient au même récepteur qui consiste en un hétérodimère de deux sous-unités : IFNAR-1 et IFNAR-2. La liaison de l'interféron sur le récepteur entraîne l'hétérodimérisation des deux sous-unités et la transduction du signal se fait par la voie de signalisation bien connue de JAK (*Janus family of tyrosine kinase*)/STAT (*signal transducer and activator of transcription*). Ce sont les protéines Tyk-2 et Jak-1 de la famille JAK qui sont liées respectivement aux sous-unités IFNAR-1 et IFNAR-2 [152]. Suite à l'hétérodimérisation, les tyrosine kinases deviennent actives par transphosphorylation et peuvent ensuite phosphoryler les résidus tyrosine au niveau de la queue cytoplasmique des récepteurs. Ces évènements conduisent à la phosphorylation, par Tyk-2 et Jak-1, de facteurs de transcription cytoplasmique latents de la famille STAT, dans ce cas, les membres Stat-1 et Stat-2. Ces deux facteurs de transcription de la famille STAT s'associent à l'un des membres de la famille IRF, IRF9 ou p48 pour migrer au noyau où ils se poseront sur les séquences ISRE dont il a été question préalablement. De cette façon, plus de 30 gènes seront induits, parmi ceux-ci, des facteurs de transcription de la famille IRF, IRF7 et IRF1 entre autres, vont amplifier la réponse en induisant une réponse secondaire [152].

1.2.4.4 Rôle comme agent anti-viral

L'interféron exerce son rôle antiviral par le biais des protéines qu'il induit suite à sa propre induction. Il a longtemps été admis que les effets antiviraux de l'interféron sont médiées par trois voies majeures : La protéine kinase ARN db dépendante (PKR), le système synthétase/RNase L et les protéines Mx [155]. Or des expériences menées sur des souris déficientes au niveau de ces trois voies démontrent

que celles-ci peuvent développer un état antiviral en réponse à l'interféron, suggérant l'existence de voies supplémentaires, notons entre autre la voie ADAR1 (*dsRNA-dependant adenosine deaminase*). L'effet antiviral de PKR, plus important pour la suite du mémoire, ayant déjà été discuté, je me limiterai à une brève description des autres voies.

Le système 2'-5' oligoadénylate synthétase/RNase L, voie la mieux étudiée après celle de PKR, mène à la dégradation de l'ARN et nécessite effectivement les enzymes 2-5A synthétase et RNase L. Suite à l'activation par l'ARN bicaténaire (cellulaire ou viral), la 2-5A synthétase va polymériser l'ATP en oligoadénylates par des liaisons 2'-5' (2-5A). La RNase L, une endoribonucléase cytoplasmique latente, devient active suite à la liaison de haute affinité avec les oligonucléotides 2-5A. L'activation de la RNase L va permettre la dégradation de l'ARN simple brin, dont l'ARN ribosomal 28 S et, par conséquent l'inhibition de la synthèse protéique. L'expression, la régulation et la fonction de ce système antiviral ont été énormément caractérisées chez des cellules infectées ou traitées à l'IFN [152].

Les protéines de la famille Mx sont des GTPases (capable de lier et d'hydrolyser le GTP) et cette activité intrinsèque est requise pour leur activité antivirale. On les appelle ainsi en référence à leur capacité d'inhiber la multiplication du myxovirus (Mx) de l'influenza. Chez l'humain, les deux formes les plus connues sont MxA et MxB. Les protéines Mx s'accumulent dans le cytoplasme des cellules infectées suite à l'induction par l'interféron de type 1 et interfèrent avec le cycle de réplication des virus à ARN notamment, les *Orthomyxoviridae* et les *Bunyaviridae* [164]. Ces protéines semblent détecter la structure nucléocapside virale lors de l'infection et par différents mécanismes, rendent cette structure incapable de poursuivre le cycle de multiplication. Par exemple, la protéine MxA s'associe à la nucléocapside du virus Thogoto, de la famille des *Orthomyxoviridae*, et l'empêche d'être transportée au noyau, le site de la transcription et de la réplication virale [164].

Enfin, la protéine ADAR reconnaît l'ARN bicaténaire comme un substrat, le déroule et remplace toutes les adénosines rencontrées par des inosines induisant plusieurs mutations et rendant l'ARN instable [152].

Notons que toutes ces voies peuvent être induites autant par l'interféron de type 1 que l'interféron de type 2.

1.2.5 Virus modulant l'activité de PKR

Malgré la multitude de mécanismes développés par la cellule pour contrer les infections virales, l'évolution a permis aux virus de développer des stratégies pour échapper aux défenses de l'hôte. Les facteurs viraux peuvent agir en inhibant la synthèse de l'interféron ainsi que la signalisation et les voies antivirales qu'elle induit. Seule la modulation de la voie antivirale de PKR sera décrite ici. Le tableau II présente différents virus ayant la capacité de moduler l'activité de PKR ainsi que leur mécanisme d'action. Les informations comprises dans le tableau sont revues à l'intérieur des références suivantes : [152, 155, 165].

Tableau II : Virus modulant l'activité de PKR et mécanisme d'action

<i>Cible d'action</i>	<i>Virus/Protéine ou ARN viral</i>	<i>Mécanisme</i>
Site de liaison à l'ARNdb	Adénovirus/ARN de VAI	Inhibiteur compétitif de l'ARNdb pour le site de liaison sur PKR
	EBV/ARN de EBER	Inhibiteur compétitif de l'ARNdb pour le site de liaison sur PKR
	Virus de la vaccine/E3L	Liaison à l'ARNdb et séquestration
	Virus de l'influenza/NS1	Liaison à l'ARNdb et séquestration
	Reovirus/ $\sigma 3$	Liaison à l'ARNdb et séquestration
	Rotavirus du groupe C/NSP3	Liaison à l'ARNdb et séquestration
	VIH/ARN de TAR et TRBP (<i>Tar binding protein</i>)	L'ARN de Tar serait un inhibiteur compétitif de l'ARNdb pour le site de liaison sur PKR et recrute TRBP à PKR TRBP se lie et séquestre

Dimérisation	Influenza	l'ARNdb Active un inhibiteur cellulaire de PKR, p58 ^{IPK} , qui se lie à PKR et empêche sa dimérisation
	Virus de l'hépatite C/NS5A	Empêche la dimérisation
	VIH/TRBP	Forme un hétérodimère avec PKR et empêche sa dimérisation
Interaction avec le substrat	Virus de la vaccine/K3L	Homologue de eIF-2 α , inhibe PKR (pseudosubstrat)
	VIH/Tat	Homologue de eIF-2 α , inhibe PKR (pseudosubstrat)
Expression/stabilité	Poliovirus	Protéolyse de PKR
	VIH/Tat	Diminue l'expression de PKR
Régulation de eIF-2α	Virus de l'herpès simplex/ICP34.5	Recrute une phosphatase cellulaire qui déphosphoryle et réactive eIF-2 α

1.2.6 Modulation de PKR par la protéine σ 3 du réovirus

En 1976, Huismans et Joklik identifient σ 3 comme étant la seule protéine du réovirus capable de lier l'ARN bicaténaire [67]. Quelques années plus tard, lorsqu'on démontra que des protéines non virales ayant la capacité de se lier à l'ARN double brin inhibent effectivement PKR, il fut tentant de rechercher ce phénomène pour la protéine majeure de la capsid externe du réovirus, σ 3. C'est ainsi qu'une association entre l'inhibition de PKR et la protéine σ 3 du réovirus fut établie [69]. L'inhibition de PKR est le résultat de la liaison et la séquestration de l'ARNdb par σ 3, puisque l'ajout d'ARNdb en excès permet d'outrepasser cette inhibition [69]. Une corrélation entre l'inhibition de la synthèse protéique et le gène S4, codant pour σ 3 avait été démontrée au préalable [166]. Des études subséquentes ont permis de constater la capacité de la protéine σ 3 à remplacer des inhibiteurs viraux connus de PKR, notamment la protéine E3L du virus de la vaccine et l'ARN VAI d'adénovirus [70, 71].

La liaison de σ 3 à l'ARN bicaténaire est indépendante de la séquence de l'ARN et se produirait à la région C-terminale de la protéine par l'intermédiaire de deux motifs

constitués de répétition d'acides aminés basiques [68, 167-169]. Il a été suggéré par la suite que le deuxième motif, en C-terminal du premier, est plus important pour l'interaction ARN-protéine [168]. Des études récentes suggèrent que $\sigma 3$ se lierait à l'ARN db sous forme de dimère [170]. La région N-terminale, comportant une structure en doigt de zinc, est quant à elle impliquée dans la liaison à $\mu 1$, l'autre protéine majeure de la capsid [171, 172]. Une mutation dans la région C-terminale de $\sigma 3$ qui altère sa liaison à l'ARNdb n'a que peu d'effet sur l'interaction $\mu 1$ - $\sigma 3$ et inversement, une mutation en N-terminal de la protéine affecte sa liaison à $\mu 1$, mais pas à l'ARN bicaténaire [72, 173]. Par ailleurs, il semble être établi que la liaison à l'ARN bicaténaire et l'association $\sigma 3$ - $\mu 1$ sont deux événements mutuellement exclusifs [72, 167]. Lorsque $\mu 1$ et $\sigma 3$ sont co-exprimées à l'intérieur de cellules transfectées, $\sigma 3$ perd sa capacité à stimuler la traduction, le complexe $\sigma 3$ - $\mu 1$ ne pouvant lier l'ARN bicaténaire [47, 67]. Dans le même ordre d'idée, il a été démontré que l'efficacité de traduction cellulaire est déterminée par le niveau de la protéine $\sigma 3$ non complexé à $\mu 1$ dans les régions cytoplasmiques traductionnellement actives [73]. Aussi, il a été suggéré que la portion N-terminale de $\sigma 3$ peut diminuer l'affinité de la protéine à l'ARNdb [167]. Ces résultats suggèrent un modèle où l'efficacité de liaison à l'ARN bicaténaire et, par conséquent, la capacité d'inhibition de PKR, serait inversement corrélée à l'efficacité d'assemblage de la particule virale [72].

1.2.7 Réovirus et sensibilité à l'interféron

Parmi les voies antivirales induites par l'interféron, PKR est considérée comme le facteur intracellulaire principal qui interfère avec la multiplication du réovirus [162]. Les isolats classiques de réovirus montrent une sensibilité limitée à l'interféron, sensibilité pouvant varier entre les souches [162]. Ce phénomène origine du fait que la protéine $\sigma 3$ du réovirus a la capacité d'inhiber PKR en séquestrant l'ARN bicaténaire [174]. Malgré l'inhibition de PKR par la protéine $\sigma 3$, il semble que les réovirus ne soient pas protégés contre de hauts niveaux de cette protéine kinase activée tel qu'observés chez des cellules non transformées ou chez des

cellules traitées à l'interféron. Par ailleurs, l'effet de l'interféron sur la multiplication du réovirus varie d'un type cellulaire à un autre et, chez certains types cellulaires, la réplication du réovirus n'est pas inhibée de façon significative [162]. À titre d'exemple, l'interféron ne semble pas conférer une protection contre l'infection chez les cellules SC1, des fibroblastes de souris, qui sont permissives à l'infection par le réovirus, mais souvent infectées de façon persistantes [120, 175]. Étonnamment, PKR est induite à de hauts niveaux suite au traitement à l'interféron, pourtant l'activité anti-virale est absente [175]. Comme il a été discuté antérieurement, la capacité d'un virus à lier l'ARN bicaténaire avec une grande affinité confère à ce virus une meilleure résistance à l'interféron et, partant, à PKR. De la même façon, un virus pouvant lier $\mu 1$ avec une très grande affinité serait plus sensible à l'interféron. Rappelons que ces deux évènements de liaison sont mutuellement exclusifs.

1.2.7.1 Hypersensibilité à l'interféron et souche P4L-12

Tout récemment, une souche hypersensible à l'interféron, P4L-12, a été isolée dans notre laboratoire suite au traitement du réovirus (sérotypage 3 Dearing) sauvage à la nitrosoguanidine (agent mutagène) [176]. Chez cette souche, l'effet inhibiteur sur la synthèse des protéines virales est observé à des concentrations beaucoup plus faibles d'interféron, alors que la diminution du titre viral est plus de 100 fois supérieure à ce qui est observé avec la souche sauvage du virus à concentration saturante d'interféron. Cet isolat de réovirus présente aussi la particularité d'être incapable de se multiplier chez des cellules NIH-3T3 non transformées et ce, même à de très hautes multiplicités d'infection. Ce phénomène n'est pas observé chez le virus de type sauvage qui, à de hautes multiplicités d'infection, réussit à contourner les mécanismes de résistance. Manifestement, la transformation de ces cellules par l'oncogène *ras* interfère avec l'activité de PKR et permet au réovirus de se multiplier, d'où son potentiel oncolytique [177, 178]. Non seulement la synthèse protéique de P4L-12 est fortement inhibée chez les cellules NIH-3T3, mais il semblerait aussi qu'elle soit plus efficace chez les cellules transformées par *ras*, lorsque comparée au virus de type sauvage. Cette observation pourrait indiquer que l'interaction $\mu 1$ - $\sigma 3$ est plus forte chez ce mutant au détriment de la capacité de celui-

ci à fixer l'ARN bicaténaire et à inhiber PKR. L'analyse de la séquence de P4L-12 montre effectivement une mutation au niveau du segment S4 codant pour $\sigma 3$ et une autre à l'intérieur du gène M2, codant pour $\mu 1$. Des études plus poussées permettront d'établir une corrélation entre les mutations observées et le phénotype d'hypersensibilité à l'interféron et de déterminer si ce phénotype est effectivement associé à un assemblage plus efficace de la particule virale.

1.2.7.2 Résistance à l'interféron et souche ts453

Les premières études sur le mutant thermosensible ts453 ont démontré une altération dans l'assemblage de sa capsid externe à température non permissive [179]. En effet, il apparaît que lorsque $\sigma 3$, la protéine thermosensible, est co-exprimée avec $\mu 1$, l'interaction est absente et il n'y a pas d'accumulation de $\mu 1C$ [68]. Des études subséquentes ont pu mettre en évidence une relation entre la substitution N16K près du motif de liaison au zinc, et une meilleure affinité pour l'ARN double brin [72]. Ceci se traduit effectivement par une résistance accrue de la synthèse des protéines virales à l'interféron lors de l'infection à température non permissive [72].

1.3 Réovirus, un agent oncolytique naturel

Le potentiel oncolytique de réovirus a été mis en évidence pour la première fois en 1977, lorsqu'une équipe démontra la sensibilité à l'infection au réovirus de cellules transformées (humaines et murines) et la résistance de cellules normales, non transformées (humaines et murines) [180]. Puis, un an plus tard, d'autres études viennent supporter les premières données en démontrant que des cellules fibroblastiques embryonnaires de poumon humain, WI-38, manifestent une sensibilité à l'infection par le réovirus lorsque transformées par l'antigène grand T de SV-40 [181]. En fait, il semble que le virus soit lytique chez les cellules transformées, et persiste sans cytopathologie chez les cellules normales. Les mécanismes moléculaires sous-tendant ces observations étaient alors inconnus. La capacité d'un virus, à lyser préférentiellement les cellules transformées fut observée au préalable pour d'autres virus. De même, la possibilité d'utiliser un virus comme agent oncolytique naturel, avait été émise [182]. Des lignées cellulaires de souris

(NR6 et B82) résistantes à l'infection par le réovirus, et n'exprimant pas EGFR (*epidermal growth factor receptor*) devenaient permissives lorsque transfectées avec le gène codant ce récepteur [102]. Dans le même ordre d'idée, des cellules NIH-3T3 (fibroblastes de souris), résistantes à l'infection par le réovirus de sérotype 3 Dearing, affichaient une sensibilité hautement significative lorsque transfectées avec l'oncogène *v-erbB* [177]. Ces études proposent donc un mécanisme par lequel l'efficacité de l'infection serait due à l'utilisation opportuniste par le réovirus d'une voie de transduction de signal déjà activée [177]. Des études ultérieures ont permis de faire un pas énorme dans la compréhension des bases moléculaires qui régissent la sensibilité des cellules transformées à l'infection par le réovirus. Effectivement, il a été démontré que la transformation des cellules NIH-3T3 avec l'oncogène *H-ras* ou tout autre élément de la voie de signalisation de Ras notamment *v-erbB* et *sos*, rend ces cellules sensibles à l'infection [178]. La clé de cette sensibilité réside dans le fait que l'activation de la voie de signalisation de Ras inhibe, par un mécanisme encore inconnu, PKR (protéine inhibitrice de la traduction). En fait, il semble que les transcrits primaires du réovirus sont présents à la fois chez les cellules NIH-3T3 transformées et les cellules parentales, l'inhibition ayant lieu au niveau de la traduction [178]. Parallèlement, il a été établi que PKR est activée chez les cellules non transformées suite à l'infection et à la génération de transcrits par le réovirus, phénomène non observé chez les cellules NIH-Ras. De même, l'infection de cellules NIH-3T3 suite à leur exposition au 2-aminopurine (inhibiteur de PKR) ou l'infection de cellules de souris *knock out* pour PKR, résultent en une synthèse de protéines virales nettement augmentée [178].

1.3.1 La protéine Ras structure et fonction

La superfamille Ras de GTPases consiste en plusieurs sous-familles dont l'une d'elles est nommée Ras et comprend 5 sous-groupes. Le sous-groupe Ras est composé des protéines Harvey (H)-Ras, Kirsten (K)-Ras 4A, Kirsten (K)-Ras 4B et N-Ras, protéines similaires ayant un poids moléculaire de 21 kDa et, de fait, elles sont aussi appelées p21 Ras [183]. La différence entre ces isoformes se trouve au niveau d'une région hypervariable à l'intérieur de 25 acides aminés se situant à

l'extrémité C-terminale de la protéine. Effectivement, au niveau de cette région, il n'y a que 15% d'homologie entre les 3 isoformes tandis que de 90-100% d'homologie est observée du côté N-terminal de la protéine Ras [184]. Les protéines K-Ras 4A et 4B sont le produit d'un épissage alternatif. Il y a manifestement de la redondance entre ces différents isoformes; par contre, l'absence du gène *K-ras* est non-viable pour la souris contrairement aux deux autres gènes [185]. De plus, K-Ras est l'isoforme le plus souvent muté chez les cancers humains [183]. Outre ce sous-groupe composé de ces 4 protéines fréquemment mutées dans les cancers humains, les sous-groupes R-Ras, M-Ras, Rap et Ral font aussi partie de cette sous-famille et partagent 40-50% d'homologie avec la p21 Ras [186]. Afin de faciliter la lecture et d'éviter une ambiguïté, lorsque non spécifié, le terme protéine Ras sera utilisé pour faire référence aux 4 isoformes de la p21 Ras.

La protéine Ras, une petite GTPase, est ubiquitaire et localisée à la face interne de la membrane plasmique, ancrée à celle-ci par un groupement farnesyl dont l'ajout est catalysé par la farnesyl transferase, reconnaissant le motif d'acides aminés conservés CAAX (C :cystéine, A :aliphatique, X :acide aminé quelconque) à l'extrémité C-terminale de la protéine [184]. La protéine Ras régule en fait la croissance cellulaire, la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Elle se trouve à l'intérieur de la cellule sous forme active, associée au GTP, ou inactive, liée au GDP. Une famille de protéines, appelées GEFs (*guanine nucleotide exchange factor*), induit la dissociation du GDP pour permettre l'association au GTP qui est plus abondant. Le GTP est à son tour hydrolysé en GDP par l'activité GTPase intrinsèque de la protéine Ras en combinaison avec la protéine GAP (*GTPases-activating proteins*) [187]. Une seule modification au codon 12, 13 ou 61 au niveau du proto-oncogène *ras* transforme celui-ci en oncogène; la protéine qui en résulte montre une activité GTPase intrinsèque diminuée et reste donc bloquée sous sa forme active, liée au GTP. De cette façon, la transduction de signal a lieu de façon constitutive menant graduellement à la transformation de la cellule [188].

1.3.2 Voie de signalisation de Ras

Le rôle principal de la protéine Ras est donc de transduire un signal provenant des récepteurs tyrosine kinase jusqu'au noyau où il y aura transcription de gènes. La liaison du récepteur à son ligand, soit une hormone ou un facteur de croissance, entraîne la dimérisation et l'activation du récepteur par autophosphorylation des résidus tyrosines. Les membres de la familles des EGFR, les proto-oncogènes *c-erb* B1, B2 (aussi appelé *her2-neu*) et B3, ainsi que la famille PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*) qui comprend le proto-oncogène *c-sis* font partie des récepteurs tyrosine kinase qui activent la protéine Ras et peuvent donc être potentiellement des oncogènes. Effectivement, des formes mutées de ces récepteurs se trouvent exprimées dans certains cancers et sont caractérisées par une activation constitutive, secondaire à une dimérisation et une autophosphorylation constitutive, indépendamment de la liaison avec leur ligand. Les phosphotyrosines de ces récepteurs deviennent donc des sites de liaison des molécules adaptatrices dont Grb-2 (*growth-factor-receptor-bound protein 2*) qui s'y lie via son domaine SH2. Cette association permet ensuite l'activation d'une RasGEF, la protéine Sos (*Son of Sevenless*) qui, suite à sa liaison aux deux domaines SH3 de la molécule Grb-2, devient activée et acquiert la capacité d'activer Ras en permettant la dissociation du GDP et l'association subséquente du GTP. Dans sa conformation active, liée au GTP, la protéine Ras se lie et active plusieurs protéines effectrices. Parmi celles-ci, trois classes de protéines effectrices ont été bien décrites : les membres de la famille Raf (Raf-1, B-raf et A-raf), la p85-p110 phosphatidylinositol 3 kinase (PI3-K) et les membres de la famille RalGEF (RalGDS, RIF et Rgl) [187].

Les membres de la famille Raf, des sérines/thréonine kinases, sont certainement les effecteurs de la protéine Ras les mieux connus et documentés. Suite à son activation, Ras se lie à l'extrémité N-terminale de Raf, la dirigeant du cytosol à la membrane cytoplasmique. Par son domaine C-terminal, Raf se lie, phosphoryle de façon sélective et active les MAPKK, MEK-1 et MEK-2. MEK-1 et MEK-2 sont des kinases de spécificité mixte qui phosphorylent les résidus tyrosine et thréonine et activent les MAPK du sous-groupe ERK, ERK-1/p44 et ERK-2/p42. Ces protéines phosphorylent leurs substrats sur des motifs Ser/Thréonine-Proline et ont la capacité

d'activer une multitude de protéines cytoplasmiques et nucléaires, parmi ces substrats notons le facteur de transcription EIK-1 [189].

Les membres de la famille RalGEF sont activés via la liaison à la forme activée de Ras, Ras-GTP. Les RalGEF, tout comme les RasGEF permettent la dissociation du GDP et l'association subséquente du GTP, mais cette fois sur la protéine Ral, une GTPase de la superfamille Ras. La forme Ral-GTP se lie à la protéine Ral-BP1 (*Ral-binding protein-1*) qui agit comme une GAP (*GTPase-activating proteins*) pour les GTPases CDC42 et Rac, GTPases impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine et dans les voies SAPK/JNK et p38. P38 active le facteur de transcription ATF-2 et, SAPK/JNK active les facteurs de transcriptions c-Jun, ATF-2 et Elk-1 [189].

La Ras-GTP se lie et active aussi le domaine catalytique de PI3-K. Les seconds messagers lipidiques produits activent les kinases dépendantes des phosphoinositides, PDK-1 et PDK-2, qui activent ensuite la kinase Akt. La voie médiée par PI3-K est impliquée dans les signaux mitotiques (synthèse d'ADN), l'inhibition de l'apoptose, la sécrétion et le trafic intracellulaire des vésicules et la régulation des fonctions de l'actine et de l'intégrine [189].

Il existe des différences *in vitro* dans la capacité des différents isomères de Ras à activer un effecteur plutôt qu'un autre. En effet, il semble que K-Ras soit un meilleur activateur de Raf-1 et que H-Ras ait plus d'affinité pour PI3-K. De plus, les trois effecteurs décrits ci-haut n'ont pas le même potentiel transformant, RalGEF étant suffisant à l'induction de la transformation chez des cellules humaines, tandis que Raf est le plus efficace pour la transformation de cellules de souris [190]. La figure 5 illustre les principales protéines effectrices de la voie de signalisation de Ras.

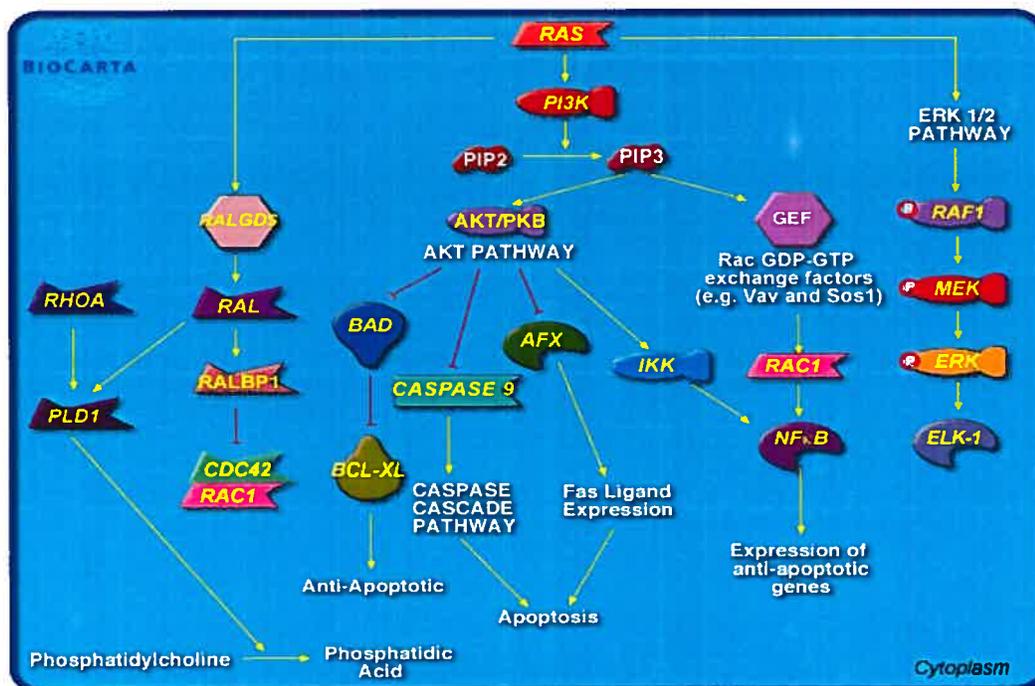


Figure 5 : Voie de signalisation de Ras⁴

Enfin, des études récentes ont démontré qu'une infection productive par le réovirus chez des cellules transformées par *ras* nécessite les éléments RalGEF et p38 [191]. Dans un premier temps, la question a été abordée par l'utilisation de trois formes actives de la protéine Ras : RasV12C40, qui a perdu la capacité de se lier à Raf et à RalGEF, mais qui peut se lier à PI3-K, RasV12G37 qui peut seulement activer RalGEF et RasV12S35 qui peut seulement stimuler Raf. Les résultats démontrent que les mutants RasV12C40 et RasV12S35 sont beaucoup moins permissifs à la synthèse des protéines du réovirus que ne l'est le mutant RasV12G37, mettant en évidence l'importance de RalGEF dans l'infection par le réovirus. Ces résultats supportent des études préalables où il avait été démontré que des inhibiteurs de MEK ne bloquent pas l'infection par le réovirus [178]. De plus, il a été démontré que l'activation de la protéine Rlf, un membre de la famille des RalGEF, dans des cellules NIH-3T3 rend ces cellules permissives à l'infection par le réovirus. Des cellules transformées par H-*ras* et transfectées avec un mutant transdominant négatif de Ral ne peuvent permettre l'infection par le réovirus. Enfin, il a été démontré, par

⁴ Tiré de <http://www.biocarta.com>

l'utilisation de différents inhibiteurs, que le réovirus nécessite la protéine p38 et non l'activité de la JNK pour sa réplication [191]. Il semble que p38 puisse réguler la synthèse protéique, et que cette protéine soit activée dans bon nombre de cancers. Plusieurs éléments restent à élucider et la complexité de cette voie promet de nombreuses études à venir. Encore aujourd'hui, le mécanisme par lequel cette voie inhibe PKR est encore inconnu.

1.3.3 Ras, cancers humains et réovirus

Environ 30% des cancers humains impliquent des mutations directement au niveau des proto-oncogènes H-, N- ou K-*ras* sur les acides aminés 12, 13 ou 61 [183]. Par ailleurs, comme la voie de signalisation de Ras peut être activée par d'autres éléments en l'absence de mutation de la protéine Ras, cela suggère qu'un pourcentage plus élevé de cancer pourrait éventuellement être traité par le réovirus. Le tableau III montre le pourcentage de différents types de cancer associés à une voie de signalisation de Ras activée.

Tableau III : Pourcentage des types de cancer associé à un gène muté de la voie de signalisation de Ras

<i>Type de Cancer</i>	<i>Pourcentage/gène muté</i>	<i>Référence</i>
<i>Adénocarcinome du pancréas</i>	80-90% K- <i>ras</i>	[183, 192]
<i>Adénocarcinome du sein</i>	~30% c- <i>erbB-2/HER2/neu</i>	[193, 194]
<i>Adénocarcinome du poumon et carcinome du poumon à grandes cellules</i>	22% K- <i>ras</i>	[192]
<i>Carcinome colorectal</i>	36-50% K- <i>ras</i>	[183, 192]
<i>Carcinome folliculaire et carcinome non différencié de la thyroïde</i>	~55% H, K et N- <i>ras</i>	[183, 192]
<i>Carcinome ovarien</i>	23% K- <i>ras</i>	[192]

<i>Carcinome de la prostate</i>	~ 50% <i>c-erbB-2/HER2/neu</i> ⁵	[195]
<i>Gliome</i>	40-50% PDGFR et EGFR ⁶	[196]
<i>Leucémie myéloïde aigue</i>	20-30% N et K- <i>ras</i>	[192]
<i>Leucémie myélomonocytaire chronique</i>	50-70% N et K- <i>ras</i>	[192]
<i>mélanome</i>	70% B- <i>raf</i>	[197]
	10-20% N- <i>ras</i>	[183, 197]
<i>Myelome multiple</i>	30-40% N et K- <i>ras</i>	[192]

Étant donné la multitude de cancer présentant une voie de signalisation de Ras activée, plusieurs études ont été menées dans le but d'examiner le potentiel oncolytique du réovirus chez un grand nombre de cellules cancéreuses humaines. Ainsi, la capacité du réovirus à faire régresser des tumeurs établies suite à l'injection de cellules humaines de glioblastome (U87) ou de cellules NIH-3T3 transformées par *v-erbB*, chez des souris immunosupprimées a été démontrée. Au cours de la même étude, le potentiel du réovirus à détruire une tumeur, originant de fibroblastes de souris transformés par l'oncogène *ras*, implantée chez une souris immunocompétente syngénique, a été vérifié et confirmé [196]. La préexistence d'anticorps contre le réovirus chez l'animal n'a pas altéré l'effet oncolytique, fait intéressant puisque 70% des êtres humains adultes dans les pays industrialisés ont des anticorps contre le réovirus. Plus tard, des études effectuées sur différentes lignées de cellules gliales malignes humaines montrent que le réovirus a la capacité de tuer 83% des lignées, que celui-ci peut détruire une tumeur originant de ces cellules chez un modèle de souris, et enfin qu'il a la capacité de détruire 100% des spécimens de culture primaire provenant de gliomes humains [198]. Dernièrement, une équipe a étudié la capacité du réovirus à lyser des gliomes (tumeurs des cellules gliales du cerveau) chez des rats et des primates non humains immunocompétents. Les résultats qui en découlent montrent que l'injection intracrânienne de réovirus permet non seulement de détruire

⁵ Les données peuvent varier selon les études.

⁶ PDGFR: *Platelet-derived growth factor receptor* et EGFR: *epidermal growth factor receptor*

la tumeur, mais est aussi sécuritaire; l'inoculation n'engendre pas de neurotoxicité, d'encéphalite ou d'anomalie comportementale chez ces animaux [199]. De plus, il a été démontré que le réovirus est actif contre des lignées cellulaires humaines de carcinomes ovarien et du colon, soit en culture soit implantées sous forme de tumeur chez la souris [200]. Ces travaux ont aussi permis de déceler, chez ces différentes lignées cellulaires, une activité de Ras qui est effectivement plus élevée que chez les cellules normales de même origine [200]. L'activité oncolytique du réovirus a été mise en évidence une fois de plus lorsque sa capacité à lyser des cellules cancéreuses du sein a été examinée. De fait, les résultats indiquent que le réovirus se réplique efficacement dans ces lignées cancéreuses, qu'il a la capacité de faire régresser des tumeurs humaines implantées chez la souris, qu'il peut cibler des tumeurs distantes du site d'injection, et enfin qu'il est capable de se répliquer dans des cellules humaines tumorales primaires du sein [201]. Des travaux du même type sur des lignées cancéreuses pancréatiques humaines, où *K-ras* est fréquemment muté, soulignent une fois de plus la propension de ce virus à tuer les cellules transformées par *ras* [202]. D'autres études indiquent que les lignées cellulaires de lymphomes, notamment le lymphome de Burkitt et le lymphome à grandes cellules B, ainsi que des cultures primaires de lymphomes humains, sont permissives à l'infection par le réovirus tandis que d'autres sont résistantes [203]. Ces types de cancer présentent rarement des mutations au niveau du proto-oncogène *ras* ou d'un élément de sa voie de signalisation, mettant en évidence la possibilité que d'autres facteurs contribuent de façon indirecte à activer la protéine Ras [183, 203]. De même, bien que peu de choses soient connues au sujet de l'état de Ras chez les médulloblastomes (tumeurs hautement malignes du cerveau), le réovirus semble efficace contre ce type de cancer et permet de réduire les métastases à la moelle épinière [204]. En outre, le réovirus s'avère actif contre les métastases au système nerveux central secondaire à un cancer du sein, phénomène commun chez les patients ayant un cancer du sein [205]. Des données récentes suggèrent que l'utilisation systémique de réovirus (injection par voie intraveineuse) pour traiter des cancers métastatiques, combinée à l'emploi d'immunosupresseurs, permet une meilleure réduction de la tumeur ainsi qu'un allongement considérable de la survie de la souris, comparée à la thérapie virale seule

[206]. Des travaux additionnels portant sur des carcinomes de la vessie, suivant un modèle *in vitro* de cancer de la vessie ou *in vivo* par administration intravesicale chez le rat, montrent que le réovirus est efficace contre ce type de cancer [207, 208]. Enfin, l'utilisation du réovirus *ex vivo* dans le but de libérer les cellules souches hématopoïétiques humaines de toute trace de cellules cancéreuses pour une transplantation autologue subséquente représente une avenue intéressante [209].

1.4 Les cathepsines et réovirus

Comme il a préalablement été décrit, la protéolyse du virion pour générer des ISVPs à l'intérieur des endosomes tardifs et des lysosomes est une étape clé pour une infection productive [63, 210]. Ce phénomène de protéolyse est dépendent du faible pH retrouvé dans ces compartiments puisque le traitement des cellules avec des agents augmentant le pH des endosomes (chlorure d'ammonium), ou avec des inhibiteurs de la H⁺-ATPase de type vacuolaire (bafilomycine ou concanomycine A), bloquent l'infection par les virions, mais permet l'infection par les ISVPs [63, 123, 211]. Il a été proposé que des protéases telles que les cystéines protéases lysosomales dépendantes d'un faible pH, notamment les cathepsines B, H et L sont impliquées dans la décapsidation du réovirus [64]. En effet, l'inhibition de ces protéases par le E64, un inhibiteur des cystéines protéases, permet l'infection par les ISVPs tandis que la réplication des virions est inhibée [64]. Des études subséquentes semblent démontrer que la pepstatine A, un inhibiteur des protéases aspartiques lysosomales telle que la cathepsine D, n'a pas d'effet sur la réplication du réovirus à l'intérieur des cellules L929 et MDCK [212]. Cette même étude démontre que la protéine $\sigma 3$ du réovirus est un pauvre substrat pour la cathepsine D *in vitro*, probablement dû à l'inaccessibilité de la région sensible aux protéases de $\sigma 3$. Fait intéressant, la mutation Y354H dont il a été question précédemment (voir les pages 24 et 25) est suffisante pour conférer à la protéine $\sigma 3$ une sensibilité à la cathepsine D, supportant l'idée qu'une altération de la structure de $\sigma 3$ puisse sensibiliser à l'action de la protéase [128, 129]. L'importance des cathepsines a été une fois de plus mise en

évidence lorsqu'on démontre que des cellules mutantes, les cellules LX, sélectionnées suite à une infection persistante par le réovirus présentent une altération dans la maturation de la cathepsine L [125]. Les mêmes travaux suggèrent que la cathepsine L est suffisante pour médier la décapsulation du virus. Puis, le rôle des différentes cathepsines se clarifie lorsque l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des cathepsines L et B ainsi que des cellules déficientes pour l'une ou l'autre de ces cathepsines permet de démontrer i) que l'inhibition de la cathepsine L altère de façon significative la décapsulation et donc la réplication virale, ii) que l'inhibition de la cathepsine B n'altère en aucun cas la capacité du virus à se décapsider et enfin iii) que l'inhibition de ces deux cathepsines ne permet pas la décapsulation et donc la réplication du virus [213]. Les mêmes travaux indiquent une efficacité supérieure de la cathepsine L pour la décapsulation du réovirus *in vitro* comparée à la cathepsine B. Récemment, il a été démontré que la cathepsine B, bien que retrouvée dans sa forme active, est inhibée chez les cellules LX [214]. En effet, la forme mature de la cathepsine B est séquestrée dans un complexe à haut poids moléculaire dans un état inactif. Ce même complexe existe chez les cellules L929 non mutées, ce qui suggère qu'une altération de la séquestration serait responsable de l'inhibition de cette protéase chez les cellules LX [214]. Il est important de considérer que l'expression des protéases, leur degré d'efficacité, les types de protéases exprimées, le transport endocytaire et bien d'autres éléments peuvent différer d'un type cellulaire à un autre. En effet, certaines cellules résistantes à l'infection par le réovirus peuvent devenir sensibles suite à un traitement par des protéases exogènes [215]. Par exemple, les cellules humaines de leucémie, HL-60, ne permettent pas la réplication du réovirus en absence de protéases exogènes et, fait intéressant, semblent avoir un pH lysosomal plus élevé que les cellules L929, cellules permissives à l'infection par le réovirus [215]. Aussi, chez les cellules P388D, des cellules s'apparentant aux macrophages, l'infection par le réovirus est inhibée par un large spectre d'inhibiteurs de cystéines protéases, mais pas par le chlorure d'ammonium. Des études approfondies ont démontré que la cathepsine S, une cystéine protéase indépendante d'un faible pH, permet la réplication du réovirus en présence de chlorure d'ammonium chez ce type de cellule [65]. Les auteurs suggèrent que la dépendance à un faible pH durant

l'infection au réovirus reflète l'importance d'un pH acide pour la majorité des protéases lysosomales.

Des études sur la protéine $\sigma 3$ montrent que plusieurs protéases sous différentes conditions ont la capacité de cliver au niveau de régions hypersensibles (*HSRs*) de $\sigma 3$ à des étapes précoces de la décapsidation [76]. Cette étude ajoutée à des travaux ultérieurs, montrent que le clivage de cette protéine est un processus incluant plusieurs étapes, un peu comme une cascade d'évènements qui implique plusieurs déterminants moléculaires [76, 77].

1.4.1 Les cystéines protéases

Les cystéines protéases lysosomales incluent les cathepsines B, C, F, H, O et X, qui sont exprimées de façon ubiquitaire, et les cathepsines K, S et V dont l'expression est restreinte à certains tissus [216]. D'abord, ces protéases sont synthétisées et glycosylées de façon cotraductionnelle au niveau de reticulum endoplasmique rugueux en tant que préprocathepsines. Elles se lient au récepteur du mannose-6-phosphate (MPR), au sein de l'appareil de Golgi, permettant leur transport aux compartiments endocytaires. Dans les compartiments prélysosomaux, lorsque le pH s'acidifie, les proenzymes sont relâchées du MPR et sont clivées en une seule chaîne. Ensuite, pour les cathepsines L et B, un clivage subséquent résulte en deux chaînes, une chaîne lourde et une chaîne légère [217]. *In vitro*, les cathepsines B et L semblent détenir les mêmes fonctions, bien que la cathepsine L soit une meilleure endopeptidase. *In vivo*, il semble y avoir une complémentarité entre ces deux enzymes [218]. Les cathepsines B, H et L sont les cystéines protéases les plus abondantes chez les fibroblastes [214].

Malgré leur grand nombre, les cathepsines ont des fonctions spécifiques souvent restreintes à certains tissus et, pour les cathepsines ubiquitaires, elles peuvent être impliquées dans des processus plus spécialisés à l'intérieur d'un même tissu [216].

1.4.2 Cathepsines, mutation dans *ras* et cancer

Il a été démontré que des mutations au niveau du proto-oncogène *ras* entraînent une augmentation de l'expression de certaines cathepsines, notamment, les cathepsines B et L. D'abord, chez des cellules NIH-3T3 transformées par l'oncogène

H-ras, une augmentation de l'expression des cathepsines L et B ainsi qu'une diminution de l'activité de leur inhibiteur sont observées [219]. Aussi, les carcinomes colorectaux présentant une mutation dans le gène *K-ras* ont une augmentation des niveaux d'expression des cathepsines L et B [220]. Lorsque des cellules épithéliales du sein sont transfectées avec l'oncogène *H-ras*, une augmentation de la sécrétion de la cathepsine B est observée [218]. De hauts niveaux d'ARNm et de protéines pour la cathepsine B sont aussi retrouvés dans une multitude de cancers, notons entre autre les carcinome de la prostate, carcinome colorectal, mélanome, carcinome ovarien, carcinome du poumon et gliome. De même, dans plusieurs cancers, une localisation altérée, souvent à la périphérie de la cellule, est observée pour la cathepsine B [218]. D'autres études sur la cathepsine L montrent que celle-ci est fortement régulée par le proto-oncogène *ras*. En effet, un adénocarcinome de l'œsophage où une mutation au codon 12 de *K-ras* a été décelée, présente une surexpression de 58% de la cathepsine L [221]. Ces différents résultats, et bien d'autres, ne sont pas surprenants quant à la surexpression de ces protéases dans différents cancers puisque ces haut niveaux d'expression de protéases corrélerent avec le potentiel invasif d'un cancer et, par conséquent sa capacité à faire des métastases [222-224].

Enfin, bien que peu de résultats aient été présentés à cet effet, le rôle important que jouent les cystéines protéases au niveau de la décapsidation du réovirus et leur surexpression observée suite à une mutation de *ras*, ont amené certains chercheurs à proposer que ceci pourrait expliquer en partie le pouvoir oncolytique du réovirus [215].

1.5 Projet de recherche

Les travaux présentés dans cet ouvrage permettront dans un premier temps d'apporter des informations supplémentaires sur les facteurs qui définissent la sensibilité au réovirus des cellules NIH-3T3 transformées par l'oncogène H-*ras*. Ainsi, les étapes de décapsidation et la sensibilité à divers inhibiteurs de l'activité des protéases seront évaluées afin de déterminer si effectivement la transformation par l'oncogène *ras* a un rôle à jouer à des étapes aussi précoces du cycle de multiplication que l'entrée du virus. Ensuite, l'objectif général de cette étude sera d'examiner les déterminants de sensibilité à l'infection par le réovirus chez plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines en comparant un réovirus de type sauvage (H8-2), un réovirus hypersensible à l'interféron (P4L-12) et un réovirus ayant une sensibilité augmentée à la décapsidation par des protéases intracellulaires (PI3-1). Pour ces trois souches virales, la capacité à synthétiser les protéines virales, l'efficacité de l'infection et la capacité à tuer les cellules cancéreuses qu'elles infectent seront examinées.

Enfin, nous pourrons, dans un avenir prochain être capable de déterminer laquelle des souches virales, selon ses caractéristiques propres, permettra d'offrir un traitement optimal pour un cancer donné. Il pourrait être aussi possible de rassembler dans un même virus, par la production de recombinants, des fonctions qui pourront augmenter le potentiel oncolytique de ce virus.

Chapitre 2 – Matériel et Méthodes

2.1 Virus et cellules

2.1.1 Virus

2.1.1.1 Réovirus sérotype 3 (Dearing)

Le lot original a été obtenu de ATCC (*American type culture collection*) et a été propagé sur des cellules L929 à une multiplicité d'infection d'une unité formatrice de plaque (UFP) par cellule.

2.1.1.2 P4L-12

Cet isolat a été généré au laboratoire et a été décrit préalablement, tel que discuté en introduction [176]. Brièvement, ce virus a été obtenu suite au traitement de cellules L929, infectées par le réovirus sérotype 3 (Dearing), avec 200 µg/ml de nitrosoguanidine. Le virus récupéré a ensuite été titré selon la méthode $DICT_{50}$ et amplifié par 4 passages consécutifs sur des cellules L929. Puis, une technique d'isolement par plaque de lyse a été utilisée pour récupérer différents clones dont cet isolat faisait partie, isolat sélectionné pour son hypersensibilité à l'interféron et une meilleure discrimination entre les cellules NIH-3T3 parentales et transformées par Ras.

2.1.1.3 H8-2

La souche H8-2 a également été générée au laboratoire et, constitue en fait un clone du réovirus sérotype 3 (Dearing) de type sauvage puisqu'il n'a pas été traité à la nitrosoguanidine. Il a été isolé parallèlement à l'isolat P4L-12.

2.1.1.4 PI 3-1

Le virus PI3-1 nous a gracieusement été fourni par Dr Terence Dermody (*Departments of Pediatrics and Microbiology and Immunology and Elizabeth B. Lamb center for pediatric research, Vanderbilt University school of medicine, Nashville, Tennessee*). L'isolement de ce virus a déjà été décrit [123]. Sommairement, un clone du réovirus serotype 3 (Dearing) passé 8 fois à de hautes multiplicités d'infection a été utilisé pour infecter de façon persistante des cellules

L929. Les cellules infectées ont été maintenues à 37°C et menées à confluence avant d'être diluées. Du milieu frais a été ajouté tous les 4 jours lorsque la densité cellulaire n'était pas suffisante pour permettre la dilution. Le virus a été récupéré après un nombre donné de passage. Tel que décrit en introduction, ce virus possède une capsid externe plus sensible aux protéases et se décapside plus efficacement dû à une unique substitution d'acide aminé près de l'extrémité carboxy-terminale de la protéine.

2.1.2 Cellules

Plusieurs lignées cellulaires ont été utilisées dans de cette étude. Parmi celles-ci, notons les cellules L929, bien documentées pour leur sensibilité au réovirus, elles permettent l'amplification et le titrage du virus, et constituent un excellent contrôle de l'efficacité d'infection. Ensuite, les cellules NIH-3T3 parentales et transformées permettent d'étudier l'effet de la transformation par l'oncogène *ras* sur la sensibilité à l'infection par réovirus et les déterminants qui la régissent. D'autre part, les lignées cellulaires cancéreuses humaines utilisées pour cette étude proviennent d'un vaste éventail de 60 lignées, appelées *NCI-60* et développés effectivement par le NCI (*National Cancer Institute*) pour des études *in vitro* sur divers agents contre le cancer [225]. Ces cellules nous ont gracieusement été fournies par Dr John C. Bell (*Ottawa Regional Cancer Centre*). Ces lignées cellulaires cancéreuses proviennent d'origines diverses notamment, des carcinomes pulmonaires, ovariens, rénaux, du colon, du système nerveux central (SNC), du sein, de la prostate, des mélanomes de même que des leucémies. Dans le cadre de cette étude, une seule lignée a été choisie par type cellulaire, constituant un total de 9 lignées. Parmi ces lignées cellulaires, 4 lignées ont été sélectionnées pour mener des études plus poussées. Il est à noter que ces cellules ont été maintenues selon les conditions de culture recommandées par l'ATCC. Enfin, des cellules mononucléaires du sang périphérique connues sous le terme de PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) ont aussi été utilisées à l'intérieur de cette étude et nous ont été généreusement fournies par Jessy Tremblay du laboratoire du Dr Jacques Thibodeau (Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal) qui les a obtenues par centrifugation sur

gradient de densité Ficoll-Paque selon les recommandations du manufacturier (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Québec). Une description des différents types cellulaires et des conditions de maintien sera présentée dans les quelques lignes qui suivent.

2.1.2.1 Cellules L929

Les cellules fibroblastiques de souris, L929, ont été obtenues, à l'origine, d'ATCC et ont été maintenues dans du milieu MEM (Wisent, St-Bruno, Québec) supplémenté de 5% de sérum fœtal de veau décomplémenté (Wisent), 2 mM de glutamine (Wisent), 1% de pénicilline/streptomycine (Wisent) et 0,1 mM d'acides aminés non essentiels (Wisent).

2.1.2.2 Cellules NIH-3T3 parentales et transformées

Ces cellules fibroblastiques de souris nous ont été généreusement fournies par Dr Robert Nabi (Département de Pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal) et ont, à l'origine, été obtenues de Dr Michael Lisanti (*Whitehead institute for biomedical Research*). Les cellules NIH-3T3 transformées par l'oncogène Harvey-ras^{G12V} ainsi que les cellules parentales ont été maintenues dans du milieu DMEM (Wisent) auquel ont été ajoutés 10% de sérum de veau décomplémenté (Wisent) de même que 2 mM de glutamine (Wisent), 1% de pénicilline/streptomycine (Wisent), 0,1 mM d'acides aminés non essentiels (Wisent) et 1% de vitamine (Invitrogen, Burlington, Ontario). Ces cellules adhérentes ont été maintenues sous un état de sous confluence et passées tous les trois jours à raison de 300 000 cellules par pétri de 100 mm de diamètre (Corning, Fisher, Montréal, Québec). En effet, les cellules NIH-3T3 ont une forte capacité d'inhibition de contact, mais lorsque trop confluentes peuvent se transformer spontanément d'où l'importance de les maintenir comme prescrit.

2.1.2.3 Cellules A-498

La lignée cellulaire A-498 a été dérivé d'un carcinome rénal et a été maintenue dans un milieu MEM (Wisent) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Wisent), 2mM de glutamine (Wisent), 1% de

pénicilline/streptomycine (Wisent), 0,1 mM d'acides aminés non essentiels (Wisent) et 1 mM de pyruvate de sodium (Wisent). Ces cellules adhérentes ont été diluées 1 : 3, tous les trois jours.

2.1.2.4 Cellules COLO 205

Ces cellules mixtes, retrouvées à la fois sous forme adhérente et en suspension, proviennent d'un adénocarcinome colorectal. Elles ont été cultivées dans un milieu RPMI 1640 (Wisent) auquel ont été ajoutés 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Wisent) 2 mM de glutamine (Wisent), 1% de pénicilline/streptomycine (Wisent), 10 mM d'Hepes (Wisent) et 1 mM de pyruvate de sodium (Wisent). Tous les 2 à 3 jours, les cellules doivent être diluées à 4×10^5 cellules/ml et les dilutions doivent être effectuées avant que les cellules n'atteignent une densité de 2×10^6 cellules/ml.

2.1.2.5 Cellules MCF-7

Issues d'un adénocarcinome mammaire, ces cellules adhérentes nécessitent un milieu de culture MEM (Wisent) auquel est additionné 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Wisent), 2 mM de glutamine (Wisent), 1% de pénicilline/streptomycine (Wisent), 0,1 mM d'acides aminés non essentiels (Wisent), 1 mM de pyruvate de sodium (Wisent) et de l'insuline bovine (Invitrogen) dont la concentration est ajustée à 0.01 mg/ml. Ces cellules ont été diluées 1 : 6, tous les trois jours.

2.1.2.6 Cellules MOLT-4

Cette lignée cellulaire en suspension découle d'une leucémie lymphoblastique aigue provenant des lymphoblastes T. Leur culture nécessite un milieu RPMI 1640 (Wisent) avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Wisent), 2 mM de glutamine (Wisent), 1% de pénicilline/streptomycine (Wisent), 10 mM d'Hepes (Wisent) et 1 mM de pyruvate de sodium (Wisent). Tous les 2 à 3 jours, les cellules doivent être diluées à 4×10^5 cellules/ml et les dilutions doivent être effectuées avant que les cellules n'atteignent une densité de 2×10^6 cellules/ml.

2.1.2.7 Cellules NCI-H23

Ces cellules adhérentes sont issues d'un adénocarcinome du poumon et ont été maintenues dans un milieu RPMI 1640 (Wisent) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Wisent), 2 mM de glutamine (Wisent), 1% de pénicilline/streptomycine (Wisent), 10 mM d'Hepes (Wisent) et 1 mM de pyruvate de sodium (Wisent). Les passages cellulaires ont été effectués à tous les trois jours et les cellules ont été diluées à chaque fois dans un ratio de 1 : 5.

2.1.2.8 Cellules NIH :OVCAR-3

Cette lignée cellulaire a été établie à partir d'un adénocarcinome ovarien. Les cellules NIH :OVCAR-3 sont des cellules adhérentes devant être maintenues dans un milieu RPMI 1640 (Wisent) supplémenté de 20% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Wisent), 2 mM de glutamine (Wisent), 1% de pénicilline/streptomycine (Wisent), 10 mM d'Hepes (Wisent), 1 mM de pyruvate de sodium (Wisent) et de l'insuline bovine (Invitrogen) à une concentration de 0,01 mg/ml. Une dilution dans un ratio de 1 : 4 tous les 3 jours permet un maintien adéquat de cette lignée cellulaire.

2.1.2.9 Cellules PC3

Cette lignée cellulaire provient d'une métastase osseuse d'un adénocarcinome de la prostate. Ces cellules adhérentes ont été cultivées dans un milieu Ham's F12K (Wisent) dans lequel ont été ajoutés 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Wisent), 1% de pénicilline/streptomycine (Wisent) et 2 mM de glutamine (Wisent). Les cellules ont été diluées à tous les trois jours dans un rapport 1 : 3.

2.1.2.11 Cellules SF-268

Cette lignée cellulaire est issue d'un gliome, une tumeur maligne du système nerveux central. Ces cellules ont été maintenues dans un milieu RPMI 1640 (Wisent) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Wisent), 2 mM de glutamine (Wisent) et 1% pénicilline (10 unités)/streptomycine (10 µg/ml) (Wisent). Ces cellules adhérentes ont été passées à une fréquence de une fois tous les trois jours et diluées dans un ratio de 1 : 4.

2.1.2.10 Cellules SK-MEL-2

Cette lignée cellulaire a été établie à partir d'un mélanome malin. Ce sont des cellules adhérentes se propageant dans un milieu MEM (Wisent) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Wisent), 1% de pénicilline/streptomycine (Wisent), 2 mM de glutamine (Wisent) 0,1 mM d'acides aminés non essentiels (Wisent) et 1 mM de pyruvate de sodium (Wisent). Les passages cellulaires ont été effectués à intervalle de trois jours et les cellules diluées dans un rapport 1 : 3.

2.1.2.12 Cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC)

Ces cultures primaires ont été cultivées dans un milieu RPMI 1640 (Wisent) auquel a été ajouté 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Wisent), 2 mM de glutamine (Wisent) et 1% pénicilline (10 unités)/streptomycine (10 ug/ml) (Wisent). Ces cellules mixtes, sous forme adhérente et en suspension, ont étéensemencées à raison de 1×10^6 cellules/ml. L'activation des lymphocytes a été effectuée par l'ajout de phytohémagglutinine (PHA) (BD Bioscience, Mississauga, Ontario) dans le milieu à une concentration finale de 1 μ g/ml.

2.2 Protéolyse de la capsid externe du réovirus durant son entrée dans la cellule chez les cellules NIH-3T3 parentales et transformées

Les étapes de décapsidation du réovirus lors d'une infection peuvent être observées à travers le temps en examinant les divers changements au niveau des protéines virales de la capsid externe. À cette fin, un virus radiomarqué constitue un outil très intéressant. Il suffit donc dans un premier temps de produire du réovirus radiomarqué et ensuite d'utiliser ce virus pour infecter des cellules qui seront récupérées à différents temps.

2.2.1 Production du virus radioactif

Le réovirus de sérotype 3 (Dearing) radiomarqué a été obtenu en infectant des cellules L929,ensemencées à 3×10^6 cellules dans un pétri de 100 mm de diamètre, à une multiplicité d'infection (MOI) de 10 particules infectieuses par cellule. Les cellules ont donc été rincées à deux reprises avec du PBS pH 7,0 (NaCl 137 mM; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8 mM; KH_2PO_4 1,5 mM; KCl 2,7 mM), et le virus a été ajouté dans une quantité minimale de milieu MEM (Wisent) sans sérum (1 ml) pour une heure d'adsorption à 4 °C. Ensuite, le milieu MEM (Wisent) sans sérum a été ajouté pour un total de 10 ml et les cellules ont été incubées pendant 7 heures à 37 °C. Par la suite, le milieu a été retiré et du milieu frais DMEM dépourvu de méthionine et de cystéine (Invitrogen) et sans sérum (9/10) ainsi qu'un milieu MEM (Wisent) sans sérum (1/10) ont été ajoutés pour un total de 5 ml de milieu. À ce milieu, 200 $\mu\text{Ci/ml}$ de Tran^{35}S -Label (Perkin Elmer, Boston, MA, 7 Ci/mmol ou 259 MBQ/mmol) a été ajouté et les cellules ont été incubées pendant 24 heures à 37 °C. Suite à trois cycles congélation (-80 °C) -décongélation des cellules, le virus a été récupéré par deux extractions au fréon (American chemicals, Montréal, Québec). Le fréon est ajouté à la suspension virale récupérée à la suite des cycles congélation-décongélation dans un rapport 1 : 5 et la préparation est mélangée au vortex pendant environ une minute. Une centrifugation¹ de 10 minutes à 10 000 rpm à 4 °C permet d'extraire le virus qui se trouve dans la phase supérieure. Cette opération d'extraction au fréon est répétée deux fois. Les particules virales sont par la suite dialysées (sac à dialyse, Spectrum medical industries, Californie, É-U) durant une période d'environ 16 heures contre 100 volumes de milieu MEM (Wisent) à 4 °C. L'infection avec le virus radiomarqué sera décrite à la section suivante.

2.2.2 Infection des cellules avec le virus radiomarqué

2.2.2.1 Infection et récolte des cellules

Les cellules L929, NIH-3T3 parentales et transformées ont été ensemencées le jour précédent l'infection à raison de $2,5 \times 10^5$ cellules par pétri de 60 mm de

¹ Toutes les centrifugations dans toutes les expériences ont été effectuées avec une centrifugeuse Sorvall RC-5B réfrigérée.

diamètre (Corning, Fisher). Étant donné l'intérêt d'observer la protéolyse de la capsid externe à travers le temps, pour chaque type cellulaire, 4 pétris de cellules ont été ensemencées pour chaque temps observé, soit T_0 (récolte après une heure d'adsorption), T_2 (Récolte deux heures après le T_0), T_4 (Récolte quatre heures après le T_0) et T_8 (Récolte huit heures après le T_0). Les cellules ont donc été rincées deux fois avec du PBS et 250 μ l du réovirus radiomarqué ont été ajoutés à 250 μ l de milieu (MEM avec 2% de sérum de veau fœtal décomplémenté pour les L929 et DMEM avec 5% de sérum de veau décomplémenté pour les NIH-3T3) pour permettre une adsorption du virus dans une quantité minimale de milieu, à 4 °C. Les cellules ont par la suite été incubées à 37 °C pour les différentes période de temps mentionnées ci-haut.

Au moment de la récolte, les cellules ont été rincées à trois reprises avec du PBS, grattées dans un volume de 500 μ l de PBS et récupérées suite à une centrifugation de 10 minutes à 2000 rpm à 4 °C dans des eppendorfs. Le culot cellulaire a été resuspendu dans 100 μ l de tampon RIPA: 140 mM de chlorure de sodium, 8 mM de phosphate de sodium, 2mM de phosphate monobasique de sodium, 1% NP40, 0,5 % deoxycholate de sodium, 0,05% de SDS (sodium dodécylsulfate) et le pH est ajusté à 7,2. Après un cycle congélation (-80 °C)-décongélation, le lysat cellulaire a été centrifugé à 12 000 rpm pendant 20 minutes à 4 °C. Le surnageant a ensuite été récupéré dans un autre eppendorf et 1/4 de volume de tampon d'échantillon 4X (62,5 mM de Tris-HCl pH 6,8; 10% de glycérol, 2% de SDS (sodium dodécylsulfate), 5% de 2 β mercaptoéthanol, 0,00125 % de bleu de bromophénol) a été ajouté. Les échantillons ont été bouillis pendant cinq minutes pour ensuite être déposés sur gel de poly-acrylamide avec SDS (SDS-PAGE).

2.2.2.2 Électrophorèse sur gel de poly-acrylamide avec SDS

La migration des échantillons s'effectue sur gel de 10 % d'acrylamide/Bis (37,5 : 1) avec SDS selon la méthode décrite par Laemmli en 1970 [226]. En plus des échantillons, 10 μ l d'un marqueur de poids moléculaire coloré (Benchmark Pre-stained protein ladder, Invitrogen) allant de 6,0 à 181,8 kDa a été déposé sur le gel. Après une migration d'environ 16 heures à 60V, le gel a été récupéré.

2.2.2.3 Autoradiographie

Le gel a ensuite été déposé dans une solution fixatrice (40% de méthanol et 5% d'acide acétique) pendant 30 minutes. Par la suite, le gel a été placé sur un papier Whatman (Fisher, Montréal, Québec), recouvert d'une pellicule plastique (chlorure de polyvinyl, Fisher) et séché dans un sécheur à gel (modèle 583, Biorad, Mississauga, Ontario) à 80 °C pendant 3 heures. Le gel a ensuite été exposé pour une période de temps donnée sur un film KODAK BioMax XAR Film (Amersham, Baie d'Urfé, Québec).

2.3 Sensibilité des cellules NIH-3T3 et NIH-Ras à des inhibiteurs de l'activité des protéases

Les inhibiteurs de l'activité des protéases utilisés dans cette étude sont le chlorure d'ammonium (NH₄Cl) ainsi que la chloroquine. Ils agissent en fait en augmentant le pH des endosomes rendant donc impossible l'activité des protéases lysosomales qui dépendent d'un faible pH pour leur activation.

2.3.1 Traitement des cellules au chlorure d'ammonium

Les cellules L929, NIH-3T3 parentales et transformées ont étéensemencées dans des plaques de six puits (Falcon, VWR Canlab, Ville Mont-Royal, Québec) à raison de $2,0 \times 10^5$ cellules par puit. Le jour suivant, les cellules ont été traitées à différentes concentrations de chlorure d'ammonium (0; 0,25; 0,35; 0,45; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; 2,0 mM). Le pourcentage de mortalité a été estimé par observation au microscope optique et comparaison avec des cellules non traitées 48 heures après le traitement.

2.3.2 Traitement des cellules à la chloroquine

Les cellules L929, NIH-3T3 parentales et transformées ont étéensemencées dans des plaques de six puits (Falcon, VWR Canlab, Ville Mont-Royal, Québec) à raison de $2,0 \times 10^5$ cellules par puits. Le jour suivant, les cellules ont été traitées à

différentes concentrations de chloroquine (0,1, 5, 10, 50, 100, 330 μM). Le pourcentage de mortalité a été estimé par observation au microscope optique et comparaison des cellules non traitées 24 heures après le traitement.

2.4 Sensibilité des virus H8-2, P4L-12 et PI3-1 au E64

2.4.1 Traitement au E-64 et infection

Des cellules L929 ont étéensemencées à raison de $2,5 \times 10^5$ cellules par pètri de 60 mm de diamètre (Corning, Fisher). Le jour suivant, les cellules ont été traitées pendant deux heures, avec 100 μM de l'inhibiteur de cystéine protéase, E-64 (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario), à 37 °C avant d'être infectées. Les cellules ont été rincées à deux reprises avec du PBS et le virus (H8-2 ou P4L-12 ou PI3-1) a été ajouté (multiplicité d'infection de 40 particules infectieuses par cellule) à un milieu minimal de MEM (Wisent) supplémenté de 2 % de sérum de veau foetal (Wisent). Suite à une heure d'adsorption à 4 °C, du milieu frais MEM (Wisent) avec 2% de sérum de veau foetal (Wisent) ainsi que du E-64 à une concentration finale de 100 μM ont été ajoutés. Les cellules ont été incubées pendant 22 heures à 37 °C.

2.4.2 Marquage métabolique des cellules infectées

Suite à cette période d'incubation, le milieu a été retiré, les cellules rincées une fois au PBS et 2 ml de milieu DMEM sans méthionine et cystéine (Invitrogen) ont été ajoutés pour une incubation de 30 minutes à 37 °C; c'est l'étape de déprivation (*starving*). Le milieu a ensuite été retiré et remplacé par du DMEM frais dépourvu de méthionine et cystéine (Invitrogen) auquel a été ajouté 25 $\mu\text{Ci/ml}$ de $\text{Tran}^{35}\text{S-Label}$ (Perkin Elmer, Boston, MA, 7 Ci/mmol ou 259 MBQ/mmol). Les cellules ont été incubées ainsi pendant 2 heures à 37 °C et ont par la suite été récupérées. Les échantillons ont été soumis par la suite à une électrophorèse sur gel suivie d'une autoradiographie. Se référer respectivement aux sections 2.2.2.1, 2.2.2.2 et 2.2.2.3 pour la récolte des cellules, l'électrophorèse sur gel de poly-acrylamide avec SDS et l'autoradiographie.

2.5 Sensibilité des virus H8-2, P4L-12 et PI3-1 à l'interféron

2.5.1 Traitement à l'interféron et infection

Des cellules L929, à $2,5 \times 10^5$ cellules par pétri de 60 mm de diamètre, (Corning, Fisher)ensemencées le jour précédent, ont été traitées à des concentrations de 0, 25, 50 et 250 unités internationales (UI)/ml d'interféron β de souris (Calbiochem, La Jolla, Californie) pendant 24 heures à 37 °C comme il a été décrit préalablement [176]. Les cellules ont par la suite été infectées, comme décrit précédemment, mais cette fois à une multiplicité d'infection de 10 particules infectieuses par cellule et ont été incubées pendant 22 heures dans un milieu MEM (Wisent) avec 2% de sérum de veau foetal (Wisent) auquel ont été ajoutées les mêmes concentrations d'interféron. Suite à un marquage métabolique (voir section 2.4.2), les cellules ont été récoltées et les échantillons soumis à une électrophorèse sur gel suivie d'une autoradiographie (voir les sections 2.2.2.1, 2.2.2.2 et 2.2.2.3).

2.6 Sensibilité des cellules cancéreuses à l'infection par les trois isolats de réovirus

Les différentes lignées cellulaires cancéreuses dont il a été question précédemment ont été analysées quant à leur sensibilité à l'infection par les différents isolats de réovirus soit H8-2, P4L-12 et PI3-1. À cette fin, la synthèse et l'accumulation de protéines virales chez les cellules infectées, la viabilité des cellules infectées ainsi que l'efficacité d'infection des différents virus chez ces mêmes cellules ont été analysées.

2.6.1 Analyse de la synthèse et accumulation des protéines du réovirus chez ces cellules

Dans un premier temps, les neuf lignées de cellules cancéreuses ont été infectées par les souches H8-2, P4L-12 et PI3-1 à une multiplicité d'infection de 40 particules infectieuses par cellule pendant 48 heures, dans le seul but d'observer la permissivité de ces cellules à l'infection par les réovirus. Plus tard, les 4 types cellulaires sélectionnés ont été infectés par les trois isolats de réovirus, mais cette fois

à des multiplicités d'infection de 10, 100 et 500 particules infectieuses par cellules pendant 48 heures. Dans tous ces cas, les cellules ont étéensemencées à raison de $2,5 \times 10^5$ cellules par pétri de 60 mm de diamètre (Corning, Fisher) et l'infection a été effectuée telle que mentionnée précédemment. Les cellules ont été récupérées en les grattant directement dans le milieu de culture et 50 μ l de cette suspension a été prélevée pour effectuer immédiatement un test de viabilité (voir section 1.6.2). Suite à une centrifugation à 900 rpm pendant 5 minutes, le surnageant a été aspiré et le culot cellulaire ressuspendu dans 100 μ l de tampon RIPA. Les étapes subséquentes ont été décrites à la section 2.2.2.1. Les échantillons ont ensuite été soumis à une électrophorèse sur gel de poly-acrylamide avec SDS conformément à ce qui a été décrit à la section 2.2.2.2. À noter que les gels ont été effectués en duplicata puisque l'un d'eux servira au transfert sur membrane de nitrocellulose suivi d'un immunobuvardage et l'autre à une coloration des protéines totales au bleu de Coomassie.

2.6.1.1 Coloration des protéines au bleu de Coomassie

Après une migration de 16 heures à 60 V, le gel a été déposé dans une solution fixatrice (40 % de méthanol et 5 % d'acide acétique) pour une durée de 30 minutes. La solution a été retirée et une solution fraîche contenant 0,1% de bleu de Coomassie a été ajoutée pour une période de 30 minutes. Le gel est alors entièrement coloré d'un bleu très foncé. La solution de bleu de Coomassie est ensuite retirée et plusieurs lavages avec la solution fixatrice sont effectués. Peu à peu, le gel est décoloré et les bandes correspondant aux protéines sont colorées en bleu. Le gel est ensuite séché.

2.6.1.2 Transfert sur membrane de nitrocellulose

Suite à une migration de 16 heures à 60 V, le gel a été soumis à un transfert sur une membrane de nitrocellulose (Mandel, Guelph, Ontario) durant 16 heures à 75 mA dans un tampon de transfert dont la composition est la suivante : Tris 25 mM, glycine 193 mM et 20 % méthanol. La membrane de nitrocellulose a ensuite été récupérée dans le but de procéder à un immunobuvardage ou Western blot avec un anticorps dirigé contre la protéine du réovirus, $\sigma 3$.

2.6.1.3 Immunobuvardage et anticorps utilisés

La membrane de nitrocellulose a d'abord été rincée pendant 20 minutes sous agitation dans du TBS (tris-HCl pH 7,5 10 mM; NaCl 150 mM) et déposée ensuite durant une heure, pour le blocage, dans du TBS auquel 5% de lait en poudre a été ajouté. Le TBS 5% lait a ensuite été retiré et 20 ml d'anticorps (surnageant d'hybridome) contre la protéine $\sigma 3$ du réovirus ont été ajoutés pour une incubation d'une heure sous agitation. Il s'agit en fait d'un anticorps monoclonal appelé 4F2 provenant d'hybridomes, hybridomes qui nous ont gracieusement été offerts par Dr Kevin Coombs (*University of Manitoba, Canada*). L'immunisation des souris, la production des hybridomes ainsi que leur maintien ont été préalablement décrits [58]. Les hybridomes ont été menés à confluence et, 7 à 10 jours après le début de la phase de déclin, les cellules ont été centrifugées (5 minutes à 900 rpm) et le surnageant contenant les anticorps a été récupéré et gardé à 4°C. Ensuite, après une heure d'incubation, l'anticorps a été retiré et la membrane a été rincée à trois reprises pendant 10 minutes avec du TBS 0,1% Tween 20. Un anticorps anti-IgG Fc de souris produit chez le lapin et conjugué à la phosphatase alcaline (Pierce, MJS Biolynx, Brockville, Ontario) a ensuite été employé. L'anticorps fut dilué de moitié dans du glycérol et utilisé à une concentration de 1/8000 dans du TBS 5% lait. Après une heure d'incubation sous agitation avec l'anticorps secondaire, la membrane a une fois de plus été rincée pendant trois périodes de 10 minutes dans du TBS 0,1% Tween 20. Le complexe antigène-anticorps a été révélé en utilisant le substrat NBT(100 μ l)-BCIP(100 μ l) selon les recommandations du fabricant (Biorad, Mississauga, Ontario) dans 10 ml de tampon phosphatase pH 9,35 (tris 100 mM; NaCl 100 mM; MgCl₂ 50 mM).

2.6.2 Détermination de la viabilité des cellules infectées

Tel que mentionné précédemment, au moment de la récupération des cellules 50 μ l de la suspension fut prélevé pour examiner la viabilité des cellules suite à l'infection, aux différentes multiplicités d'infection (10, 100 et 500), par les différents isolats de réovirus. Ainsi, à ce 50 μ l, 50 μ l de bleu de trypan (bleu de trypan 0,4 %; NaCl 0,15 M) ont été ajoutés et l'échantillon a été déposé sur un

hématimètre (Fisher) pour une observation au microscope du nombre de cellules bleues (mortes) et de cellules incolores (vivantes). En effet, ceci est dû au fait que les cellules vivantes n'internalisent pas certains colorants comme le bleu de trypan due à leur barrière cytoplasmique active contrairement aux cellules mortes.

2.6.3 Analyse de l'efficacité de l'infection des cellules cancéreuses par les différents isolats de réovirus

L'analyse de l'efficacité de l'infection par les trois différents isolats de réovirus chez les différentes lignées cancéreuses s'est déroulée en trois étapes. D'abord, les cellules cancéreuses ont été infectées avec différentes dilutions du virus, ensuite, le milieu contenant le virus produit a été utilisé pour infecter des cellules L929 et enfin, un titre a été calculé chez les cellules L929.

2.6.3.1 Infection des cellules cancéreuses sur plaque de 96 puits avec différentes dilutions du virus

Les cellules ont étéensemencées sur plaque de 96 puits (Falcon, VWR Canlab, Ville MontRoyal, Québec) à raison de 10 000 cellules par puit. Pour chaque lignée de cellules cancéreuses, trois plaques de cellules ont étéensemencées pour chacun des isolats de réovirus (H8-2, P4L-12 et PI3-1). Le jour suivant, une quantité égale de particules virales infectieuses pour chaque isolat a été utilisée pour effectuer des dilutions successives de facteur 10 (de 10^{-1} à 10^{-8}). Les différentes dilutions ont été maintenues sur glace. Les cellules ont été rincées à deux reprises avec du PBS et chaque rangée de 12 puits fut infectée avec 50 μ l d'une même dilution. Étant donné les huit rangées disponibles, les dilutions de 10^{-2} à 10^{-8} ont été utilisées et une rangée est restée non infectée (contrôle). Les plaques ont été incubées pour adsorption à 4°C pendant une heure. Le milieu, contenant le virus n'ayant pas adsorbé sur les cellules, a été retiré et les cellules rincées à deux reprises avec du PBS. Du milieu frais a été ajouté et les cellules furent portées à incubation à 37°C pendant 6 jours.

2.6.3.2 Repiquage sur plaque de cellules L929

Des cellules L929 ont étéensemencées sur des plaques de 96 puits (Falcon, VWR Canlab), 10 000 cellules par puit, au cinquième jour d'infection des cellules

cancéreuses. Le jour suivant, le sixième jour d'infection, les cellules L929 ont été rincées à deux reprises avec du PBS et infectées avec 50 µl des surnageants des cellules cancéreuses infectées, surnageant contenant les virus relâchés en 6 jours par ces cellules. Les plaques de cellules L929 consistent donc en un repiquage de chacune des plaques de cellules cancéreuses infectées par chacun des trois isolats de réovirus puisque la position de chaque puit a été respectée. Après une heure d'adsorption à 4°C, 50 µl de milieu frais MEM (Wisent) avec 2% de sérum de veau fœtal (Wisent) ont été ajoutés à chaque puit et les plaques ont été placées à 37°C pour une incubation de trois jours.

2.6.3.3 Calcul du titre sur les cellules L929

Après trois jours d'infection, chacun des puits des plaques de cellules L929 ont été observé au microscope optique afin de déterminer les zones de lyse. L'efficacité relative d'infection a été déterminée par le calcul du titre selon la méthode $DICT_{50}$ (dose infectieuse en culture tissulaire 50%) préalablement décrite [227].

2.7 Sensibilité des PBMC à l'infection par les trois isolats de réovirus

La sensibilité des PBMC aux trois différents isolats de réovirus a été analysée par deux méthodes : par immunobuvardage et par marquage métabolique. Étant donné que ces méthodes ont été décrites respectivement aux sections 2.6.1.2 et 2.4.2, seules des précisions propres à ce contexte seront apportées.

2.7.1 Analyse de la synthèse et accumulation des protéines virales par immunobuvardage

Les PBMC ont étéensemencées dans des flacons de 50 ml (Falcon) à $1,0 \times 10^6$ cellules/ml pour un total de 5 ml. S'il y avait lieu de traiter les cellules avec du PHA, celui-ci était ajouté au milieu 16 heures avant l'infection à une concentration de 1 µg/ml. Le jour suivant, les cellules ont été infectées avec les trois isolats de

réovirus à une multiplicité d'infection de 40 particules infectieuses par cellule pendant 48 heures à 37°C. Dans le cas des cellules traitées au PHA, la même concentration était ajoutée au milieu après l'adsorption. La récolte des cellules a été menée conformément à ce qui a été décrit à la section 2.2.2.1 à la différence que les cellules n'ont pas été grattées (cellules en suspension), mais centrifugées à 900 rpm pendant 5 minutes avant d'être resuspendue dans le tampon RIPA. Le SDS-PAGE (voir section 2.2.2.2) ainsi que l'immunobuvardage ont été effectués tel que décrit.

2.7.2 Observation des protéines produites dans une période de temps donnée par marquage métabolique

Les PBMC ont étéensemencées dans des flacons de 50 ml (Falcon) à $1,0 \times 10^6$ cellules/ml pour un total de 5 ml. Le jour suivant, les cellules ont été infectées avec les trois isolats de réovirus à des multiplicités d'infection de 10, 50 et 100 particules infectieuses par cellule pendant 44 heures à 37°C. Par la suite un marquage métabolique a été effectué pendant 2 heures tel que décrit. La récolte des cellules (voir 2.7.1), le SDS-PAGE (voir section 2.2.2.2) ainsi que l'autoradiographie (Voir section 2.2.2.3) ont été accomplis conformément à ce qui a été décrit préalablement.

Chapitre 3 – Résultats

3.1 Étude de l'effet de la transformation par l'oncogène *ras* sur la machinerie endocytaire de la cellule

Il est maintenant bien établi que la transformation de cellules par l'oncogène *ras* modifie substantiellement l'environnement cellulaire, suffisamment pour rendre sensibles des cellules qui, à l'origine, sont résistantes à l'infection par le réovirus. Il est de même bien connu que la transformation cellulaire par l'oncogène *ras* entraîne des changements multiples au niveau de l'expression, de l'activité et de la localisation des protéases cellulaires, notamment les cystéines protéases, protéines essentielles à la décapsidation du réovirus pour plusieurs types cellulaires. Afin d'examiner l'effet de la transformation par l'oncogène *ras* sur la machinerie endocytaire de la cellule et, partant sur les étapes de l'entrée du virus, la protéolyse du réovirus radiomarqué chez les cellules NIH-3T3 transformées par l'oncogène Harvey-*ras* (NIH-Ras) et chez les cellules parentales (NIH) a été observée. De plus, dans le but d'examiner l'effet de la transformation par l'oncogène *ras* sur l'environnement endosomal, ces mêmes cellules ont été traitées avec des agents augmentant le pH des endosomes et la toxicité qu'ils induisent chez ces différentes cellules a été observée.

3.1.1 Le réovirus sérotype 3 Dearing (T3D) démontre une meilleure cinétique de décapsidation chez les cellules NIH-3T3 transformées par l'oncogène Harvey-*ras* (NIH-Ras) que chez les cellules parentales

Afin de déterminer s'il existe une différence dans la cinétique de décapsidation entre les cellules NIH-3T3 transformées par l'oncogène Harvey-*ras* et les cellules parentales, une étude de protéolyse du réovirus marqué au ^{35}S , à différents temps dans les étapes précoces de l'infection a été réalisée. Tel que décrit dans la section matériel et méthodes, du virus radiomarqué a été produit dans des cellules L929 et utilisé, à quantités égales, pour infecter les cellules L929, NIH et NIH-Ras. Les cellules ont été récoltées à différents moments : immédiatement après l'heure d'adsorption à 4°C (T_0) ainsi que deux heures (T_2), quatre heures (T_4) et huit heures (T_8) après le T_0 . Les protéines radiomarquées ont été analysées suite à une

électrophorèse sur gel de poly-acrylamide avec SDS suivi d'une autoradiographie (figure 6). Il est à noter que l'expérience a été effectuée à trois reprises et que les résultats sont effectivement reproductibles. Le niveau du produit de clivage de $\mu 1C$, le fragment δ a été observé aux différents temps puisqu'il reflète l'efficacité de décapsidation du virus par les protéases endosomales cellulaires. En effet, graduellement, le rapport entre les niveaux de $\mu 1C$ et de δ doit être de plus en plus faible, c'est-à-dire qu'avec le temps, une augmentation du niveau du fragment δ est observée au profit d'une diminution du niveau de la protéine $\mu 1C$. Ce phénomène est très bien illustré chez les cellules L929 et c'est pour cette raison que ces cellules ont été utilisées à des fins de validation de l'expérience. Comme il est possible d'observer à la figure 6, chez les cellules L929, au T_0 , le virus n'étant pas entré dans la cellule, seule la protéine $\mu 1/\mu 1C$ est observée à la surface de la cellule. Il est important de noter que l'appellation $\mu 1/\mu 1C$ fait référence respectivement aux formes non clivée et clivée de la protéine $\mu 1$, les deux formes étant observées. Rappelons que le produit du clivage de la protéine $\mu 1$ à son extrémité N-terminale est le fragment $\mu 1\delta$. Comme la forme $\mu 1C$ est majoritaire à la surface du virion dans ce contexte et, partant, la présence du fragment δ , une attention particulière leur sera portée. Déjà, au T_2 , le fragment δ est présent pratiquement dans un rapport 1 :1 avec la protéine $\mu 1C$, au T_8 , le niveau de δ est hautement supérieur au niveau de $\mu 1C$. Chez les cellules NIH et NIH-Ras, l'attachement du virus aux cellules semble moins efficace que chez les cellules L929 comme il est possible d'observer par les niveaux de $\mu 1/\mu 1C$ au T_0 reflétant les virus adsorbés aux cellules. À efficacité équivalente de liaison aux cellules, la protéine $\mu 1C$ du virus radiomarqué montre un clivage plus précoce en son fragment δ chez les cellules transformées que chez les cellules parentales. En effet, chez les cellules NIH-Ras, le fragment δ est facilement détectable à T_4 et, à T_8 , il se trouve dans un rapport 1 :1 avec la protéine $\mu 1C$. Toutefois, chez les cellules NIH, le fragment δ commence à être détectable à T_8 , mais ne se trouve qu'à l'état de trace. Ces résultats suggèrent que les réovirus de sérotype 3 Dearing (T3D) se décapsident de façon plus efficace, avec une meilleure cinétique, chez les cellules NIH-3T3 transformées par l'oncogène *H-ras* que chez les cellules parentales.

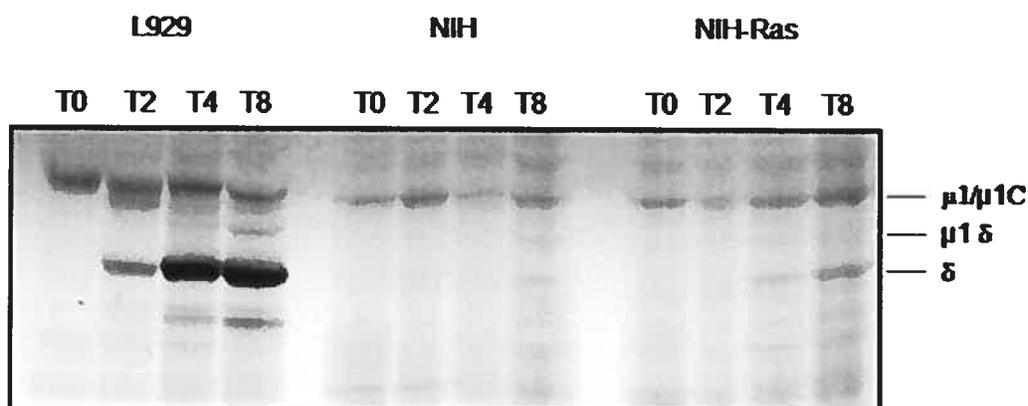


Figure 6 : Analyse de la décapsidation du réovirus sérotype 3 (Dearing) radiomarqué à l'intérieur des cellules L929, NIH et NIH-Ras. Les cellules ($2,5 \times 10^5$) ont été infectées par 250 μ l de virus radiomarqué et récoltées jusqu'à 8 heures après l'adsorption. Comme mentionné dans la section matériel et méthode, le T0 correspond à la récolte des cellules immédiatement après une heure d'adsorption et les T2, T4 et T8 font référence respectivement à la récolte 2, 4 et 8 heures après l'adsorption. Les protéines virales radiomarquées ont été analysées par SDS-PAGE (10%) suivie d'une autoradiographie. L'efficacité de décapsidation est examinée en observant le niveau de clivage à travers le temps de μ 1C en fragment δ pour les trois différentes lignées cellulaires.

3.1.2 Les cellules NIH-Ras présentent une sensibilité nettement plus grande à la chloroquine et au chlorure d'ammonium (agents augmentant le pH des endosomes) que les cellules parentales

Comme il a été mentionné précédemment, la transformation de cellules par l'oncogène *ras* transforme leur environnement endosomal. La figure 6 semble effectivement démontrer que de tels changements doivent forcément avoir eu lieu puisque le virus se décapside de façon plus efficace chez ces cellules. Dans le but d'observer si effectivement les cellules NIH-Ras montrent une altération de leur milieu endosomal par rapport aux cellules NIH, des agents augmentant le pH des endosomes, la chloroquine et le chlorure d'ammonium, ont été utilisés à des concentrations croissantes et la toxicité chez ces cellules a été observée. Mentionnons

que ces agents inhibent la réplication des virions puisqu'ils interfèrent avec la décapsidation du virus, une étape cruciale du cycle de multiplication viral. Des cellules L929, NIH et NIH-Ras ont donc été traitées à des concentrations croissantes de chlorure d'ammonium (NH_4Cl) pendant une période de 48 heures. Suite à cette période, la toxicité a été évaluée par le pourcentage de survie des cellules, estimé par observation au microscope optique. La figure 7 montre que jusqu'à une concentration de 2 mM, le chlorure d'ammonium n'a aucun effet visible sur les cellules L929 et NIH. Toutefois, il est intéressant de noter pour les cellules NIH-Ras qu'à partir de très faibles concentrations de chlorure d'ammonium, le pourcentage de survie commence déjà à chuter, qu'à une concentration de 1mM le pourcentage de survie n'est que de 50%, et qu'à une concentration de 2 mM, seulement 10% des cellules demeurent vivantes. Les cellules NIH-Ras présentent donc une sensibilité hautement accrue à ces concentrations de NH_4Cl lorsque comparées aux cellules L929 et NIH pour lesquelles il ne semble pas y avoir de cytotoxicité apparente à ces mêmes concentrations.

Ensuite, les cellules L929, NIH et NIH-Ras ont été traitées à des concentrations croissantes de chloroquine pendant une période de 24 heures. La chloroquine, bien qu'utilisées à de très faibles concentrations, cause beaucoup plus de cytotoxicité chez les cellules étudiées que le chlorure d'ammonium, c'est donc pour cette raison que la toxicité a été évaluée après une période de 24 heures. Le pourcentage de survie a été estimé de la même façon que pour les cellules traitées au chlorure d'ammonium. Tel qu'il est possible d'observer à la figure 8, les cellules L929, NIH et NIH-Ras ont des sensibilités très différentes à cet agent. En effet, les cellules NIH affiche la sensibilité la moins prononcée et les cellules NIH-Ras sont les plus sensibles. Une concentration de 330 μM tue la totalité des cellules NIH, une concentration de 100 μM est suffisante pour tuer les cellules L929 et aucune survie n'est observée après un traitement des cellules NIH-Ras avec 50 μM de chloroquine. De plus, pour les cellules NIH-Ras, un traitement avec une concentration de 10 μM de chloroquine tue 50% des cellules, tandis qu'à cette même concentration aucune toxicité n'est visible chez les cellules L929 et NIH. Les cellules NIH-Ras sont donc nettement plus sensibles à la chloroquine que les cellules NIH.

Enfin, des expériences préliminaires dont les résultats ne sont pas montrés ici semblent indiquer que le traitement des cellules NIH-Ras à une concentration de 100 μM de E-64, un inhibiteur de cystéines protéases endosomales, entraîne une mortalité cellulaire considérable, mortalité qui n'est pas observée lorsque des cellules NIH sont traitées à la même concentration de E-64.

Ces résultats indiquent que la transformation des cellules NIH-3T3 par l'oncogène *H-ras* entraîne un changement dans l'environnement endosomal rendant ces cellules nettement plus sensibles que les cellules parentales à des agents augmentant le pH des endosomes tels que le chlorure d'ammonium et la chloroquine ainsi qu'à un inhibiteur des cystéines protéases, le E-64.

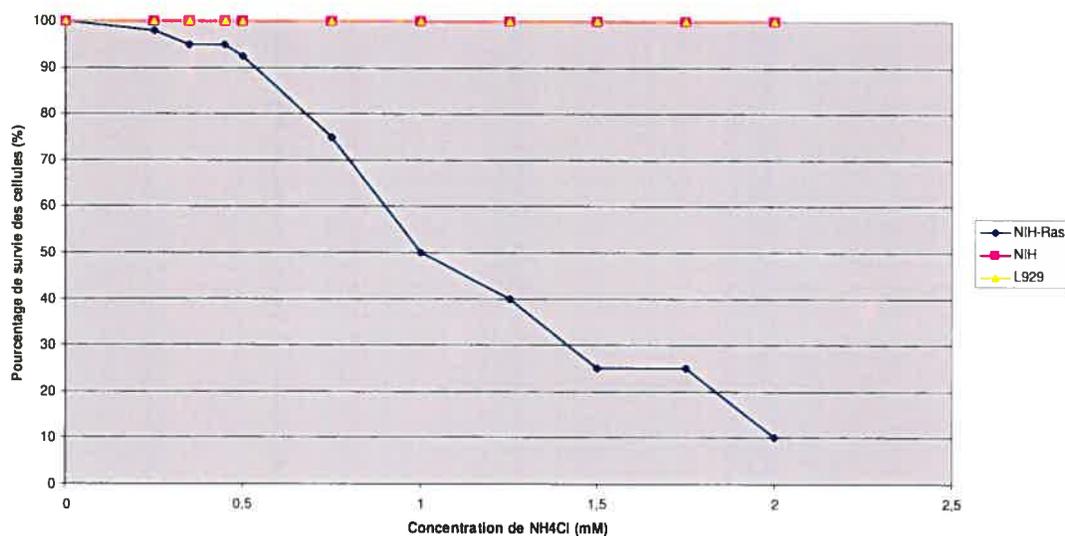


Figure 7 : Pourcentage de survie des cellules L929, NIH et NIH-Ras traitées à différentes concentrations de chlorure d'ammonium (NH_4Cl) pendant une période de 48 heures. Les cellules ont été traitées conformément à ce qui est décrit à la section 2.3.1 de matériel et méthodes. Le pourcentage de survie a été établi par comparaison avec des cellules non traitées au microscope optique.

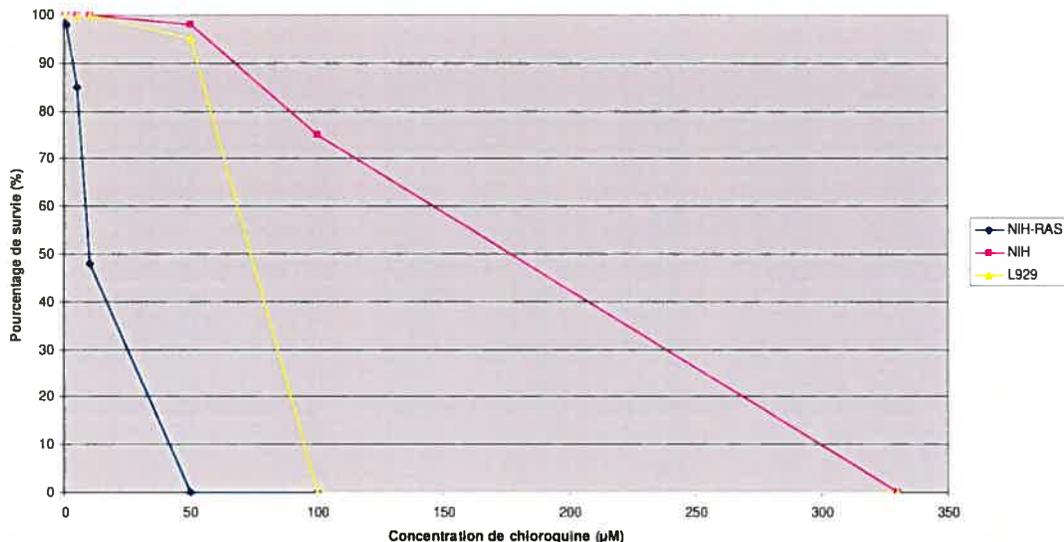


Figure 8 : Pourcentage de survie des cellules L929, NIH et NIH-Ras traitées à différentes concentrations de chloroquine pendant une période de 24 heures. Les cellules ont été traitées conformément à ce qui est décrit à la section 2.3.2 de matériel et méthodes. Le pourcentage de survie a été établi par comparaison avec des cellules non traitées au microscope optique.

3.2 Étude de la sensibilité des trois différents isolats de réovirus (H8-2, P4L-12 et PI3-1) au E64 et à l'interféron

Les déterminants moléculaires de sensibilité à l'infection par réovirus sont de plus en plus étudiés, mais beaucoup reste à élucider. L'inhibition de la protéine PKR par une voie de signalisation de Ras activée est l'explication qui prédomine quant à la sensibilité des cellules transformées à l'infection par réovirus, PKR exerçant un rôle antiviral majeur. Une augmentation de l'activité et de l'expression des protéases endosomales, chez les cellules transformées et cancéreuses, permettant une décapsidation plus efficace du virus pourrait aussi contribuer à l'efficacité de l'infection. En effet, les facteurs limitants majeurs d'une réplication efficace du réovirus se trouvent au niveau de la protéolyse de la capsid virale et de la synthèse protéique. Or, dépendamment des cellules cancéreuses étudiées, il est possible de

penser qu'une souche virale donnée ayant des propriétés données puisse se répliquer de façon plus optimale qu'une autre souche virale ne possédant pas ces propriétés. La souche P4L-12, dont il a été question à plusieurs reprises, a la propriété d'être hypersensible à l'interféron et permet une meilleure discrimination entre les cellules normales et transformées. La souche PI3-1 a la capacité de résister à des inhibiteurs de décapsidation, se décapside avec une meilleure cinétique, et est sensible à des protéases qui ne décapsident généralement pas un virus de type sauvage. Enfin, un réovirus de type sauvage, H8-2, qui a une sensibilité modérée à l'interféron et qui est sensible aux inhibiteurs de décapsidation a aussi été étudié.

Avant de débiter les études de sensibilité des cellules cancéreuses à ces trois isolats de réovirus, il a été important de vérifier que les différentes souches virales diffèrent dans leur sensibilité à l'interféron, d'une part, et leur résistance aux inhibiteurs de décapsidation, d'autre part. Ainsi, des différences observées entre les isolats au niveau de l'infectivité chez les cellules cancéreuses pourront être plus facilement reliées à l'une ou l'autre de ces propriétés. Dans ce but, la sensibilité au E-64 et à l'interféron a premièrement été examinée pour les trois isolats de réovirus.

3.2.1 Le virus PI3-1 peut se répliquer en présence de E-64 contrairement aux virus H8-2 et P4L-12

Comme il a été décrit dans la section matériel et méthodes, les cellules L929 ont été traitées ou non à une concentration de 100 μM de E-64, un inhibiteur de cystéines protéases, deux heures avant l'infection à un MOI de 40 avec les virus H8-2, P4L-12 et PI3-1. Les cellules ont été infectées pendant une période de 22 heures en présence ou en absence de E-64, suivi d'un marquage métabolique. Les protéines virales radiomarquées ont ensuite été détectées suite à une électrophorèse sur gel de poly-acrylamide (10%) avec SDS et une autoradiographie. Un contrôle négatif de cellules non infectées, traitées ou non au E-64, a été utilisé. La synthèse des protéines virales a été examinée par la présence de la protéine majeure de la capsid externe σ_3 . Conformément à ce qui a été décrit dans la littérature, la figure 9 montre que le virus PI3-1 a la capacité de se répliquer chez les cellules traitées avec 100 μM de E-64 [64]. Malgré la présence de cet inhibiteur, le virus a pu se décapsider et les

protéines virales ont donc pu être traduites comme il est possible d'observer par la présence de la protéine $\sigma 3$. Par contre, les isolats H8-2 et P4L-12 semblent démontrer une forte sensibilité à cet inhibiteur puisqu'aucune trace de la protéine $\sigma 3$ n'est détectée lorsque les cellules sont traitées au E-64 et infectées avec ces isolats à un MOI de 40. Les cellules non traitées au E-64 et infectées avec ces mêmes isolats montrent une forte capacité à synthétiser la protéine virale $\sigma 3$. Comme il est possible d'observer à la figure 9 et comme il a été décrit dans la littérature [64], les cellules non infectées traitées avec 100 μM de E-64 pendant une période de 22 heures ne voient pas leur viabilité altérée. Malgré tout, il n'est pas exclu que l'utilisation d'un inhibiteur comme le E-64 puisse exercer d'autres effets à l'intérieur de la cellule pouvant affecter la synthèse des protéines virales. En effet, malgré la présence significative de la protéine $\sigma 3$ chez les cellules traitées au E-64 et infectées avec le virus PI3-1, il est possible de constater que l'expression de cette protéine est quand même plus faible que chez les cellules non traitées. Enfin, ces résultats indiquent que seul l'isolat PI3-1 a la capacité de se répliquer en présence de l'inhibiteur des cystéines protéases, le E-64.

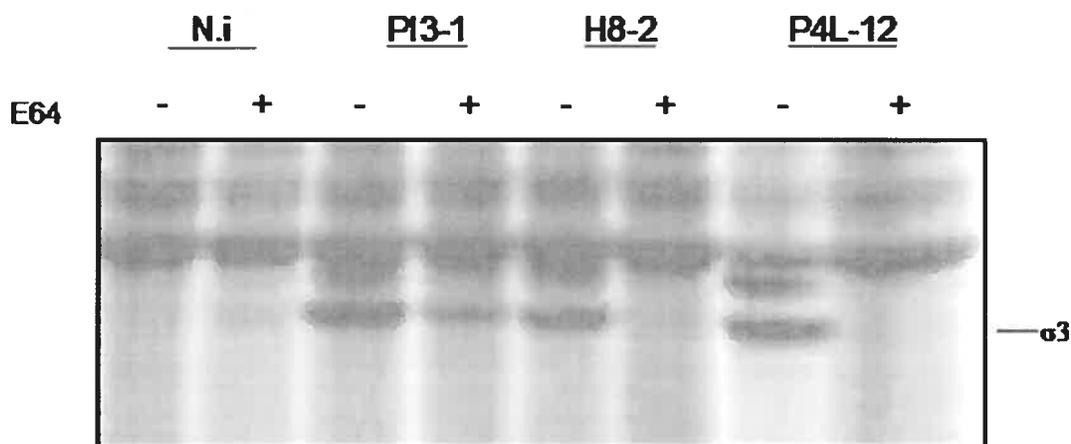


Figure 9 : Effet de l'inhibiteur de cystéines protéases, E-64 sur la synthèse des protéines virales par les isolats de réovirus PI3-1, H8-2 et P4L-12. Les cellules L929 ($2,5 \times 10^5$) ont été traitées au E64 (100 μ M) 2 heures avant l'infection et pendant l'infection avec les trois différents isolats de réovirus à une multiplicité d'infection de 40 particules infectieuses par cellule, comme décrit dans la section matériel et méthodes. La synthèse des protéines virales a été détectée par radiomarquage métabolique 22 heures après l'infection, et les protéines radiomarquées ont été soumises à un SDS-PAGE (10%) suivi d'une autoradiographie. La synthèse des protéines virales a été examinée en observant la protéine $\sigma 3$, une protéine majeure du réovirus. Des cellules non infectées (n.i) traitées ou non avec le E64 servent de contrôle négatif.

3.2.2 Le virus P4L-12 est hypersensible à l'interféron tandis que les virus H8-2 et PI3-1 montrent une sensibilité modérée

Les cellules L929 ont été exposées à différentes concentrations d'interféron β de souris (0, 25, 50, 250 IFN UI/ml) 24 heures avant et pendant l'infection, à un MOI de 10, par les trois isolats de réovirus. Les cellules ont été infectées durant une période de 22 heures. La synthèse des protéines virales a été détectée par radiomarquage métabolique tel que décrit dans la section matériel et méthodes. L'extrait cellulaire a été soumis à une électrophorèse sur gel de poly-acrylamide

(10%) avec SDS suivie d'une autoradiographie. Des cellules non infectées, traitées ou non à la plus grande concentration d'interféron (250 UI/ml) ont permis de constater qu'un traitement de 48 heures, à cette concentration d'interféron, n'a pas d'effet visible sur la viabilité des cellules. La sensibilité à l'interféron a été examinée en observant l'expression de la protéine σ_3 aux différentes concentrations d'interféron. Tel qu'il a été préalablement décrit, le virus H8-2, montre une sensibilité modérée à l'interféron puisque le niveau de σ_3 demeure pratiquement inchangé jusqu'à une concentration de 50 UI/ml (figure 10). Le faible niveau d'expression de cette protéine virale dans ce contexte ne permet pas de voir ce qui se produit à une concentration de 250 UI/ml, mais il a été préalablement rapporté qu'un niveau significatif de protéines virales peut être encore observé à cette concentration pour l'isolat H8-2 [176]. De même, conformément à ce qui a été rapporté l'isolat P4L-12 est effectivement hypersensible à l'interféron puisque le niveau d'expression de la protéine σ_3 diminue considérablement et ce, seulement après un traitement à une concentration de 25 UI/ml d'interféron. L'isolat PI3-1 semble montrer un profil de sensibilité modérée à l'interféron tout comme l'isolat H8-2. Ces résultats démontrent que seul l'isolat P4L-12 montre une hypersensibilité à l'interféron, les isolats H8-2 et PI3-1 étant modérément sensibles.

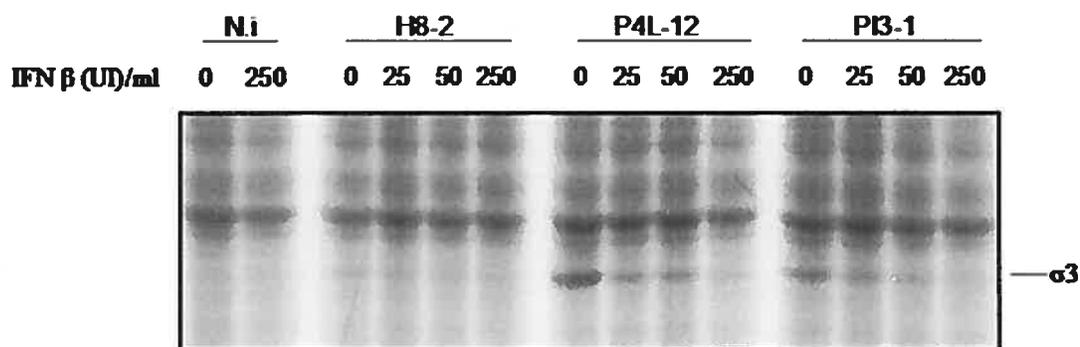


Figure 10 : Effet de l'interféron sur la synthèse des protéines virales par les isolats de réovirus H8-2, P4L-12 et PI3-1. Chacun des trois isolats a été utilisé à une multiplicité d'infection de 10 pour infecter des cellules L929 ($2,5 \times 10^5$) soit non traitées ou traitées avec des concentrations croissantes d'interféron 24 heures avant l'infection et durant les 22 heures d'infection comme décrit dans la section matériel et méthodes. La synthèse de protéines virales a été détectée par radiomarquage métabolique, les protéines radiomarquées soumises à une électrophorèse sur gel de poly-acrylamide (10%) avec SDS et une autoradiographie. La protéine majeure de la capsid externe de réovirus, $\sigma 3$ a été examinée. Des cellules non infectées (n.i) ont été traitées à la concentration maximale d'interféron ou non traitées et servent de contrôle négatif.

3.3 Analyse de la sensibilité des différentes lignées cellulaires cancéreuses aux trois isolats de réovirus

Un potentiel oncolytique est connu depuis longtemps pour réovirus, mais ce n'est que plus récemment que les études sur des lignées cellulaires cancéreuses humaines sont devenues plus courantes. La littérature est effectivement très riche à ce sujet. Jusqu'à maintenant, les études effectuées pour examiner la sensibilité des lignées cancéreuses humaines au réovirus utilisent un réovirus sérotype 3 Dearing (T3D) de type sauvage. Nous proposons donc dans cette étude une nouvelle approche où la sensibilité des cellules cancéreuses humaines au réovirus sera analysée suite à l'infection par les trois isolats de réovirus (T3D) : H8-2, P4L-12 et PI3-1. Ainsi, il

sera possible de comparer chez un type cellulaire donné, la sensibilité à ces trois isolats et de déterminer éventuellement lequel des isolats de réovirus est le plus efficace pour un type de cancer donné. Comme il a été mentionné dans la section matériel et méthodes, nous bénéficions de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses provenant d'un vaste éventail de 60 lignées, appelées *NCI-60*, regroupant au total 9 types de cancers humains. Une lignée cellulaire a été sélectionnée par type de cancer et pour chacune d'entre elles, des analyses de synthèse protéique et d'efficacité d'infection, suite à l'infection par les trois isolats de réovirus, ont été menées. Dans un premier temps, la synthèse et l'accumulation des protéines virales chez les différentes lignées cellulaires (A498, COLO 205, MCF-7, MOLT-4, NCI-H23, NIH :OVCA-3, PC-3, SF-268 et SK-MEL-2) a été analysée par immunobuvardage avec un anticorps contre la protéine $\sigma 3$ (4F2) suite à une infection de 48 heures à un MOI de 40. Notons que dans tous les cas, une petite fraction de tous les extraits cellulaires a aussi été soumise à une électrophorèse sur gel de poly-acrylamide avec SDS, mais cette fois dans le but d'effectuer une coloration au bleu de Coomassie pour examiner les niveaux de protéines cellulaires totales. Ainsi, les niveaux de la protéine $\sigma 3$ seront toujours exprimés en fonction de la totalité des protéines cellulaires et virales déposées sur gel. L'efficacité d'infection a été déterminée en infectant les lignées cellulaires cancéreuses sur plaque de 96 puits avec différentes dilutions successives d'un facteur 10 de chacun des isolats de réovirus et en repiquant sur des plaques de 96 puits de cellules L929 six jours après l'infection, dans le but de titrer le virus produit, par la méthode $DICT_{50}$. Suite à ces études préliminaires dont les résultats ne sont pas tous montrés ici, quatre lignées de cellules cancéreuses (MCF-7, NCI-H23, PC-3 et SK-MEL-2) ont été sélectionnées pour des études plus poussées de synthèse des protéines virales à différentes MOI et de viabilité cellulaires secondaire à l'infection. La haute fréquence dans la population du type de cancer dont elles proviennent, une réplication efficace pour les trois isolats de réovirus, ou une discrimination intéressante entre les trois virus ont motivés le choix de ces lignées.

Avant de procéder à la caractérisation des lignées cellulaires cancéreuses choisies, un bref résumé de nos observations sur les lignées non sélectionnées sera

effectué. D'abord, chez les cellules A498 (carcinome rénal), la synthèse et l'accumulation des protéines virales telle qu'observée par immunobuvardage avec un anticorps contre la protéine σ_3 est essentiellement équivalente pour les trois isolats de réovirus après une infection de 48 heures à un MOI de 40. D'autre part, en terme d'efficacité d'infection, le virus PI3-1 présente un titre 10 fois supérieur à celui des isolats H8-2 et P4L-12. Chez les cellules COLO 205 et MOLT-4, la synthèse des protéines virales est extrêmement faible voire absente. Chez les cellules COLO 205, un faible niveau de la protéine σ_3 est observé pour le virus H8-2 et cette protéine est présente à l'état de trace pour les isolats P4L-12 et PI3-1. Pour ces deux lignées cellulaires, l'efficacité d'infection par les trois isolats est très faible et équivalente entre les isolats. Les cellules NIH : OVCAR-3 (carcinome ovarien) montrent une forte synthèse et accumulation des protéines virales pour les trois isolats, mais une efficacité d'infection 10 fois supérieur pour l'isolat PI3-1 telle qu'observée par le titre viral. Enfin, chez les cellules SF-268 (gliome) l'isolat PI3-1 présente une fois de plus une meilleure efficacité d'infection (titre 10 fois plus élevé) que les deux autres isolats. En terme de synthèse des protéines virales, il semble que les virus H8-2 et PI3-1 présentent des niveaux équivalents de la protéine σ_3 , toutefois, les niveaux de cette protéine pour le virus P4L-12 ne sont pas détectables par immunobuvardage. Ces résultats indiquent qu'une lignée cellulaire cancéreuse donnée peut effectivement présenter des sensibilités différentes suite à l'infection par chacun des isolats de réovirus. De plus, il est possible de constater que les lignées cellulaires se différencient substantiellement les unes des autres quant à leur profil de sensibilité aux différents isolats de réovirus.

3.3.1 Caractéristiques des lignées cellulaires cancéreuses étudiées

Avant d'aborder les différentes analyses effectuées sur les quatre lignées cellulaires cancéreuses sélectionnées, le tableau IV résumera les informations pertinentes à notre étude concernant ces lignées.

Tableau IV : Lignées cellulaires cancéreuses utilisées pour l'étude

<i>Lignées cellulaires</i>	<i>Type de cancer</i>	<i>Présence d'une voie de signalisation de Ras activée</i>
<i>MCF-7</i>	Adénocarcinome mammaire	Amplification de N- <i>ras</i> [228] Suractivation de <i>src</i> [229]
<i>NCI-H23</i>	Adénocarcinome du poumon (non à petites cellules)	Mutation K- <i>ras</i> codon 12 [230]
<i>PC-3</i>	Adénocarcinome de la prostate	Mutation K- <i>ras</i> G12T [231]; Surexpression de H- <i>ras</i> [232]
<i>SK-MEL-2</i>	Mélanome malin	Mutation N- <i>ras</i> Q61R [233]

3.3.2 Il existe des différences de sensibilité au réovirus entre chaque lignée cellulaire cancéreuse, mais aussi pour chaque isolat de réovirus dans une même lignée cellulaire

Le but de ces travaux est donc de déterminer la sensibilité des différentes lignées cellulaires cancéreuses en observant dans un premier temps, la synthèse et l'accumulation des protéines virales dans les cellules cancéreuses secondaire à des infections à différents MOI, en examinant ensuite la capacité des isolats étudiés à tuer les cellules qu'ils infectent et enfin, en analysant l'efficacité d'infection de chacun des isolats. Les cellules cancéreuses furent alors infectées à des multiplicités d'infection de 10, 100 et 500 particules infectieuses par cellule pendant une période de 48 heures. Une fois les cellules récupérées, une évaluation du pourcentage de viabilité des cellules au bleu de trypan a été effectuée. Le pourcentage de mortalité dû à l'infection a été établi relativement au pourcentage de mortalité observé chez les mêmes cellules non infectées. À noter que les données sont exprimées en pourcentage de viabilité des cellules. Les extraits cellulaires furent préparés et déposés sur gel de façon conforme à ce qui a été décrit dans la section matériel et méthodes. Pour chacun des extraits, deux gels de poly-acrylamide (10%) ont été effectués, l'un sera coloré au bleu de Coomassie pour l'évaluation des protéines totales et l'autre sera utilisé dans le but de faire un immunobuvardage avec

l'anticorps 4F2 contre la protéine $\sigma 3$ de réovirus. De cette façon, les niveaux de la protéine $\sigma 3$ pourront être évalués en fonction des protéines totales. Par exemple, de faibles niveaux de cette protéine observés par immunobuvardage ne suggèrent pas nécessairement une synthèse diminuée des protéines virales, mais peuvent aussi indiquer de faibles niveaux de protéines totales et au contraire une synthèse des protéines virales élevées par rapport à ces niveaux. Les résultats des colorations au bleu de Coomassie, permettant de visualiser la quantité de protéines totales pour chaque type cellulaire, ne seront pas présentés ici et ne seront discutés que lorsque la quantité de protéines totales mises sur gel est différente pour les extraits comparés, ce qui n'est généralement pas le cas. Dans le but de déterminer l'efficacité d'infection de chacun des trois isolats de réovirus dans les différentes lignées cellulaires, ces dernières ont été infectées sur plaque de 96 puits avec des dilutions successives d'un facteur 10 (10^{-2} à 10^{-8}) d'une quantité égale de particules infectieuses pour chaque souche du réovirus. Après 6 jours d'infection, les surnageants ont été repiqués sur plaque de cellules L929 afin de déterminer le titre des virus dans les cellules cancéreuses par la méthode $DICT_{50}$. Cette expérience a été effectuée à deux reprises pour chacun des types cellulaires sauf pour PC-3 où l'expérience a été reproduite trois fois. Étant donné que les différentes cellules cancéreuses utilisées, bien qu'adhérentes ont une forte propension à décoller lorsqu'elles sontensemencées en plaque de 96 puits et rincées à plusieurs reprises, les titres avaient tendance à changer de façon non négligeable lorsque l'expérience était répétée. Malgré tout, ce que nous cherchions à déterminer c'est si la différence entre les titres des différents isolats se maintenait d'une expérience à l'autre, ce qui fut observé dans la plupart des cas. En effet, pour chaque expérience, les titres des trois isolats de réovirus ont été rapportés sur le titre du virus de type sauvage H8-2. Une moyenne des rapports fut établie et un écart type calculé sur ces moyennes pour les virus P4L-12 et PI3-1, le virus H8-2 étant l'unité de référence. Nous sommes conscients qu'étant donné le peu d'essais réalisés dû à l'ampleur de l'expérience, l'écart type calculé sera plus élevé. Toutefois, bien que l'expérience nécessite plusieurs étapes pour mener aux résultats et que les probabilités d'erreur ne sont pas négligeables, les rapports obtenus semblent tout de même reproductibles. En ce qui concerne les titres viraux calculés

pour chacune des lignées cellulaires, seule une expérience représentative est présentée ici. Les résultats obtenus quant à la sensibilité des différentes lignées cellulaires aux trois isolats de réovirus seront décrits dans les lignes qui suivent pour chacune des lignées cancéreuses.

3.3.2.1 MCF-7 (adénocarcinome mammaire)

En terme de synthèse protéique telle que démontrée par immunobuvardage (Figure 11A), les isolats H8-2 et PI3-1 montrent des niveaux équivalents de la protéine σ_3 à des MOI de 10 et de 100. À une MOI de 500, un niveau plus faible de la protéine σ_3 du virus PI3-1 est attribué à une plus faible quantité de protéines totales telle qu'observée sur le gel coloré au bleu de Coomassie (figure non montrée). En ce qui concerne l'isolat P4L-12, il semble que la synthèse des protéines virales est inférieure aux deux autres isolats et ce, à toutes les multiplicités d'infection. Malgré une synthèse protéique moins efficace, P4L-12 semble tuer significativement plus les cellules que le virus de type sauvage (H8-2). En effet, à une MOI de 100, P4L-12 tue pratiquement 50% des cellules infectées tandis que H8-2 ne détruit qu'environ 20% des cellules (figure 11B). À ce niveau, PI3-1 semble surpasser les deux autres isolats puisqu'à une MOI de 10 il tue 40% des cellules tandis que H8-2 et P4L-12 tuent respectivement 0% et 7% des cellules. À une multiplicité d'infection intermédiaire (100 particules infectieuses/cellule), il y a peu de différence entre PI3-1 et P4L-12 et à une MOI de 500, il tue le plus efficacement avec 80% de mortalité cellulaire. L'efficacité d'infection telle que présentée par les titres viraux semble plus élevée pour PI3-1 avec un titre dix fois plus élevé que celui des isolats H8-2 et P4L-12 (Figure 11C et D). Ces résultats suggèrent que les cellules MCF-7 sont susceptibles aux trois isolats étudiés, mais qu'il semble y avoir une sensibilité accrue au virus PI3-1. En effet, PI3-1 montre une meilleure efficacité d'infection et une meilleure capacité à tuer les cellules qu'il infecte.

3.3.2.2 NCI-H23 (adénocarcinome du poumon)

Chez les cellules NCI-H23, à faible multiplicité d'infection (10 particules infectieuses/cellule), la synthèse des protéines pour les trois isolats de réovirus semble équivalentes (figure 12A). À de plus fortes MOI (100 et 500 particules

infectieuses/cellule) le niveau de la protéine σ_3 de l'isolat P4L-12 est plus faible que celui des souches H8-2 et PI3-1 qui eux demeurent équivalents en terme de synthèse protéique. En terme de propension à tuer les cellules qu'ils infectent, la différence entre ces virus est la plus prononcée lorsque les cellules sont infectées à une MOI de 100. En effet, à cette multiplicité d'infection, H8-2 tue seulement 10% des cellules, P4L-12 en tue 35% et PI3-1, 50% (figure 12B). À une multiplicité d'infection de 500, les trois isolats semblent tuer les cellules de façon très efficace. L'efficacité d'infection des isolats P4L-12 et PI3-1 telle que démontrée par les titres viraux semble supérieure à celle de réovirus de type sauvage (figure 12C et D). Toutefois, le virus PI3-1 ne semble pas montrer une efficacité d'infection significativement plus élevée que le virus P4L-12 (figure 12D). Ces résultats indiquent que les cellules NCI-H23 sont susceptibles à l'infection par les trois isolats de réovirus. De plus, il semble qu'au niveau de l'efficacité d'infection et de la capacité à tuer les cellules à une multiplicité d'infection intermédiaire (100 particules infectieuses/cellule), les isolats P4L-12 et PI3-1 soient plus efficaces que le réovirus de type sauvage H8-2.

3.3.2.3 PC-3 (adénocarcinome de la prostate)

Chez les cellules PC-3, la synthèse des protéines virales par les différents isolats est équivalente et observée à de hauts niveaux à toutes les multiplicités d'infection (figure 13A). On note tout de même un niveau de la protéine σ_3 quelque peu plus faible pour l'isolat P4L-12 à une MOI de 100. Malgré une synthèse efficace des protéines virales, il semble que les trois isolats présentent des difficultés à tuer les cellules qu'ils infectent et ce même à de très fortes multiplicités d'infection (figure 13B). En effet, à une MOI de 500, environ 22% des cellules sont tuées par les trois souches virales en 48 heures. Fait intéressant, l'isolat P4L-12 ne tue que 10% des cellules à une MOI de 100 et à plus faible MOI tue environ 20% des cellules. Pour les isolats H8-2 et PI3-1, il semble que leur capacité à tuer les cellules soit la plus efficace à un MOI de 100. Enfin, pour ce qui est de l'efficacité d'infection telle qu'observée par les titres viraux, les figures 13C et 13D suggèrent que le virus PI3-1 surpasse les virus H8-2 et P4L-12 à ce niveau. Bien que H8-2 semble infecter plus efficacement les cellules PC-3 que P4L-12 telle qu'observée à la figure 13C, la figure

13D montre que cette observation n'est pas très significative. Ces résultats indiquent que les cellules PC-3 sont susceptibles à l'infection par les trois isolats de réovirus, mais qu'il semble exister un facteur limitant la destruction de ces cellules après 48 heures à de fortes multiplicités d'infection. Il aurait peut-être été possible d'observer une destruction plus efficace de ces cellules après une plus grande période de temps. En effet, les efficacités d'infection sont comparables aux deux lignées cellulaires décrites précédemment et, tout comme la lignée MCF-7, l'isolat PI3-1 semble démontrer un titre plus élevé que H8-2 et P4L-12 pour les cellules PC-3.

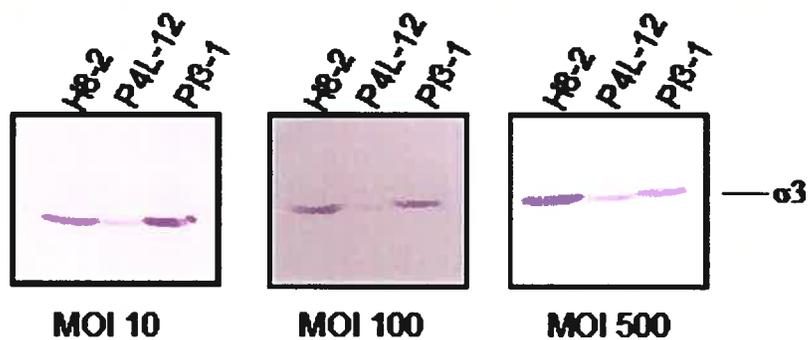
3.3.2.4 SKMEL-2 (mélanome malin)

Au niveau de la synthèse des protéines virales chez les cellules SKMEL-2, il semble qu'un niveau plus faible de la protéine σ_3 soit observé à toutes les multiplicités d'infection pour P4L-12 (figure 14A). La synthèse des protéines virales est équivalente pour les isolats H8-2 et PI3-1 compte tenu d'une quantité de protéines totales moins élevée pour les cellules infectées à des MOI de 100 et de 500 avec le virus PI3-1 probablement corrélé avec une forte mortalité cellulaire. En effet, comme il est possible d'observer à la figure 14B, PI3-1 tue les cellules de façon beaucoup plus efficace que les deux autres isolats à des MOI de 100 et de 500. À une MOI de 100 environ 70% des cellules survivent à l'infection par H8-2 et P4L-12 tandis que seulement 20% des cellules survivent à l'infection par PI3-1. À une MOI de 500, P4L-12 arrive à tuer 70% des cellules, PI3-1 a déjà tué 90% des cellules et aucun changement n'est observé pour le réovirus de type sauvage par rapport à la mortalité observé à la MOI de 100. À faible MOI (10 particule infectieuses/cellule), les trois isolats sont quasi-équivalents et pratiquement aucune mortalité n'est observée. En ce qui concerne l'efficacité d'infection, la différence entre les isolats est faible, mais PI3-1 semble tout de même plus efficace (figure 14C et D). Il est intéressant de constater que les valeurs de titre pour les trois isolats de réovirus sont très élevées chez les cellules SK-MEL-2 comparativement aux autres cellules et ce, surtout pour les isolats P4L-12 et H8-2. Ces résultats montrent que les cellules SK-MEL-2 constituent de très bonnes cibles pour les trois isolats de réovirus.

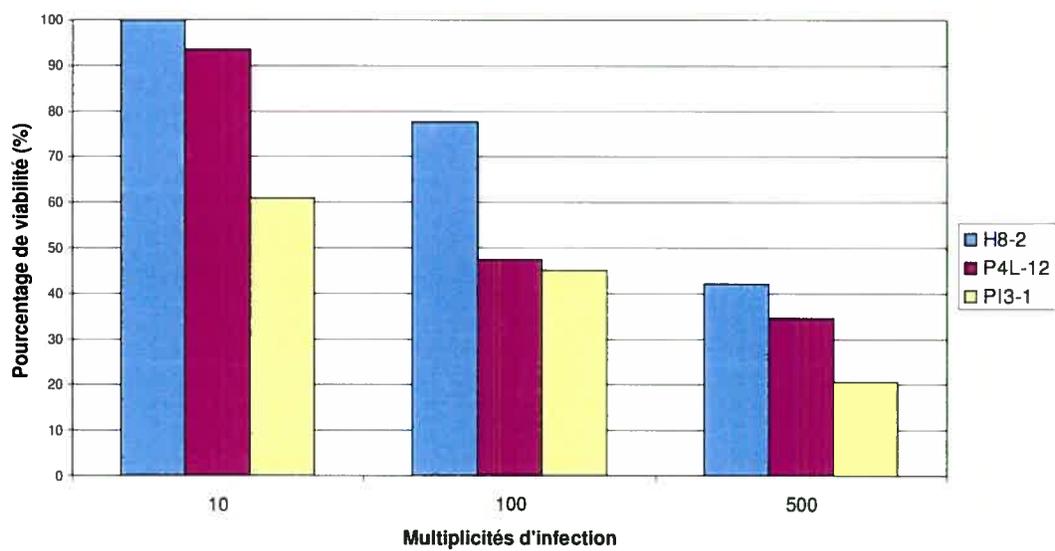
Figures 11 à 14 : Sensibilité des différentes lignées cellulaires cancéreuses à l'infection par les trois différents isolats de réovirus (H8-2, P4L-12 et PI3-1). (A) Analyse de la synthèse et de l'accumulation des protéines virales chez les cellules cancéreuses. Des cellules cancéreuses non infectées et infectées à des MOI de 10, 100 et 500 calculé à partir du titre viral sur les cellules L929, ont été récoltées après 44 heures. Les extraits cellulaires ont été analysés par électrophorèse sur gel de 10% de poly-acrylamide, transférés sur une membrane de nitrocellulose et la protéine $\sigma 3$ de réovirus a été détectée par immunobuvargade tel que décrit dans la section matériel et méthodes. À noter que les cellules non infectées n'apparaissent pas sur cette figure. (B) Pourcentage de viabilité des cellules cancéreuses suite à l'infection par les trois différents isolats de réovirus à des MOI de 10, 100 et 500. Au moment de la récolte des cellules, un aliquot de 50 μ l a été prélevé pour le pétri de cellules non infectées ainsi que pour les pétris de cellules infectées à des MOI de 10, 100 et 500. Un compte de viabilité a été effectué comme défini dans la section matériel et méthodes en ajoutant à cet aliquot 0,4% de bleu de trypan. Le pourcentage de viabilité relié à l'infection par les trois isolats de réovirus a été établi relativement à celui observé chez les cellules non infectées. (C) Efficacité d'infection des cellules cancéreuses par les trois différents isolats de réovirus observée par un titrage sur les cellules L929 par la méthode $DICT_{50}$. Comme décrit dans la section matériel et méthodes, les cellules cancéreuses ont été infectées sur plaque de 96 puits par des dilutions successives d'un facteur 10 (10^{-2} à 10^{-8}) d'une même quantité de départ de particules infectieuses pour chaque isolat de réovirus. Les cellules ont été infectées pendant 6 jours et 50 μ l du surnageant de chaque puit ont été transférées sur plaque de 96 puits de cellules L929. Les résultats montrent une expérience représentative des deux expériences effectuées. Pour chacune des expériences, un rapport entre les titres des différents isolats et celui de H8-2 (le virus de type sauvage) a été établi, une moyenne des rapports des deux expériences a été effectuée et un écart type représenté par la barre d'erreur a été calculé (D).

Figure 11: Sensibilité des cellules MCF-7 à l'infection par les trois différents isolats de réovirus (H8-2, P4L-12 et PI3-1).

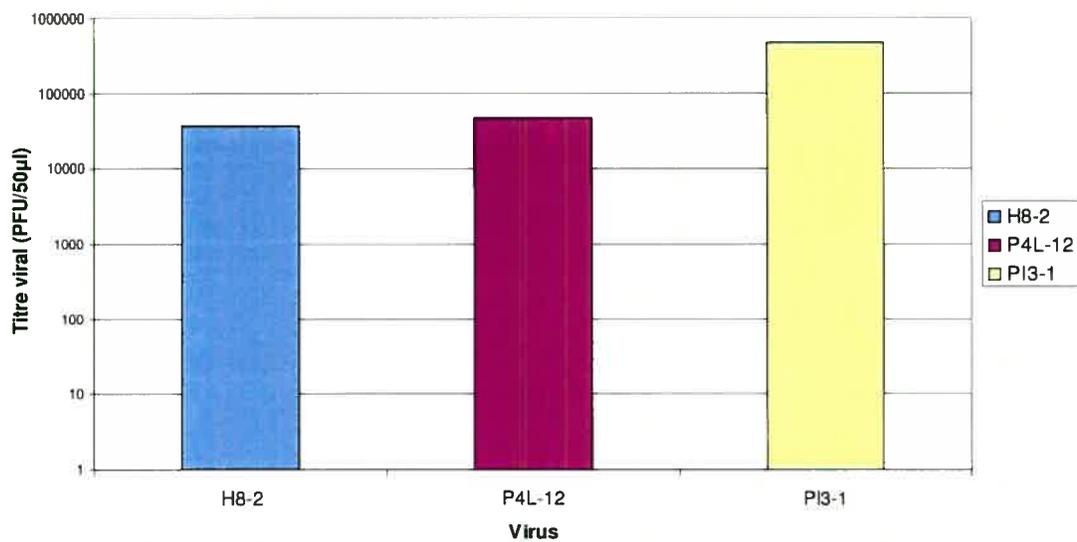
A.



B.



C.



D.

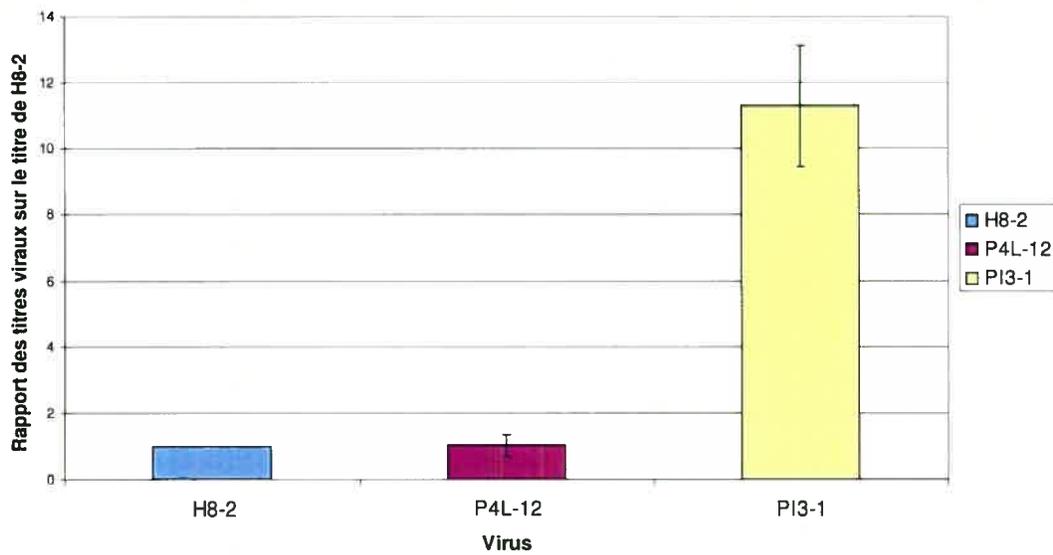
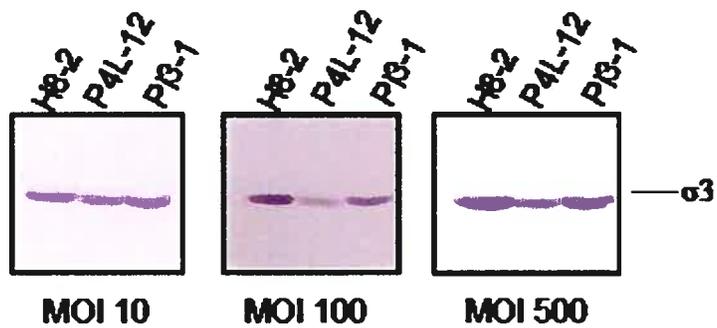
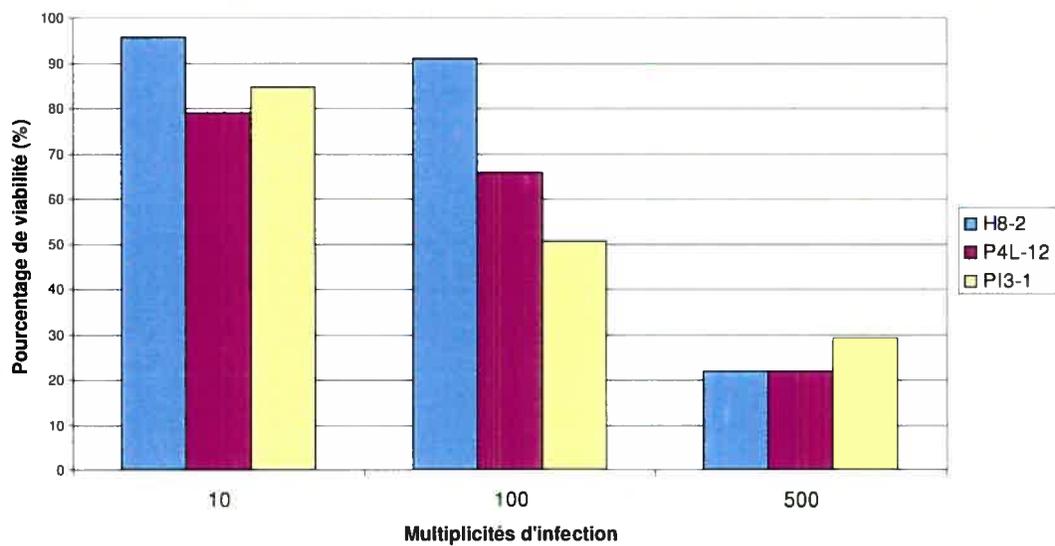


Figure 12: Sensibilité des cellules NCI-H23 à l'infection par les trois différents isolats de réovirus (H8-2, P4L-12 et PI3-1).

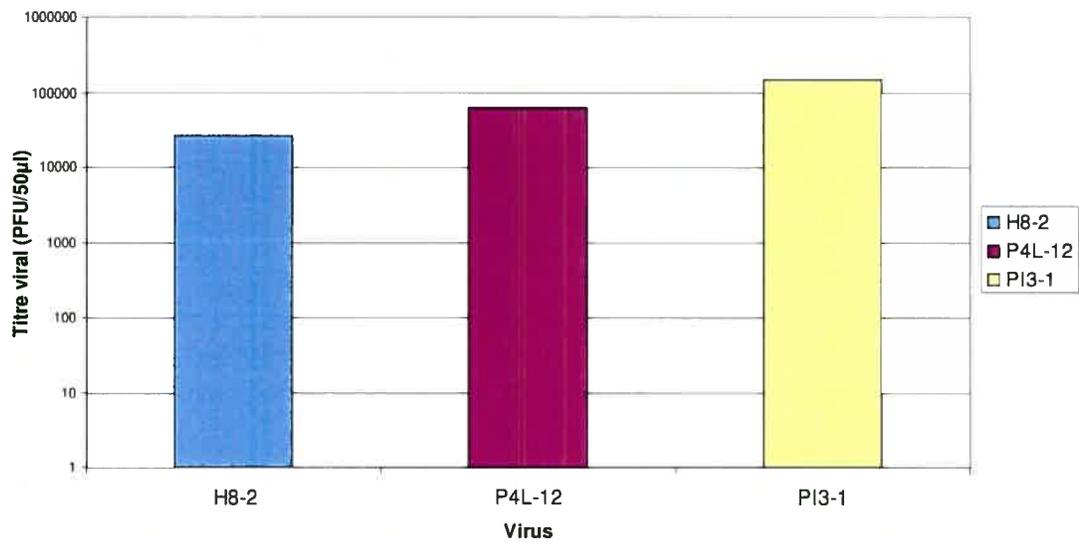
A.



B.



C.



D.

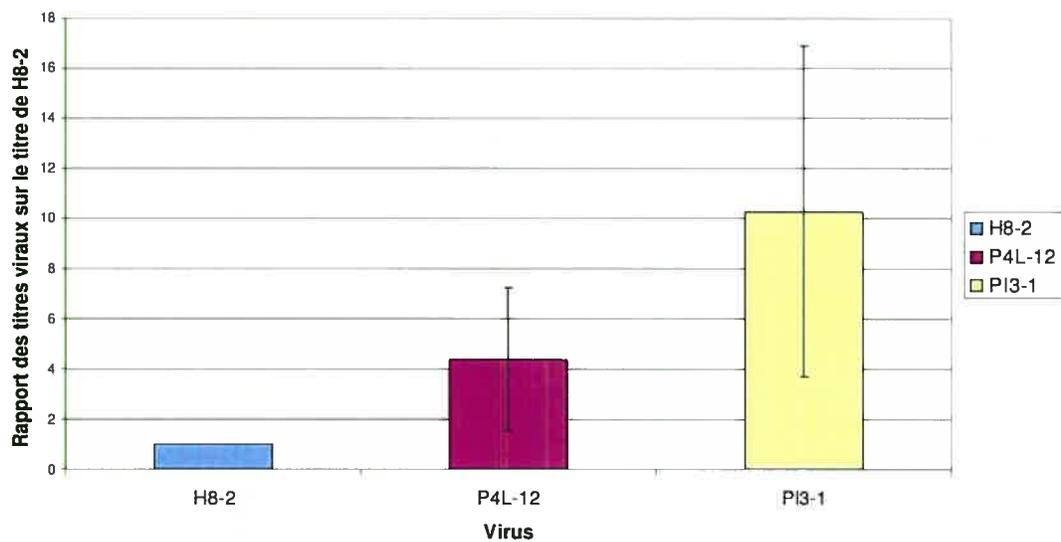
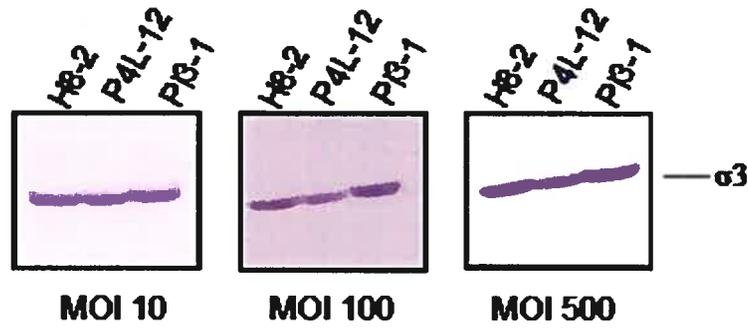
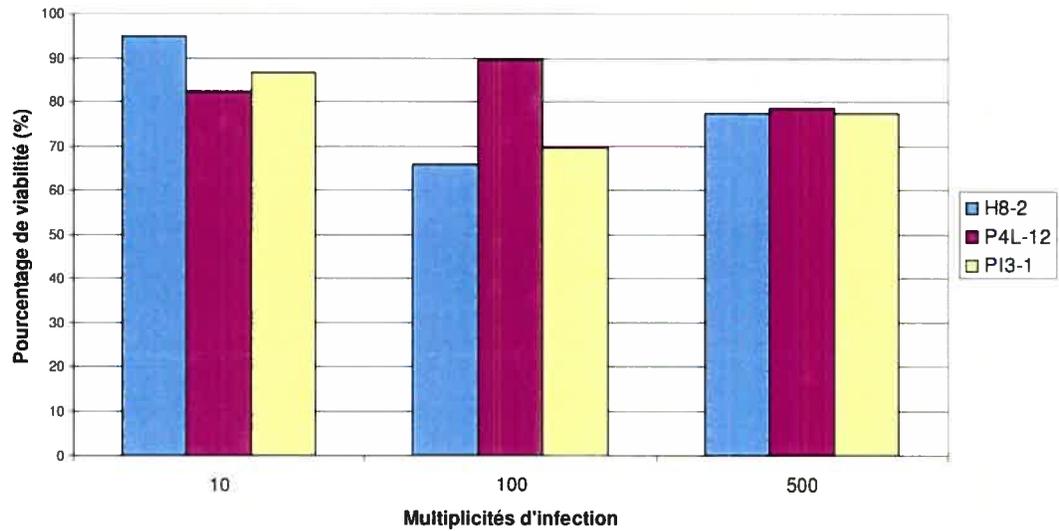


Figure 13 : Sensibilité des cellules PC-3 à l'infection par les trois différents isolats de réovirus (H8-2, P4L-12 et PI3-1).

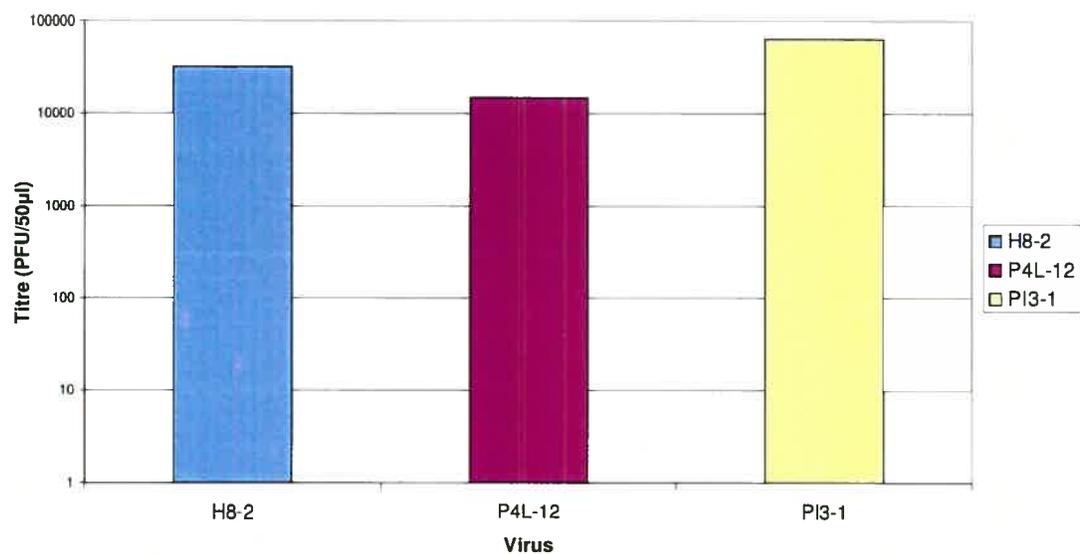
A.



B.



C.



D.

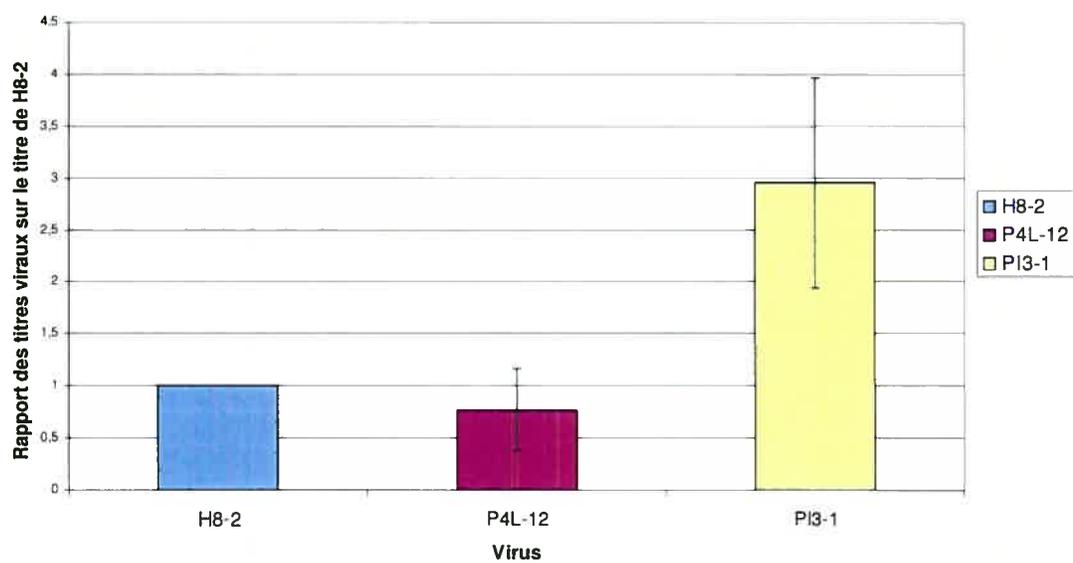
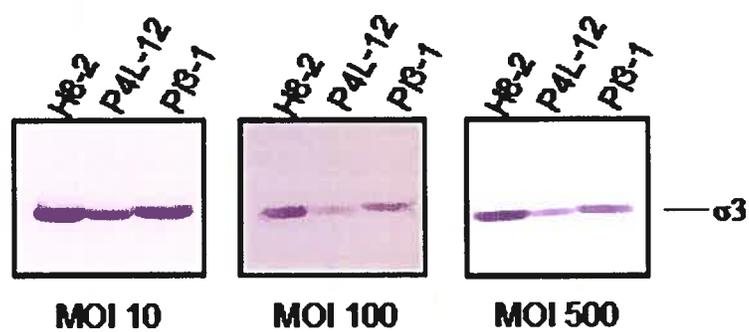
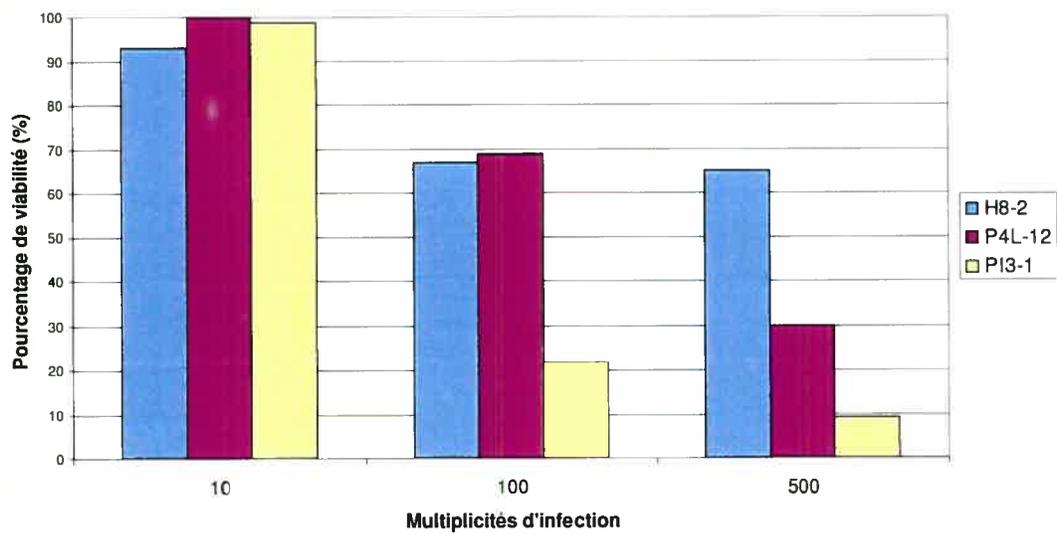


Figure 14 : Sensibilité des cellules SK-MEL-2 à l'infection par les trois différents isolats de réovirus (H8-2, P4L-12 et PI3-1).

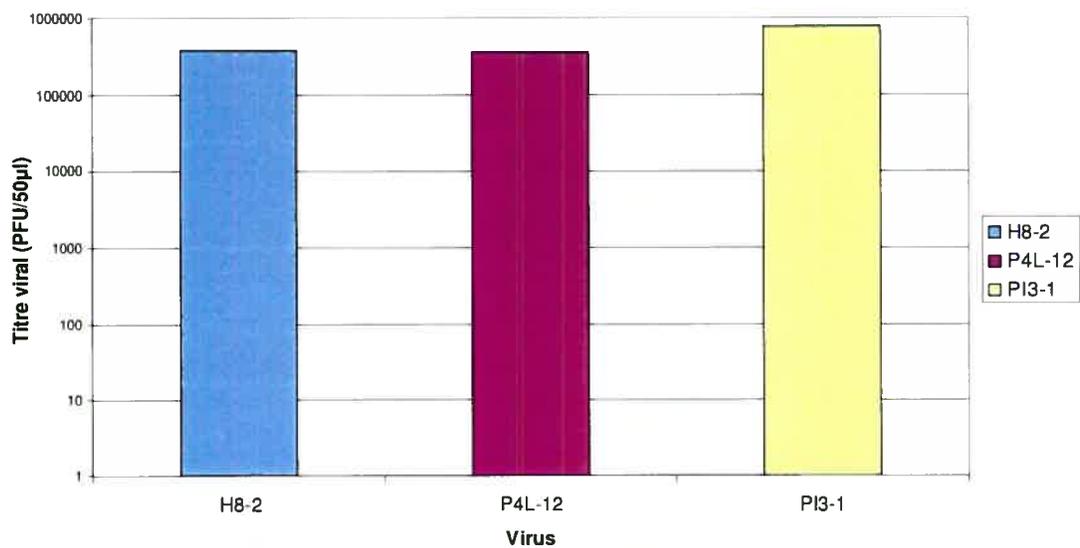
A.



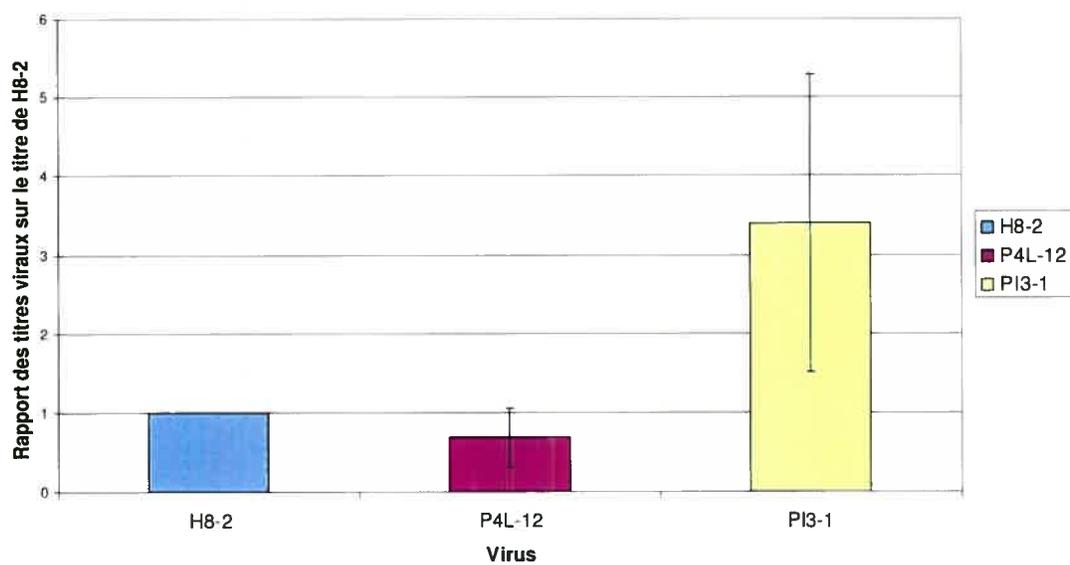
B.



C.



D.



3.4 Les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) sont sensibles à l'infection par la souche H8-2, mais démontrent une résistance aux souches P4L-12 et PI3-1

Des cellules mononucléaires du sang périphérique ou PBMC provenant d'un sujet furent infectées dans un premier temps à une multiplicité d'infection de 40 particules infectieuses/cellule par les trois différents isolats de réovirus pendant une période de 48 heures. Les cellules ont été récupérées et les échantillons ont été soumis à une électrophorèse sur gel de poly-acrylamide (10%) avec SDS. La protéine σ_3 a été détectée par immunobuvardage avec l'anticorps 4F2 conformément à ce qui a été décrit dans la section matériel et méthodes. Du réovirus pur de type sauvage (H8-2) a été ajouté comme contrôle positif, il est retrouvé sous l'appellation T3D à la figure 15 pour ne pas créer d'ambiguïté avec les PBMC infectées par le virus H8-2. Comme il est possible d'observer à la figure 15, les PBMC semblent synthétiser les protéines virales de l'isolat H8-2. Toutefois, la synthèse des protéines virales des isolats P4L-12 et PI3-1 telle qu'observée par la protéine σ_3 n'est pas détectable à ce niveau de sensibilité. Il est à noter qu'en parallèle avec cette expérience, des PBMC ont été traitées à la phytohémagglutinine (PHA) 16 heures avant l'infection et au moment de l'infection à une concentration de 1 $\mu\text{g/ml}$. L'expérience a été menée de la même façon que ce qui a été décrit précédemment. Les résultats, qui ne sont pas montrés ici, sont absolument équivalents à ce qui est observé lorsque les cellules ne sont pas traitées à la PHA (figure 15). Dans le but de confirmer ces résultats, la question a été abordée d'une autre façon soit en infectant les PBMC avec les trois isolats de réovirus à des MOI de 10, 50 et 100 particules infectieuses/cellule et d'effectuer un marquage métabolique de 2 heures après une période de 44 heures d'infection. Les protéines radiomarquées furent détectées suite à une électrophorèse sur gel de 10% de poly-acrylamide avec SDS suivi d'une autoradiographie. En ce qui concerne la synthèse des protéines virales des trois isolats de réovirus, les résultats semblent corroborer ce qui fut préalablement observé par immunobuvardage. En effet, pour ce qui est du réovirus de type sauvage H8-2, des niveaux détectables de la protéine σ_3 sont observés à des MOI de 50 et de 100, une quantité beaucoup plus

faible est détectée à une multiplicité d'infection de 10 (figure 16). Pour les souches P4L-12 et PI3-1, les protéines virales ne sont pas détectables lorsque ces isolats infectent les PBMC à des MOI de 10, 50 et 100. Ces résultats suggèrent que la souche H8-2 se réplique efficacement dans les PBMC récupérés d'un seul et même patient contrairement aux isolats P4L-12 et PI3-1 où il semble y avoir une absence de réplication ou, si réplication il y a, elle se produit à des niveaux non détectables par les méthodes utilisées ici.

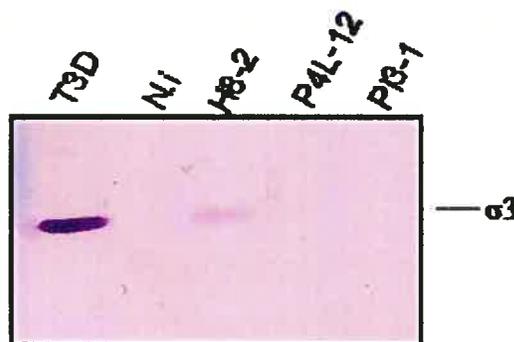


Figure 15 : Analyse de la synthèse et de l'accumulation des protéines virales chez les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC), suite à l'infection par les isolats de réovirus H8-2, P4L-12 et PI3-1. Des PBMC ont été infectées par les trois souches de réovirus à un MOI de 40 pendant 48 heures. Les différents extraits cellulaires ont été soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec SDS (10%) et la protéine $\sigma 3$ a été détectée par immunobuvardage avec l'anticorps 4F2 comme il a été décrit dans la section matériel et méthodes. T3D : virus H8-2 pur; n.i : cellules non infectées.

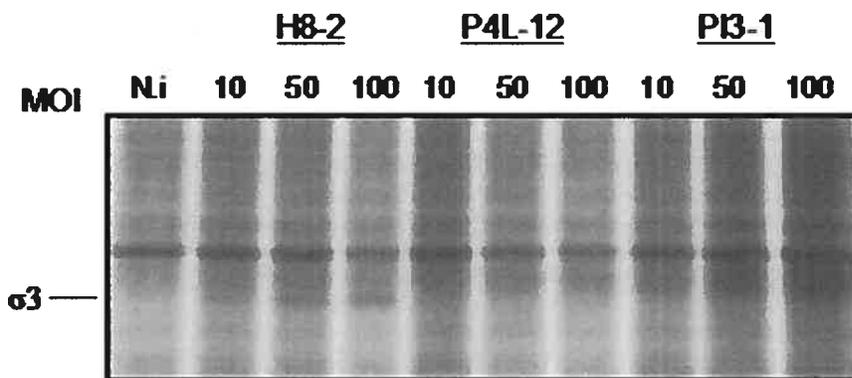


Figure 16: Analyse de la synthèse des protéines virales chez les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC), suite à l'infection par les isolats de réovirus H8-2, P4L-12 et PI3-1 à des MOI de 10, 50 et 100. Des PBMC infectées pendant 44 heures avec les trois isolats de réovirus à des MOI de 10, 50 et 100 ont été soumises à un marquage métabolique de 2 heures conformément à ce qui a été décrit dans la section matériel et méthodes. Les protéines radiomarquées ont été révélées suite à une électrophorèse sur gel de poly-acrylamide (10%) avec SDS suivie d'une autoradiographie. La protéine majeure de la capsid externe du réovirus, $\sigma 3$ a été examinée. N.i, extrait cellulaire non infecté.

Chapitre 4 - Discussion

4.1 Introduction

Le but ultime recherché lors du développement d'un agent thérapeutique contre le cancer est d'optimiser la capacité de cet agent à tuer de façon efficace et sélective les cellules cancéreuses tout en ayant une pathogénicité très limitée, voire absente, pour les cellules normales; on définit ainsi un index thérapeutique. L'efficacité limitée et la toxicité qu'engendrent les thérapies actuellement utilisées ont mené plusieurs groupes à rechercher de nouvelles approches pour le traitement contre le cancer. L'utilisation de virus oncolytiques, c'est-à-dire ayant le potentiel de lyser sélectivement les cellules cancéreuses a refait apparition. En effet, l'origine de cette idée remonte au début du 20^e siècle, lorsqu'en 1920, des observations indiquent que des virus ont la capacité de se répliquer et de lyser des tumeurs chez la souris. Plusieurs autres études se sont ajoutées par la suite, et nombre de virus se sont vus attribuer un potentiel oncolytique. À cette époque, la virologie n'était qu'à ses débuts et la biologie moléculaire, un domaine inexploré. Aujourd'hui, les grandes avancées dans ces domaines, soient d'une part la virologie et d'autre part la compréhension de la biologie moléculaire des cancers, permettent d'envisager la possibilité d'une virothérapie.

Les réovirus de mammifères ont la particularité de posséder une activité antitumorale naturelle et d'avoir une pathogénicité limitée chez l'être humain. Alors que plusieurs virus doivent être génétiquement modifiés par différentes stratégies, notamment l'atténuation par délétion de gènes viraux, l'insertion de séquences promotrices dans le génome viral ou la modification du récepteur, le réovirus peut être directement utilisé. Malgré tout, une meilleure compréhension des déterminants moléculaires de sensibilité à l'infection par le réovirus en relation avec la biologie moléculaire des cancers, pourrait permettre l'optimisation de ce virus naturellement oncolytique.

Des études préalables ont suggéré que l'inhibition de PKR par la protéine oncogénique Ras se trouve au cœur de l'activité oncolytique des réovirus. En effet, l'inhibition de PKR par une voie de signalisation de Ras activée permet la réplication

du réovirus dans des cellules transformées alors que PKR agit normalement comme puissant facteur de restriction de la réplication au sein des cellules normales [178]. De nombreux virus ayant développé une multitude de stratégies pour contrecarrer l'activité de PKR induite par l'interféron, il n'est pas difficile de penser que l'inhibition de PKR par Ras rend les cellules permissives à la réplication virale. La traduction des protéines virales est donc un déterminant critique de susceptibilité de l'hôte. Pourtant, ceci n'est pas le seul déterminant de susceptibilité, la protéolyse du virus en est sans doute un autre non négligeable.

4.2 La décapsidation du réovirus

Il a été démontré que certaines lignées cellulaires non permissives à l'infection par le réovirus le devenaient lorsque des protéases extracellulaires étaient ajoutées au milieu de culture [215]. Des cellules où une restriction dans les étapes précoces du cycle de multiplication est observée, peuvent donc supporter une infection productive par le réovirus lorsque cette restriction est levée par l'ajout de protéases qui permettent une décapsidation partielle du virus. D'autres études ont démontré que des cellules infectées de façon persistante avec un virus s'adaptent de façon à ne plus exprimer de forme mature de la cathepsine L, une cystéine protéase lysosomale, et du même coup deviennent résistantes à l'infection par un réovirus de type sauvage [125]. Ces travaux ont donc permis de mettre en évidence la présence d'un autre déterminant cellulaire de susceptibilité au réovirus : la protéolyse de la capsid externe du réovirus par des protéases cellulaires. Or, il est bien documenté que la transformation de cellules par l'oncogène *ras* entraîne plusieurs modifications du milieu intracellulaire dont des changements notables au niveau de l'expression, de l'activation, de la sécrétion et de la localisation des protéases lysosomales [218-221, 234-237]. Ces protéines lysosomales dont les cystéines protéases, cathepsines L et B, connues pour leur rôle dans la décapsidation du réovirus dans les cellules L929, voient leur activité augmentée et celle de leurs inhibiteurs naturels diminuée dans des cellules fibroblastiques de souris NIH-3T3 transformées par l'oncogène *H-ras* [219]. Finalement, la transformation de ces mêmes cellules par l'oncogène *H-ras* induit une

augmentation de l'ARNm de la cathepsine L de 50 fois [234]. Des études récentes montrent que la transformation de cellules NIH-3T3 par les oncogènes *ras* ou *src* est associée à une augmentation massive de l'expression des cathepsines L et B et une activité cellulaire totale des cystéines protéases doublée [238]. À la lumière de ces différents travaux, il est possible de penser que la transformation des cellules NIH-3T3 par l'oncogène H-*ras* puisse rendre ces cellules permissives à l'infection par réovirus non seulement en inhibant la protéine PKR, mais aussi en facilitant la décapsidation du virus. La figure 6 indique en effet que les cellules transformées par *ras* décapsident le virus avec une meilleure cinétique que les cellules parentales puisque le clivage de la protéine $\mu 1C$ en δ survient à une période plus précoce et à un plus fort niveau dans les cellules transformées. Étant donné qu'il ne semble pas y avoir de plus haut niveaux de protéines virales chez l'une ou l'autre des cellules lorsque les cellules ont été récupérées après une heure d'adsorption à 4°C (T_0), cette différence n'est donc pas due à un meilleur attachement du virus radioactif sur les cellules. Le phénomène observé semble donc relié aux étapes de la décapsidation du virus qui ont lieu à l'intérieur des lysosomes et pourrait corrélérer avec une augmentation de l'expression et de l'activité des cystéines protéases, les cathepsines L et B [219, 234]. Par ailleurs, une localisation altérée des protéases, à la périphérie ou à la surface de la cellule, peut être aussi responsable de la meilleure cinétique de décapsidation. En effet, une altération dans la localisation des cystéines protéases notamment la cathepsine B a été observée chez plusieurs types cellulaires transformés par l'oncogène *ras* [239-241]. Dans les cellules normales, la cathepsine B est localisée dans les vésicules périnucléaires, toutefois, chez les cellules tumorales et transformées, les vésicules sont aussi distribuées à travers tout le cytoplasme et à la périphérie de la cellule [218]. Dans les cellules NIH-3T3, un transport endocytaire non efficace pourrait expliquer le faible niveau de décapsidation puisque la livraison du virus aux lysosomes serait très lente. La présence de vésicules portant des cystéines protéases à la surface ou à la périphérie de la cellule permettrait donc une meilleure cinétique de décapsidation du virus, puisque celui-ci subirait une protéolyse plus rapidement après son entrée dans la cellule tel qu'il est possible d'observer dans les cellules NIH-3T3 transformées par l'oncogène H-*ras*. Enfin, la

sécrétion dans le milieu extracellulaire de protéases pourrait permettre une décapsidation partielle du virus avant même son entrée dans la cellule, ce qui pourrait expliquer la meilleure cinétique de décapsidation observée chez les cellules NIH-Ras. En effet, il a été observé que la transformation de cellules par l'oncogène H-*ras* résulte en une sécrétion de la cathepsine B dans le milieu extracellulaire [242]. De plus, la surexpression de la cathepsine L, consécutive à la transformation de fibroblastes (NIH-3T3) par *ras*, entraîne une augmentation de la sécrétion de la proenzyme qui avait mené à l'origine à la désigner MEP (*major excreted protein*) [243].

Afin de clarifier le mécanisme responsable de la décapsidation préférentielle dans les cellules transformées, il serait éventuellement possible d'évaluer l'activité, les niveaux d'expression, la localisation intracellulaire et le niveau de sécrétion dans le milieu extracellulaire des cystéines protéases pour les cellules NIH-Ras et les cellules parentales qui sont maintenues au laboratoire. De même, il est envisageable d'identifier des différences dans le transport endosomal en observant visuellement les étapes précoces de l'entrée de réovirus marqué au FITC en microscopie optique en temps réel chez les cellules NIH et NIH-Ras.

Le traitement des cellules NIH-Ras et NIH par des agents lysosomotropiques (chlorure d'ammonium et chloroquine) et l'observation subséquente de la toxicité qu'ils induisent dans ces cellules montre qu'il existe manifestement une différence énorme dans le milieu endosomal/lysosomal de ces cellules. Le terme lysosomotropique s'applique à une variété d'amines basiques qui partagent la propriété de devenir souvent plusieurs centaines de fois plus concentrées dans les lysosomes des cellules sur lesquelles ils sont ajoutés [244]. Ces agents, une fois à l'intérieur des endosomes, augmentent le pH de ceux-ci rendant impossible l'activité des protéases lysosomales, notamment les cystéines protéases qui dépendent d'un faible pH pour leur activation. Il a été démontré que le traitement de plusieurs types cellulaires au chlorure d'ammonium entraîne une augmentation des protéines cellulaires totales; d'autres études ont montré une diminution dans la dégradation des

protéines cellulaires [245-248]. Des études indiquent que le traitement de cellules de rat cause une hypertrophie de ces cellules telle qu'observée par une augmentation de la quantité de protéine cellulaire et du volume des cellules [249]. Cette hypertrophie est associée à une suppression de l'activité des cathepsines L et B et d'une réduction du taux de dégradation des protéines, le pH étant devenu sous-optimal pour l'activité des cathepsines. Ces mêmes travaux indiquent que l'augmentation de la quantité totale des protéines cellulaires est due seulement à une diminution du taux de dégradation et non à une synthèse protéique augmentée. Pourtant d'autres études démontrent que le traitement de cellules avec le chlorure d'ammonium entraîne une hypertrophie due à la fois à une réduction du taux de dégradation et à une augmentation de synthèse protéique [250]. D'autre part, il a été démontré que la transformation des cellules NIH-3T3 par l'oncogène *ras* entraîne une perturbation du pH des lysosomes résultant en une alcalinisation de ces vésicules [251]. Ces résultats mis ensemble suggèrent d'une part que des cellules transformées par l'oncogène *ras* puissent être plus sensibles à une hypertrophie secondaire au traitement par des agents lysosomotropiques étant donné le contenu élevé de leur lysosomes en protéases, dont l'activité est supprimée, et à une synthèse protéique augmentée chez ces cellules. D'autre part un pH initialement plus élevé à l'intérieur des lysosomes de ces cellules entraîne une susceptibilité accrue à ne serait-ce qu'une très faible augmentation de pH. La toxicité accrue observée chez les cellules NIH-Ras suite à l'application de faibles concentrations de chlorure d'ammonium ou de chloroquine, telle qu'observée aux figures 7 et 8, illustre probablement une hypertrophie augmentée entraînant la mort cellulaire. D'un autre côté, il a été démontré que la chloroquine entraîne la perméabilisation des membranes lysosomales, une relâche des cystéines protéases actives dans le cytosol, et une activation de la voie apoptotique par les mitochondries (relâche de cytochrome c et activation de la caspase 3) entraînant la mort des cellules [252]. D'autres études montrent que la sensibilité des cellules à ce type d'agent est fonction du niveau de l'activité des cystéines protéases, la sensibilité augmentant avec le niveau d'activité de ces protéases lysosomales [253]. La sensibilité accrue des cellules NIH-Ras à la chloroquine telle qu'observée à la figure 8 peut être attribuée à une plus grande

activité des cystéines protéases et donc à une plus forte induction de la voie apoptotique mitochondriale lorsque ces cellules sont traitées avec différentes concentrations de chloroquine. Notons que chez les cellules NIH, où le niveau de ces protéases est sans doute plus faible, la mortalité survient, mais à une concentration beaucoup plus élevée de chloroquine.

Nos travaux ont démontré que le réovirus se décapside de façon plus efficace dans les cellules transformées par l'oncogène *ras*. Ces résultats suggèrent qu'en plus d'une restriction au niveau de la synthèse des protéines virales, il existerait donc aussi une restriction au niveau de l'entrée du réovirus chez les cellules normales. Les isolats P4L-12, hypersensible à l'interféron, et PI3-1, sensible à des protéases qui ne décapsident pas le réovirus de type sauvage, résistant à des inhibiteurs de l'entrée du réovirus et se décapsidant avec une meilleure cinétique, permettront de mieux comprendre les déterminants qui régissent la sensibilité à l'infection par les réovirus chez les différentes lignées cellulaires cancéreuses.

4.3 Étude chez les lignées cancéreuses humaines

Les travaux présentés dans le cadre de ce mémoire ont permis de démontrer, dans un premier temps, que les trois différents isolats de réovirus ont la capacité de se répliquer chez différentes lignées cellulaires cancéreuses humaines telle qu'observé par la synthèse des protéines virales, la viabilité cellulaire et l'efficacité d'infection. Ces différents isolats diffèrent toutefois entre eux quant à leur efficacité de réplication chez une même lignée cellulaire, mais aussi entre les différentes lignées cancéreuses. Plusieurs études ont été rapportées sur une multitude de lignées cancéreuses humaines, infectant celles-ci avec un réovirus de sérotype 3 (Dearing) de type sauvage [196, 198, 200-203]. L'utilisation d'isolats de réovirus ayant des caractéristiques particulières telles que démontrées dans nos travaux, ouvre une nouvelle avenue à la thérapie oncolytique par réovirus puisqu'elle soulève la possibilité d'optimiser le traitement par l'utilisation de l'isolat le mieux adapté à détruire un type de cancer donné.

L'activation de la voie de signalisation de Ras, un évènement commun chez les cellules cancéreuses, rend ces cellules sensibles à l'infection par le réovirus. La transformation de cellules par l'oncogène *ras*, ou tout autre élément de la voie de signalisation de Ras, est associée à une perte du contact cellulaire et de l'adhérence, à une prolifération cellulaire incontrôlée, à une altération de la morphologie et à une acquisition de propriétés invasives et métastatiques. Ces manifestations illustrent l'ampleur de l'altération des fonctions cellulaires liée à cette transformation et, partant, montrent que le réovirus peut tirer avantage de l'une ou de plusieurs de ces altérations, notamment l'inhibition de PKR. Des études récentes montrent que cette inhibition de PKR passe par la voie RalGEF/p38 qui, par conséquent, est primordiale à l'infection par le réovirus [191]. De quelle façon ces différents éléments sont liés entre eux et s'orchestrent pour inhiber la PKR? La réponse reste inconnue. Il est intéressant de noter que plusieurs études ont démontré une activation augmentée des protéines RalGEF et p38 chez beaucoup de cancers humains [254-257].

L'acquisition des propriétés invasives et métastatiques par les cellules transformées et cancéreuses découle du fait que ces cellules ont une activité augmentée de leur protéases, notamment les cystéines protéases. L'acquisition de ces propriétés est souvent reliée à une voie de signalisation de Ras activée et, est un facteur de mauvais pronostic. Il est possible d'envisager que ces cellules, dont l'activité cystéine protéase est augmentée, permettraient une décapsidation plus efficace du réovirus et par conséquent une infection plus efficace. Les études ont été effectuées sur des lignées cellulaires provenant de carcinome mammaire, d'adénocarcinome du poumon, de carcinome de la prostate et de mélanome malin.

4.3.1 Cellules MCF-7 et carcinome mammaire

Le cancer du sein est le cancer le plus commun après le cancer du poumon et, malgré les tests de dépistages actuels son incidence continue d'augmenter avec un nombre de décès significatif chaque année. En fait, le cancer du sein est le cancer le plus diagnostiqué chez la femme au Canada [258]. Un membre de la famille EGFR

(*epidermal growth factor receptor*), HER-2/neu, est amplifié et surexprimé dans 30% des cancers du sein [193, 194]. De plus, l'activation de la famille des kinases Src est observée dans plusieurs cancers du sein et lignées cellulaires cancéreuses provenant de ceux-ci. Des études effectuées sur plusieurs de ces lignées cellulaires montrent que ces cellules sont effectivement sensibles à l'infection par le réovirus (T3D) de type sauvage [201]. Nos travaux ont démontré la capacité des isolats P4L-12, souche hypersensible à l'interféron et PI3-1, souche se décapsidant avec une meilleure cinétique, à infecter les cellules MCF-7. Ces cellules présentent une amplification de l'oncogène *N-ras*, mais il semble que cette dernière soit plus ou moins prononcée selon les lignées de chaque laboratoire [228]. Néanmoins une activation de la protéine Src est souvent observée dans les cellules MCF-7. L'association de cette protéine tyrosine kinase à des récepteurs tyrosines kinases tels que la famille des EGFR, incluant le récepteur HER-2/neu, et leur activation subséquente est bien documentée [259, 260]. L'augmentation de l'activité de ces récepteurs, secondaire à une activation accrue de la protéine Src, contribue à activer plusieurs voies de signalisation dont la voie de signalisation de Ras. À la lumière de nos résultats, l'isolat P4L-12 conserve une bonne capacité à lyser les cellules qu'il infecte même s'il semble moins efficace au niveau de la réplication à toutes les multiplicités d'infection (Figure 11A et B). Des études ont démontré que les cellules cancéreuses du sein expriment souvent de hauts niveaux de PKR, ceci pourrait expliquer la diminution de la synthèse protéique pour le virus hypersensible à l'interféron, P4L-12, par rapport au réovirus de type sauvage et à la souche PI3-1. De plus, l'induction de l'interféron augmente probablement à de fortes multiplicités d'infection, rendant ainsi l'isolat P4L-12 plus sensible. L'inhibition de PKR par la voie de signalisation de Ras activée, dû à la surexpression de cette protéine kinase, serait moindre dans ce cas mais suffisante pour permettre une réplication significative du réovirus avec une sensibilité modérée à l'interféron, et donc à PKR, pour les isolats H8-2 et PI3-1 (figure 11A). Cette sensibilité modérée du réovirus à l'interféron est due au fait que la protéine virale $\sigma 3$ se lie et séquestre l'ARN bicaténaire, l'activateur de PKR, permettant ainsi la traduction des protéines virales. La liaison à l'ARN double brin s'effectue via deux motifs d'acides aminés basiques probablement au niveau de la

lysine 293 dans la région C-terminale de la protéine $\sigma 3$ [68, 167, 168, 170]. Tel qu'il a été discuté précédemment, la liaison de $\sigma 3$ à l'ARN bicaténaire et la liaison à $\mu 1$, l'autre protéine majeur de la capsid externe, sont deux événements mutuellement exclusifs bien représentés par le cas du mutant ts453. Ce mutant exhibe une résistance accrue à l'interféron, mais la protéine $\sigma 3$ thermosensible est incapable de s'assembler avec $\mu 1$ à température non permissive [179]. La capacité de l'isolat P4L-12 à tuer les cellules MCF-7 qu'il infecte, malgré une faible réplication, pourrait donc être attribuée à une efficacité accrue de l'assemblage. En effet, la séquence protéique de la protéine $\sigma 3$ de l'isolat P4L-12 montre une substitution de la méthionine en isoleucine en position 221 alors que la séquence de la protéine $\mu 1$ de P4L-12 montre une substitution d'une proline en sérine en position 315 (travaux récemment réalisés dans notre laboratoire et non publiés). L'effet de ces mutations sur la conformation de ces protéines et sur leur interaction n'est pas établi, des études de cristallisation et de modélisation tridimensionnelle devront être effectuées. Il serait possible d'investiguer le rôle de ces mutations au niveau de l'association de ces deux protéines et donc de leur assemblage. Il est envisageable qu'une première mutation au niveau de la protéine $\sigma 3$ conférant la sensibilité à l'interféron ait entraîné un changement de conformation de la protéine nécessitant une mutation dans la protéine $\mu 1$ pour maintenir ou renforcer l'interaction de ces deux protéines. Des études subséquentes devront déterminer si P4L-12 s'assemble effectivement de façon plus efficace qu'un réovirus de type sauvage. D'autre part, l'isolat P4L-12 est peut-être un meilleur inducteur d'interféron que les deux autres isolats, ce qui pourrait aussi expliquer le faible niveau de réplication observé. Cette induction accrue d'interféron, bien que néfaste pour cet isolat hypersensible à l'interféron, permettrait quand même une plus forte induction de l'apoptose et la mortalité cellulaire telle qu'observée à la figure 11B. Il serait éventuellement intéressant de vérifier la capacité de ces trois isolats d'induire l'interféron chez les différentes lignées cellulaires cancéreuses étudiées. En ce qui concerne l'isolat PI3-1, il semble que cette souche présente une efficacité d'infection accrue par rapport aux deux autres isolats de réovirus telle qu'indiquée par un titre dix fois plus élevé dans les cellules MCF-7. Il est à noter que la portée statistique de cet écart aurait pu être validée à l'aide d'un

test non paramétrique tel que le test Mann-Whitney. Cette efficacité d'infection peut être attribuée à une forte capacité d'initier l'infection par ce virus puisque sa décapsidation s'effectue avec une meilleure efficacité que celle des deux autres isolats. Une meilleure adsorption de l'isolat PI3-1 aux cellules aurait pu aussi expliquer ce phénomène, mais des expériences effectuées au laboratoire utilisant les différents isolats de réovirus radiomarqués montrent qu'il n'y a pas de différence entre eux au niveau de leur capacité d'adsorption (résultats non montrés dans cette étude). Tel que décrit précédemment, les cellules cancéreuses expriment généralement de hauts niveaux de protéases cellulaires, les plus importantes étant les cystéines protéases (cathepsine L et B) et les protéases aspartiques (cathepsine D). Or il est bien connu qu'aucune protéolyse de la capsid externe n'est observée lorsqu'un réovirus de type sauvage est mis en présence de cathepsine D. Toutefois, un virus arborant la mutation Y354H tel que PI3-1 est sensible à cette protéase [129]. D'un autre côté, il est possible de penser que dans un système présentant d'énormes quantités de protéases actives comme dans les cellules cancéreuses, un virus de type sauvage se décapsidera aussi efficacement que le virus PI3-1, cette quantité de protéases n'étant pas un facteur limitant à la décapsidation. Pourtant, la surexpression, l'activation et la sécrétion accrue de la cathepsine D sont fortement documentées dans le cas du cancer du sein et sont associées à son pouvoir métastatique, souvent facteur de mauvais pronostic [261-264]. Une efficacité d'infection supérieure aux deux autres isolats pourrait donc être expliquée par une décapsidation plus efficace de PI3-1 par les cathepsines D surexprimées dans ces cellules. La réplication de PI3-1 à l'intérieur des cellules MCF-7 est comparable à celle du virus de type sauvage, mais semble plus efficace que la réplication de la souche P4L-12 (figure 11A). Il est important de noter que le titre de PI3-1 dans les cellules MCF-7 est dix fois supérieur aux deux autres isolats. Cela signifie que l'infection des cellules MCF-7 à une multiplicité d'infection de 10 particules infectieuses par cellule (titre établie chez les cellules L929) correspond à une multiplicité d'infection réelle 10 fois supérieure. Il est donc possible que la réplication plus efficace et la plus grande capacité à tuer les cellules pour l'isolat PI3-1 ne soient dues en fait à des MOI réels dix fois plus élevés que pour les deux autres

souches virales. Le virus de type sauvage, H8-2, se réplique de façon très efficace chez ces cellules, probablement en raison d'une moindre sensibilité à l'interféron. Les résultats obtenus pour cette lignée cellulaire montre qu'il est effectivement possible d'observer différents niveaux de sensibilité des cellules infectées selon la souche virale utilisée. Ceci est dû au fait que le profil d'expression des protéines chez les cellules cancéreuses peut avoir un effet marqué sur la réplication du réovirus. L'utilisation d'une souche virale plutôt qu'une autre implique une connaissance approfondie d'une part du virus en question, mais aussi de la biologie moléculaire du type de lignée cellulaire cancéreuse étudié et éventuellement du type de cancer étudié. L'établissement d'un profil d'expression des différentes protéines d'intérêt tel que PKR, les protéases lysosomales (cathepsine L, B et D) et les éléments de la voie de signalisation de Ras/RalGEF/p38 est important pour éventuellement optimiser la thérapie par le réovirus.

4.3.2 Cellules NCI-H23 et adénocarcinome du poumon

Le cancer du poumon est la première cause de mortalité due au cancer au Canada avec 25% de mortalité imputée au cancer chez les femmes et 30% chez les hommes [258]. Environ 22% des carcinomes du poumon ont une voie de signalisation de Ras activée due à une mutation de l'oncogène *K-ras*, ce qui fait de ces cancers des cibles potentielles à la thérapie oncolytique [192]. Étonnement, malgré sa forte incidence et la forte mortalité de ce type de cancer, aucune étude sur des lignées cellulaires cancéreuses du poumon n'a été effectuée avec le réovirus. Nos études avec la lignée cellulaire cancéreuse NCI-H23 provenant d'un adénocarcinome du poumon, montrent qu'elles sont effectivement sensibles à l'infection par les trois isolats de réovirus. La lignée cellulaire NCI-H23 porte une mutation au niveau de l'oncogène *K-ras* [230]. De plus, des études effectuées sur une vingtaine de cancers du poumon non à petites cellules ont démontré que le niveau de la MAP kinase p38 activée est supérieur à celui des tissus normaux du poumon et ce, dans tous les cas [254]. L'importance de l'activation de la p38 dans la permissivité des cellules à l'infection par le réovirus fait de ce type de cancer un bon candidat à l'utilisation de

ce virus [191]. Les trois isolats de réovirus tuent efficacement les cellules qu'ils infectent et montrent des efficacités d'infection comparables (figure 12B, C et D). Notons que l'importance statistique de ces données aurait pu être évaluée par un test Mann-Whitney. Les résultats montrent qu'à de fortes multiplicités d'infection l'isolat P4L-12 semble se répliquer de façon moins efficace. Encore là, une induction accrue de l'interféron à de hautes multiplicités d'infection pourrait expliquer la diminution de la synthèse protéique observée (figure 12A). Les isolats H8-2 et PI3-1, modérément sensibles à l'interféron, voient leur répllication moins affectée. Plusieurs études ont démontré que les cancers du poumon non à petites cellules expriment de hauts niveaux de cathepsines L et B. C'est là un facteur supplémentaire favorisant sans doute une infection efficace par les trois isolats de réovirus [224, 265, 266].

4.3.3 Cellules PC-3 et carcinome de la prostate

Le cancer de la prostate est la deuxième cause de décès chez les hommes après le cancer du poumon au Canada [258]. Près de 50% des carcinomes de la prostate présentent une surexpression de l'oncogène *HER-2/neu* [195]. Des études cliniques de phase I, dans lesquelles réovirus est directement administré au niveau de la glande prostatique chez des patients portant une tumeur, ont été réalisées. La thérapie est sécuritaire et une diminution de 67% du volume de la masse tumorale a été observée chez un patient [267]. Les travaux effectués sur la lignée cancéreuse de la prostate, PC-3, montrent que ces cellules sont hautement permissives à la répllication des trois isolats de réovirus (figure 13A). En effet, des études démontrent que ces cellules présentent une mutation au niveau de *K-ras*, d'autres études indiquent une surexpression de l'oncogène *H-ras*. La présence de ces altérations au niveau de l'oncogène *ras* montre que ces cellules ont une voie de signalisation de Ras activée et qu'elles constituent d'excellentes cibles à l'infection par réovirus. L'efficacité d'infection telle qu'observée par le titre des trois différents isolats semble deux à trois fois meilleure pour l'isolat PI3-1 (figure 13C et D). Une augmentation de l'expression et de l'activité de la cathepsine D peut fournir une explication à ces observations [268]. Il est à noter, tout comme pour les cellules

MCF-7, que la portée statistique de cet écart aurait pu être évalué à l'aide d'un test non paramétrique de type Mann-Whitney. Malgré une synthèse protéique efficace chez les trois isolats de réovirus, il semble que ceux-ci éprouvent certaines difficultés à tuer ces cellules lorsque comparés à leur capacité à tuer les cellules chez les autres lignées cellulaires cancéreuses étudiées. Il est probable que ce phénomène soit relié à la période d'infection, le cycle de multiplication du virus étant peut-être plus lent dans ces cellules, une période de 48 heures d'infection ne suffisait probablement pas à les tuer même à une multiplicité d'infection de 500 particules infectieuses par cellule. Afin de s'en assurer, il faudrait éventuellement observer la réplication du virus et la lyse des cellules PC-3 à différentes périodes, au-delà de 48 heures. D'un autre côté, il est possible que ces cellules montrent une forte capacité à être infectées de façon persistante; elles produiraient du virus avec un minimum d'effets cytopathiques et de mortalité. Ce phénomène a été observé avec plusieurs types cellulaires et plusieurs mécanismes peuvent en être la cause [119]. L'analyse de la mortalité et des effets cytopathiques des cellules suite à l'infection durant des périodes de temps supérieures à 48 heures et parallèlement l'analyse du titre viral du virus relâché dans le milieu de culture permettront d'obtenir plus d'informations à ce sujet. Pourtant, la forte synthèse de protéines virales observée chez ces cellules semble indiquer qu'elles ont une bonne capacité à supporter la décapsidation et la traduction des protéines virales, deux facteurs limitants essentiels à une infection productive par réovirus. D'une part, tel que mentionné pour les cellules MCF-7, il serait intéressant d'observer l'induction d'interféron chez cette lignée cellulaire; il est possible que ces cellules soient incapables d'induire des niveaux adéquats d'interféron. D'autre part, il est possible d'envisager que l'induction de l'apoptose soit déficiente chez ces cellules, ce qui réduirait la mortalité cellulaire par apoptose secondaire à l'infection virale. Or, il semble que les cellules cancéreuses prostatiques androgène-indépendantes telles que la lignée cellulaire PC-3, présentent des défauts d'initiation et d'exécution de l'apoptose en réponse aux traitements conventionnels et ce, malgré un programme de mort cellulaire intact. De fait, il semble que 70% des cancers de la prostate androgène-indépendants surexpriment Bcl-2, une protéine anti-apoptotique [269]. Si tel est le cas pour les cellules PC-3, ceci pourrait expliquer le

faible pourcentage de mortalité observé suite à une infection de 48 heures par réovirus aux différentes multiplicités d'infection et pourrait suggérer qu'une infection plus longue permettrait de tuer les cellules directement par la lyse virale. Des études sur des cellules MDCK surexprimant la protéine Bcl-2 montrent qu'il y a effectivement inhibition de l'apoptose induite par réovirus, mais que cette inhibition ne semble pas affecter la réplication virale [270]. C'est en fait ce qui est observé à la figure 13A et B. Dans le but de vérifier si ce phénomène pourrait être dû à une plus faible induction de l'apoptose, il est envisageable d'observer, pour toutes les lignées cellulaires étudiées, la capacité des différents isolats à induire l'apoptose et de déterminer si effectivement, un pourcentage de mortalité plus faible pour les cellules PC-3 est observé. Le problème au niveau des cancers de la prostate ne réside pas en une prolifération excessive de ces cellules, mais plutôt à une incapacité d'effectuer l'apoptose. Pour les cancers de la prostate hormono-dépendant, ce problème peut être contré par un traitement basé sur l'inhibition des androgènes. Bien entendu ce traitement n'est pas efficace pour les cancers de la prostate androgène-indépendants [269]. L'utilisation d'une thérapie oncolytique par le réovirus ouvre une avenue prometteuse pour le traitement des cancers de la prostate androgène-indépendants puisque les cellules pourront être lysées, malgré une déficience à effectuer l'apoptose. La thérapie oncolytique par réovirus pourra aussi servir de traitement complémentaire pour les cancers de la prostate androgène-dépendants.

4.3.4 Cellules SK-MEL-2 et mélanome malin

Le mélanome est le troisième cancer en importance chez les hommes et les femmes âgés de 30 à 39 ans au Canada [258]. Il y a environ 3000 nouveaux cas par année au Canada et ce cancer est plus fréquent chez les hommes que chez les femmes. Près de 70% des mélanomes exhibent une mutation au niveau de l'oncogène *B-raf* et 10 à 20% présentent une mutation dans l'oncogène *N-ras* [183, 197]. Les cellules SK-MEL-2, dérivées d'un mélanome malin, présentent une mutation dans l'oncogène *N-ras*. De plus, des études effectuées sur une lignée de cellules de mélanome malin ont démontré que l'expression de la p38, importante pour

l'infection par réovirus, est corrélée avec le potentiel invasif puisque cette voie contribue à augmenter l'expression de la métalloprotéase de la matrice 2 (MMP-2) et d'autres protéases impliquées directement dans le processus invasif [271]. Les mélanomes malins constituent donc des cibles potentielles à l'infection par le réovirus. Nos études démontrent que la lignée cellulaire SK-MEL-2 est sensible aux trois isolats de réovirus. Toutefois, tel que décrit précédemment, il semble que P4L-12 se réplique de façon moins efficace chez ces cellules. Un niveau de PKR plus élevé chez les mélanomes [153] ou une plus forte induction de l'interféron par P4L-12 constitue des explications possibles. En effet, il est possible de noter qu'à de plus fortes multiplicités d'infection et, par conséquent, à de plus forts niveaux d'interféron, la réplication de P4L-12 devient nettement plus faible que la réplication des deux autres isolats (figure 14A). Une meilleure efficacité d'infection de l'isolat PI3-1 et une forte capacité à tuer les cellules sont probablement reliées à une décapsidation plus efficace de ce virus (figure 14B, C et D). Un fois de plus, un test Mann-Whitney pourrait permettre dans ce cas de valider la signification statistique de ces différences observées. Enfin, il est également possible que cet isolat soit un inducteur plus efficace de l'apoptose chez ce type de cellule.

4.4 Conclusion

Cette étude descriptive suggère la possibilité de disposer de différentes souches de réovirus pour la thérapie oncolytique et, selon le type de cancer à traiter, d'utiliser le meilleur isolat de réovirus capable de détruire efficacement les cellules cancéreuses tout en épargnant le tissu sain. Les grandes avancées dans le domaine de la biologie moléculaire ont permis une meilleure compréhension des altérations génétiques menant à l'état néoplasique. Ainsi, ces connaissances ont permis de comprendre en partie les déterminants moléculaires de sensibilité au réovirus des cellules cancéreuses. Il est maintenant établi que la voie Ras/RalGEF/p38 est nécessaire à la permissivité des cellules au réovirus. Or, ces voies sont fort complexes, les protéines qu'elles régulent sont nombreuses et les fonctions diverses. Quels sont exactement les déterminants moléculaires de sensibilité des différents

types de cancer et quelles sont les protéines cellulaires en jeu sont des questions auxquelles on doit répondre pour optimiser une éventuelle thérapie oncolytique par le réovirus.

4.5 Perspectives

Il est bien connu qu'un facteur central déterminant l'efficacité de l'infection au réovirus est la PKR. Cette protéine est inhibée par la voie de signalisation de Ras activée et cette inhibition rend les cellules permissives à l'infection par le réovirus. Or, il semble que pour certains cancers, une surexpression de cette protéine est observée, probablement en réponse à la transformation maligne. L'effet inhibiteur de Ras sur une PKR surexprimée doit probablement être quelque peu diminué, mais pas suffisamment pour empêcher des virus avec une sensibilité modérée à l'interféron de se répliquer de façon efficace dans les cellules cancéreuses. Une thérapie antitumorale de plus en plus considérée consiste à inhiber la protéine HSP90, un inhibiteur de PKR, ce qui revient à activer cette dernière et, par conséquent à induire l'apoptose [153]. Une thérapie complémentaire avec un isolat de réovirus implique que celui-ci ne soit pas hypersensible à PKR. Toutefois, à la lumière des résultats obtenus, malgré une réplication moins efficace de P4L-12 dans plusieurs lignées cellulaires, il n'en reste pas moins que cette souche a une forte capacité à tuer les cellules qu'elle infecte. De plus, il a été démontré que cette souche permet une meilleure discrimination entre les cellules NIH-3T3 transformées et les cellules parentales. Dans l'optique d'une thérapie contre le cancer, le meilleur isolat est celui capable de tuer spécifiquement les cellules cancéreuses et P4L-12 semble l'isolat de choix. De plus, la capacité à tuer les cellules, malgré une faible réplication est un phénomène intéressant dans l'optique d'une thérapie puisque cela fait en sorte de réduire la quantité de virus circulant dans l'organisme et réduit donc le risque d'infection des tissus sains. Bien entendu, chacun des isolats devra être évalué pour sa capacité à discriminer entre les cellules cancéreuses humaines et les cellules parentales. De plus, des études avec les tumeurs cancéreuses humaines implantées chez la souris devront être effectuées afin d'évaluer l'activité antitumorale *in vivo* de

chacun des isolats de réovirus, leur capacité à épargner les tissus sains, la réponse immunitaire et la possibilité d'effectuer un traitement systémique.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont aussi démontré que les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) présentent une certaine sensibilité à l'infection par le réovirus de type sauvage H8-2, mais une résistance aux isolats P4L-12 et PI3-1. Ces données suggèrent qu'un traitement systémique avec un réovirus de type sauvage serait plus dommageable qu'un traitement avec les deux autres isolats. De même, il faudra considérer l'utilisation de ces isolats dans le traitement de lymphomes et de leucémies plutôt que le virus de type sauvage. Éventuellement, ce même type d'étude, cette fois sur des PBMC obtenus de plusieurs sujets devra être effectué dans le but d'établir si nos résultats sont généralisables. Le cas échéant, la capacité des virus à tuer ces cellules devra être établie et ce à différentes multiplicités d'infection.

Nos travaux révèlent l'importance d'évaluer les différents niveaux des protéines qui déterminent potentiellement la sensibilité aux différents isolats de réovirus, notamment les éléments de la voie de signalisation de Ras dont RalGEF et p38, PKR et les cathepsines L, B et D. Ces niveaux devront être comparés aux cellules normales pour chaque type de cancer, ainsi, il sera possible d'établir si effectivement le niveau de ces protéines est corrélé avec le potentiel oncolytique d'un isolat donné. De plus, l'analyse de la capacité d'induction de l'apoptose de chacun des isolats sur chacune des lignées cellulaires cancéreuses ainsi que l'étude de la capacité de ces isolats à induire l'interféron permettront une meilleure caractérisation du potentiel oncolytique de ces souches virales sur les cellules qu'ils infectent. L'infection des cellules cancéreuses à de plus faibles multiplicités d'infection pendant différentes périodes de temps avec les trois isolats de réovirus permettra de définir la plus faible quantité de réovirus capable de tuer la totalité ou presque totalité des cellules cancéreuses dans une période de temps raisonnable.

Cette étude a aussi permis de démontrer le potentiel oncolytique d'un isolat de réovirus plus efficace au niveau de la décapsidation, PI3-1. L'utilisation d'un tel isolat dans des cellules cancéreuses dont l'activité et l'expression de la cathepsine D sont augmentées confère à cette souche un avantage sur les autres souches, celles-ci étant résistantes à cette protéase. Néanmoins, il est possible de penser qu'un tel isolat puisse infecter des cellules normales puisqu'il a une meilleure capacité à initier l'infection. D'un autre côté, les études effectuées sur les PBMC montrent que ces cellules sont résistantes à l'infection par la souche PI3-1, démontrant qu'il ne suffit pas seulement d'une décapsidation efficace, mais aussi d'une série de facteurs menant à une infection productive. De plus, en vue d'obtenir chez un même isolat de réovirus la capacité à se décapsider de façon plus efficace tout en discriminant entre les cellules cancéreuses et les cellules normales, il est envisageable d'infecter des cellules L929 avec la souche virale P4L-12 en présence de chlorure d'ammonium ou de E64 afin de sélectionner un isolat ayant à la fois les propriétés de P4L-12 et de PI3-1. La mutation qui confère à PI3-1 une meilleure cinétique de décapsidation est bien connue, mais la génétique inverse n'étant pas au point chez le réovirus, d'autres méthodes doivent être exploitées pour arriver à nos fins.

Enfin, cette étude ouvre la voie à une thérapie oncolytique par le réovirus beaucoup plus adaptée au type de cancer à traiter et ce, par l'utilisation de l'isolat le plus efficace pour une tumeur donnée. La connaissance des déterminants de sensibilité à l'infection par le réovirus des différents cancers et la capacité d'isoler des souches de réovirus capable d'infecter spécifiquement ces cellules, permettront d'effectuer un grand pas dans le domaine de la virothérapie. Avec l'utilisation de réovirus pour la thérapie oncolytique, les possibilités sont nombreuses et n'ont que pour seule limite notre créativité.

Références

1. Sabin, A.B., *Reoviruses*. Science, 1959. **130**: p. 1387-9.
2. Rosen, L., H.E. Evans, and A. Spickard, *Reovirus infections in human volunteers*. Am J Hyg, 1963. **77**: p. 29-37.
3. Minuk, G.Y., R.W. Paul, and P.W. Lee, *The prevalence of antibodies to reovirus type 3 in adults with idiopathic cholestatic liver disease*. J Med Virol, 1985. **16**(1): p. 55-60.
4. Tyler, K.L., et al., *Isolation and molecular characterization of a novel type 3 reovirus from a child with meningitis*. J Infect Dis, 2004. **189**(9): p. 1664-75.
5. Barton, E.S., et al., *Utilization of sialic acid as a coreceptor is required for reovirus-induced biliary disease*. J Clin Invest, 2003. **111**(12): p. 1823-33.
6. Nibert, M.L., *Reoviruses and their replication*. Fundamental Virology, 2001. **Fourth edition**: p. 793-842.
7. Nibert, M.L., *Structure of mammalian orthoreovirus particles*. Curr Top Microbiol Immunol, 1998. **233**(Pt 1): p. 1-30.
8. Vieler, E., et al., *Characterization of a reovirus isolate from a rattle snake, *Crotalus viridis*, with neurological dysfunction*. Arch Virol, 1994. **138**(3-4): p. 341-4.
9. Rosen, L., et al., *Observations on a newly recognized virus (Abney) of the reovirus family*. Am J Hyg, 1960. **71**: p. 258-65.
10. Attoui, H., et al., *Sequence characterization of Ndelle virus genome segments 1, 5, 7, 8, and 10: evidence for reassignment to the genus Orthoreovirus, family Reoviridae*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **287**(2): p. 583-8.
11. Gomatos, P.J., et al., *Reovirus type 3: physical characteristics and interaction with L cells*. Virology, 1962. **17**: p. 441-54.
12. Muthukrishnan, S. and A.J. Shatkin, *Reovirus genome RNA segments: resistance to S-1 nuclease*. Virology, 1975. **64**(1): p. 96-105.
13. Shatkin, A.J., *Inactivity of purified reovirus RNA as a template for E. coli polymerases in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1965. **54**(6): p. 1721-8.
14. Watanabe, Y. and A.F. Graham, *Structural units of reovirus ribonucleic acid and their possible functional significance*. J Virol, 1967. **1**(4): p. 665-77.

15. Fields, B.N., *Temperature-sensitive mutants of reovirus type 3 features of genetic recombination*. Virology, 1971. **46**(1): p. 142-8.
16. Cross, R.K. and B.N. Fields, *Use of an aberrant polypeptide as a marker in three-factor crosses: further evidence for independent reassortment as the mechanism of recombination between temperature-sensitive mutants of reovirus type 3*. Virology, 1976. **74**(2): p. 345-62.
17. Furuichi, Y., et al., *Mechanism of formation of reovirus mRNA 5'-terminal blocked and methylated sequence, m7GpppGmpC*. J Biol Chem, 1976. **251**(16): p. 5043-53.
18. Miura, K., et al., *The 5'-terminal nucleotide sequences of the double-stranded RNA of human reovirus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(10): p. 3979-83.
19. Furuichi, Y., A. LaFiandra, and A.J. Shatkin, *5'-Terminal structure and mRNA stability*. Nature, 1977. **266**(5599): p. 235-9.
20. Desrosiers, R.C., G.C. Sen, and P. Lengyel, *Difference in 5' terminal structure between the mRNA and the double-stranded virion RNA of reovirus*. Biochem Biophys Res Commun, 1976. **73**(1): p. 32-9.
21. Ernst, H. and A.J. Shatkin, *Reovirus hemagglutinin mRNA codes for two polypeptides in overlapping reading frames*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(1): p. 48-52.
22. Wiener, J.R., J.A. Bartlett, and W.K. Joklik, *The sequences of reovirus serotype 3 genome segments M1 and M3 encoding the minor protein mu 2 and the major nonstructural protein mu NS, respectively*. Virology, 1989. **169**(2): p. 293-304.
23. Schonberg, M., et al., *Asynchronous synthesis of the complementary strands of the reovirus genome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(2): p. 505-8.
24. Mochow-Grundy, M. and T.S. Dermody, *The reovirus S4 gene 3' nontranslated region contains a translational operator sequence*. J Virol, 2001. **75**(14): p. 6517-26.
25. Drayna, D. and B.N. Fields, *Activation and characterization of the reovirus transcriptase: genetic analysis*. J Virol, 1982. **41**(1): p. 110-8.

26. Coombs, K.M., *Stoichiometry of reovirus structural proteins in virus, ISVP, and core particles*. Virology, 1998. **243**(1): p. 218-28.
27. Cross, R.K. and B.N. Fields, *Temperature-sensitive mutants of reovirus type 3: studies on the synthesis of viral RNA*. Virology, 1972. **50**(3): p. 799-809.
28. Zhang, X., et al., *Reovirus polymerase lambda 3 localized by cryo-electron microscopy of virions at a resolution of 7.6 Å*. Nat Struct Biol, 2003. **10**(12): p. 1011-8.
29. White, C.K. and H.J. Zweerink, *Studies on the structure of reovirus cores: selective removal of polypeptide lambda 2*. Virology, 1976. **70**(1): p. 171-80.
30. Xu, P., S.E. Miller, and W.K. Joklik, *Generation of reovirus core-like particles in cells infected with hybrid vaccinia viruses that express genome segments L1, L2, L3, and S2*. Virology, 1993. **197**(2): p. 726-31.
31. Reinisch, K.M., M.L. Nibert, and S.C. Harrison, *Structure of the reovirus core at 3.6 Å resolution*. Nature, 2000. **404**(6781): p. 960-7.
32. Noble, S. and M.L. Nibert, *Characterization of an ATPase activity in reovirus cores and its genetic association with core-shell protein lambda1*. J Virol, 1997. **71**(3): p. 2182-91.
33. Bisailon, M. and G. Lemay, *Characterization of the reovirus lambda1 protein RNA 5'-triphosphatase activity*. J Biol Chem, 1997. **272**(47): p. 29954-7.
34. Bisailon, M., J. Bergeron, and G. Lemay, *Characterization of the nucleoside triphosphate phosphohydrolase and helicase activities of the reovirus lambda1 protein*. J Biol Chem, 1997. **272**(29): p. 18298-303.
35. Bisailon, M. and G. Lemay, *Molecular dissection of the reovirus lambda1 protein nucleic acids binding site*. Virus Res, 1997. **51**(2): p. 231-7.
36. Coombs, K.M., *Identification and characterization of a double-stranded RNA- reovirus temperature-sensitive mutant defective in minor core protein mu2*. J Virol, 1996. **70**(7): p. 4237-45.
37. Noble, S. and M.L. Nibert, *Core protein mu2 is a second determinant of nucleoside triphosphatase activities by reovirus cores*. J Virol, 1997. **71**(10): p. 7728-35.

38. Yin, P., M. Cheang, and K.M. Coombs, *The M1 gene is associated with differences in the temperature optimum of the transcriptase activity in reovirus core particles*. J Virol, 1996. **70**(2): p. 1223-7.
39. Brentano, L., et al., *The reovirus protein mu2, encoded by the M1 gene, is an RNA-binding protein*. J Virol, 1998. **72**(10): p. 8354-7.
40. Dermody, T.S., et al., *The S2 gene nucleotide sequences of prototype strains of the three reovirus serotypes: characterization of reovirus core protein sigma 2*. J Virol, 1991. **65**(11): p. 5721-31.
41. Cleveland, D.R., H. Zarbl, and S. Millward, *Reovirus guanylyltransferase is L2 gene product lambda 2*. J Virol, 1986. **60**(1): p. 307-11.
42. Luongo, C.L., et al., *Binding site for S-adenosyl-L-methionine in a central region of mammalian reovirus lambda2 protein. Evidence for activities in mRNA cap methylation*. J Biol Chem, 1998. **273**(37): p. 23773-80.
43. Schiff, L.A., *Reovirus capsid proteins sigma 3 and mu 1: interactions that influence viral entry, assembly, and translational control*. Curr Top Microbiol Immunol, 1998. **233**(Pt 1): p. 167-83.
44. Lee, P.W., E.C. Hayes, and W.K. Joklik, *Characterization of anti-reovirus immunoglobulins secreted by cloned hybridoma cell lines*. Virology, 1981. **108**(1): p. 134-46.
45. Nibert, M.L., L.A. Schiff, and B.N. Fields, *Mammalian reoviruses contain a myristoylated structural protein*. J Virol, 1991. **65**(4): p. 1960-7.
46. Mabrouk, T. and G. Lemay, *The sequence similarity of reovirus sigma 3 protein to picornaviral proteases is unrelated to its role in mu 1 viral protein cleavage*. Virology, 1994. **202**(2): p. 615-20.
47. Tillotson, L. and A.J. Shatkin, *Reovirus polypeptide sigma 3 and N-terminal myristoylation of polypeptide mu 1 are required for site-specific cleavage to mu 1C in transfected cells*. J Virol, 1992. **66**(4): p. 2180-6.
48. Shing, M. and K.M. Coombs, *Assembly of the reovirus outer capsid requires mu 1/sigma 3 interactions which are prevented by misfolded sigma 3 protein in temperature-sensitive mutant tsG453*. Virus Res, 1996. **46**(1-2): p. 19-29.

49. Liemann, S., et al., *Structure of the reovirus membrane-penetration protein, *Mu1*, in a complex with its protector protein, *Sigma3**. *Cell*, 2002. **108**(2): p. 283-95.
50. Nibert, M.L., et al., *Putative autocleavage of reovirus *mu1* protein in concert with outer-capsid disassembly and activation for membrane permeabilization*. *J Mol Biol*, 2005. **345**(3): p. 461-74.
51. Odegard, A.L., et al., *Putative autocleavage of outer capsid protein *micro1*, allowing release of myristoylated peptide *micro1N* during particle uncoating, is critical for cell entry by reovirus*. *J Virol*, 2004. **78**(16): p. 8732-45.
52. Nibert, M.L., *A carboxy-terminal fragment of protein *mu1/mu1C* is present in infectious subviral particles of mammalian reoviruses and is proposed to have a role in penetration*. *J Virol*, 1992. **66**: p. 6408-6418.
53. Chandran, K. and M.L. Nibert, *Protease cleavage of reovirus capsid protein *mu1/mu1C* is blocked by alkyl sulfate detergents, yielding a new type of infectious subvirion particle*. *J Virol*, 1998. **72**(1): p. 467-75.
54. Chandran, K., et al., *In vitro recoating of reovirus cores with baculovirus-expressed outer-capsid proteins *mu1* and *sigma3**. *J Virol*, 1999. **73**(5): p. 3941-50.
55. Chandran, K., et al., *The delta region of outer-capsid protein *micro 1* undergoes conformational change and release from reovirus particles during cell entry*. *J Virol*, 2003. **77**(24): p. 13361-75.
56. Chandran, K., D.L. Farsetta, and M.L. Nibert, *Strategy for nonenveloped virus entry: a hydrophobic conformer of the reovirus membrane penetration protein *micro 1* mediates membrane disruption*. *J Virol*, 2002. **76**(19): p. 9920-33.
57. Dryden, K.A., et al., *Early steps in reovirus infection are associated with dramatic changes in supramolecular structure and protein conformation: analysis of virions and subviral particles by cryoelectron microscopy and image reconstruction*. *J Cell Biol*, 1993. **122**(5): p. 1023-41.

58. Virgin, H.W.t., et al., *Monoclonal antibodies to reovirus reveal structure/function relationships between capsid proteins and genetics of susceptibility to antibody action*. J Virol, 1991. **65**(12): p. 6772-81.
59. Fields, B.N., C.S. Raine, and S.G. Baum, *Temperature-sensitive mutants of reovirus type 3: defects in viral maturation as studied by immunofluorescence and electron microscopy*. Virology, 1971. **43**(3): p. 569-78.
60. Drayna, D. and B.N. Fields, *Genetic studies on the mechanism of chemical and physical inactivation of reovirus*. J Gen Virol, 1982. **63** (Pt 1): p. 149-59.
61. Nibert, M.L., *Mechanisms of viral pathogenesis. Distinct forms of reoviruses and their roles during replication in cells and host*. J Clin Invest, 1991. **88**: p. 727-734.
62. Shepard, D.A., J.G. Ehnstrom, and L.A. Schiff, *Association of reovirus outer capsid proteins sigma 3 and mu 1 causes a conformational change that renders sigma 3 protease sensitive*. J Virol, 1995. **69**(12): p. 8180-4.
63. Sturzenbecker, L.J., et al., *Intracellular digestion of reovirus particles requires a low pH and is an essential step in the viral infectious cycle*. J Virol, 1987. **61**(8): p. 2351-61.
64. Baer, G.S. and T.S. Dermody, *Mutations in reovirus outer-capsid protein sigma3 selected during persistent infections of L cells confer resistance to protease inhibitor E64*. J Virol, 1997. **71**(7): p. 4921-8.
65. Golden, J.W., et al., *Cathepsin S supports acid-independent infection by some reoviruses*. J Biol Chem, 2004. **279**(10): p. 8547-57.
66. Wetzell, J.D., et al., *Reovirus variants selected during persistent infections of L cells contain mutations in the viral S1 and S4 genes and are altered in viral disassembly*. J Virol, 1997. **71**(2): p. 1362-9.
67. Huismans, H. and W.K. Joklik, *Reovirus-coded polypeptides in infected cells: isolation of two native monomeric polypeptides with affinity for single-stranded and double-stranded RNA, respectively*. Virology, 1976. **70**(2): p. 411-24.

68. Mabrouk, T., C. Danis, and G. Lemay, *Two basic motifs of reovirus sigma 3 protein are involved in double-stranded RNA binding*. *Biochem Cell Biol*, 1995. **73**(3-4): p. 137-45.
69. Imani, F. and B.L. Jacobs, *Inhibitory activity for the interferon-induced protein kinase is associated with the reovirus serotype 1 sigma 3 protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(21): p. 7887-91.
70. Lloyd, R.M. and A.J. Shatkin, *Translational stimulation by reovirus polypeptide sigma 3: substitution for VAI RNA and inhibition of phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2*. *J Virol*, 1992. **66**(12): p. 6878-84.
71. Beattie, E., et al., *Reversal of the interferon-sensitive phenotype of a vaccinia virus lacking E3L by expression of the reovirus S4 gene*. *J Virol*, 1995. **69**(1): p. 499-505.
72. Bergeron, J., et al., *Characterization of the thermosensitive ts453 reovirus mutant: increased dsRNA binding of sigma 3 protein correlates with interferon resistance*. *Virology*, 1998. **246**(2): p. 199-210.
73. Schmechel, S., et al., *Preferential translation of reovirus mRNA by a sigma3-dependent mechanism*. *Virology*, 1997. **232**(1): p. 62-73.
74. Lemieux, R., G. Lemay, and S. Millward, *The viral protein sigma 3 participates in translation of late viral mRNA in reovirus-infected L cells*. *J Virol*, 1987. **61**(8): p. 2472-9.
75. Yue, Z. and A.J. Shatkin, *Double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) is regulated by reovirus structural proteins*. *Virology*, 1997. **234**(2): p. 364-71.
76. Jane-Valbuena, J., et al., *Sites and determinants of early cleavages in the proteolytic processing pathway of reovirus surface protein sigma3*. *J Virol*, 2002. **76**(10): p. 5184-97.
77. Mendez, II, et al., *Digestion pattern of reovirus outer capsid protein sigma3 determined by mass spectrometry*. *Virology*, 2003. **311**(2): p. 289-304.
78. Lee, P.W., E.C. Hayes, and W.K. Joklik, *Protein sigma 1 is the reovirus cell attachment protein*. *Virology*, 1981. **108**(1): p. 156-63.

79. Strong, J.E., et al., *Biochemical and biophysical characterization of the reovirus cell attachment protein sigma 1: evidence that it is a homotrimer*. Virology, 1991. **184**(1): p. 23-32.
80. Weiner, H.L. and B.N. Fields, *Neutralization of reovirus: the gene responsible for the neutralization antigen*. J Exp Med, 1977. **146**(5): p. 1305-10.
81. Weiner, H.L., et al., *Identification of the gene coding for the hemagglutinin of reovirus*. Virology, 1978. **86**(2): p. 581-4.
82. Gentsch, J.R. and A.F. Pacitti, *Differential interaction of reovirus type 3 with sialylated receptor components on animal cells*. Virology, 1987. **161**(1): p. 245-8.
83. Forrest, J.C., et al., *Structure-function analysis of reovirus binding to junctional adhesion molecule 1. Implications for the mechanism of reovirus attachment*. J Biol Chem, 2003. **278**(48): p. 48434-44.
84. Barton, E.S., et al., *Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus*. Cell, 2001. **104**(3): p. 441-51.
85. Clarke, P., et al., *Reovirus infection activates JNK and the JNK-dependent transcription factor c-Jun*. J Virol, 2001. **75**(23): p. 11275-83.
86. Clarke, P., et al., *Caspase 8-dependent sensitization of cancer cells to TRAIL-induced apoptosis following reovirus-infection*. Oncogene, 2001. **20**(47): p. 6910-9.
87. Clarke, P. and K.L. Tyler, *Reovirus-induced apoptosis: A minireview*. Apoptosis, 2003. **8**(2): p. 141-50.
88. Tyler, K.L., et al., *Reoviruses and the host cell*. Trends Microbiol, 2001. **9**(11): p. 560-4.
89. Connolly, J.L. and T.S. Dermody, *Virion disassembly is required for apoptosis induced by reovirus*. J Virol, 2002. **76**(4): p. 1632-41.
90. Becker, M.M., et al., *Reovirus sigmaNS protein is required for nucleation of viral assembly complexes and formation of viral inclusions*. J Virol, 2001. **75**(3): p. 1459-75.

91. Antczak, J.B. and W.K. Joklik, *Reovirus genome segment assortment into progeny genomes studied by the use of monoclonal antibodies directed against reovirus proteins*. Virology, 1992. **187**(2): p. 760-76.
92. Broering, T.J., et al., *Mammalian reovirus nonstructural protein microNS forms large inclusions and colocalizes with reovirus microtubule-associated protein micro2 in transfected cells*. J Virol, 2002. **76**(16): p. 8285-97.
93. Broering, T.J., et al., *Reovirus nonstructural protein muNS binds to core particles but does not inhibit their transcription and capping activities*. J Virol, 2000. **74**(12): p. 5516-24.
94. Broering, T.J., et al., *Reovirus nonstructural protein mu NS recruits viral core surface proteins and entering core particles to factory-like inclusions*. J Virol, 2004. **78**(4): p. 1882-92.
95. Poggioli, G.J., et al., *Reovirus-induced G(2)/M cell cycle arrest requires signals and occurs in the absence of apoptosis*. J Virol, 2000. **74**(20): p. 9562-70.
96. Borsa, J., et al., *New intermediate subviral particles in the in vitro uncoating of reovirus virions by chymotrypsin*. J Virol, 1973. **11**(4): p. 552-64.
97. Furlong, D.B., M.L. Nibert, and B.N. Fields, *Sigma 1 protein of mammalian reoviruses extends from the surfaces of viral particles*. J Virol, 1988. **62**(1): p. 246-56.
98. Paul, R.W., A.H. Choi, and P.W. Lee, *The alpha-anomeric form of sialic acid is the minimal receptor determinant recognized by reovirus*. Virology, 1989. **172**(1): p. 382-5.
99. Barton, E.S., et al., *Utilization of sialic acid as a coreceptor enhances reovirus attachment by multistep adhesion strengthening*. J Biol Chem, 2001. **276**(3): p. 2200-11.
100. Choi, A.H., *Internalization of virus binding proteins during entry of reovirus into K562 erythroleukemia cells*. Virology, 1994. **200**(1): p. 301-6.
101. Tang, D., J.E. Strong, and P.W. Lee, *Recognition of the epidermal growth factor receptor by reovirus*. Virology, 1993. **197**(1): p. 412-4.

102. Strong, J.E., D. Tang, and P.W. Lee, *Evidence that the epidermal growth factor receptor on host cells confers reovirus infection efficiency*. *Virology*, 1993. **197**(1): p. 405-11.
103. Lee, P.W. and R. Gilmore, *Reovirus cell attachment protein sigma 1: structure-function relationships and biogenesis*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1998. **233**(Pt 1): p. 137-53.
104. Fernandes, J., et al., *Binding of reovirus to receptor leads to conformational changes in viral capsid proteins that are reversible upon virus detachment*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(25): p. 17043-7.
105. Ehrlich, M., et al., *Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits*. *Cell*, 2004. **118**(5): p. 591-605.
106. Sieczkarski, S.B. and G.R. Whittaker, *Dissecting virus entry via endocytosis*. *J Gen Virol*, 2002. **83**(Pt 7): p. 1535-45.
107. Borsa, J., et al., *Two modes of entry of reovirus particles into L cells*. *J Gen Virol*, 1979. **45**(1): p. 161-70.
108. Borsa, J. and A.F. Graham, *Reovirus: RNA polymerase activity in purified virions*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1968. **33**(6): p. 895-901.
109. Borsa, J., et al., *Reovirus transcriptase activation in vitro: involvement of an endogenous uncoating activity in the second stage of the process*. *Intervirology*, 1974. **4**(3): p. 171-88.
110. Silverstein, S.C., et al., *The reovirus replicative cycle: conservation of parental RNA and protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1970. **67**(1): p. 275-81.
111. Lau, R.Y., et al., *Synthesis of reovirus-specific polypeptides in cells pretreated with cycloheximide*. *J Virol*, 1975. **16**(3): p. 470-8.
112. Ward, R.L. and A.J. Shatkin, *Association of reovirus mRNA with viral proteins: a possible mechanism for linking the genome segments*. *Arch Biochem Biophys*, 1972. **152**(1): p. 378-84.
113. Starnes, M.C. and W.K. Joklik, *Reovirus protein lambda 3 is a poly(C)-dependent poly(G) polymerase*. *Virology*, 1993. **193**(1): p. 356-66.
114. Skup, D. and S. Millward, *mRNA capping enzymes are masked in reovirus progeny subviral particles*. *J Virol*, 1980. **34**(2): p. 490-6.

115. Skup, D. and S. Millward, *Reovirus-induced modification of cap-dependent translation in infected L cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(1): p. 152-6.
116. Ahmed, R. and A.F. Graham, *Persistent infections in L cells with temperature-sensitive mutants of reovirus*. J Virol, 1977. **23**(2): p. 250-62.
117. Ahmed, R., P.R. Chakraborty, and B.N. Fields, *Genetic variation during lytic reovirus infection: high-passage stocks of wild-type reovirus contain temperature-sensitive mutants*. J Virol, 1980. **34**(1): p. 285-7.
118. Ahmed, R., et al., *Genetic variation during persistent reovirus infection: presence of extragenetically suppressed temperature-sensitive lesions in wild-type virus isolated from persistently infected L cells*. J Virol, 1980. **34**(2): p. 383-9.
119. Dermody, T.S., *Molecular mechanisms of persistent infection by reovirus*. Curr Top Microbiol Immunol, 1998. **233**(Pt 2): p. 1-22.
120. Danis, C., et al., *Establishment of persistent reovirus infection in SC1 cells: absence of protein synthesis inhibition and increased level of double-stranded RNA-activated protein kinase*. Virus Res, 1993. **27**(3): p. 253-65.
121. Montgomery, L.B., et al., *Infection of a polarized epithelial cell line with wild-type reovirus leads to virus persistence and altered cellular function*. J Gen Virol, 1991. **72** (Pt 12): p. 2939-46.
122. Ahmed, R., et al., *Role of the host cell in persistent viral infection: coevolution of L cells and reovirus during persistent infection*. Cell, 1981. **25**(2): p. 325-32.
123. Dermody, T.S., et al., *Cells and viruses with mutations affecting viral entry are selected during persistent infections of L cells with mammalian reoviruses*. J Virol, 1993. **67**(4): p. 2055-63.
124. Wetzel, J.D., et al., *Efficiency of viral entry determines the capacity of murine erythroleukemia cells to support persistent infections by mammalian reoviruses*. J Virol, 1997. **71**(1): p. 299-306.

125. Baer, G.S., et al., *Mutant cells selected during persistent reovirus infection do not express mature cathepsin L and do not support reovirus disassembly.* J Virol, 1999. **73**(11): p. 9532-43.
126. Ahmed, R. and B.N. Fields, *Role of the S4 gene in the establishment of persistent reovirus infection in L cells.* Cell, 1982. **28**(3): p. 605-12.
127. Wilson, G.J., et al., *Persistent reovirus infections of L cells select mutations in viral attachment protein sigma1 that alter oligomer stability.* J Virol, 1996. **70**(10): p. 6598-606.
128. Ebert, D.H., et al., *Adaptation of reovirus to growth in the presence of protease inhibitor E64 segregates with a mutation in the carboxy terminus of viral outer-capsid protein sigma3.* J Virol, 2001. **75**(7): p. 3197-206.
129. Wilson, G.J., et al., *A single mutation in the carboxy terminus of reovirus outer-capsid protein sigma 3 confers enhanced kinetics of sigma 3 proteolysis, resistance to inhibitors of viral disassembly, and alterations in sigma 3 structure.* J Virol, 2002. **76**(19): p. 9832-43.
130. Stewart, W.E., 2nd, et al., *Increased susceptibility of cells treated with interferon to the toxicity of polyriboinosinic-polyribocytidylic acid.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1972. **69**(7): p. 1851-4.
131. Meurs, E., et al., *Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon.* Cell, 1990. **62**(2): p. 379-90.
132. Schmedt, C., et al., *Functional characterization of the RNA-binding domain and motif of the double-stranded RNA-dependent protein kinase DAI (PKR).* J Mol Biol, 1995. **249**(1): p. 29-44.
133. Baier, L.J., et al., *The mouse antiphosphotyrosine immunoreactive kinase, TIK, is indistinguishable from the double-stranded RNA-dependent, interferon-induced protein kinase, PKR.* Nucleic Acids Res, 1993. **21**(20): p. 4830-5.
134. Clemens, M.J., *The double-stranded RNA-dependant protein kinase PKR: structure and function.* J Interferon Cytokine Res., 1997. **17**(9): p. 503-24.

135. Kumar, A., et al., *Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF-kappa B by phosphorylating I kappa B*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(14): p. 6288-92.
136. Kumar, A., et al., *Deficient cytokine signaling in mouse embryo fibroblasts with a targeted deletion in the PKR gene: role of IRF-1 and NF-kappaB*. Embo J, 1997. **16**(2): p. 406-16.
137. Yang, Y.L., et al., *Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase*. Embo J, 1995. **14**(24): p. 6095-106.
138. Samuel, C.E., et al., *The PKR protein kinase--an interferon-inducible regulator of cell growth and differentiation*. Int J Hematol, 1997. **65**(3): p. 227-37.
139. Gil, J. and M. Esteban, *Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action*. Apoptosis, 2000. **5**(2): p. 107-14.
140. Meurs, E.F., et al., *Tumor suppressor function of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(1): p. 232-6.
141. Kuhen, K.L. and C.E. Samuel, *Isolation of the interferon-inducible RNA-dependent protein kinase Pkr promoter and identification of a novel DNA element within the 5'-flanking region of human and mouse Pkr genes*. Virology, 1997. **227**(1): p. 119-30.
142. Kuhen, K.L. and C.E. Samuel, *Mechanism of interferon action: functional characterization of positive and negative regulatory domains that modulate transcriptional activation of the human RNA-dependent protein kinase Pkr promoter*. Virology, 1999. **254**(1): p. 182-95.
143. Kuhen, K.L., J.W. Vessey, and C.E. Samuel, *Mechanism of interferon action: identification of essential positions within the novel 15-base-pair KCS element required for transcriptional activation of the RNA-dependent protein kinase pkr gene*. J Virol, 1998. **72**(12): p. 9934-9.
144. Stark, G.R., et al., *How cells respond to interferons*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 227-64.

145. Barber, G.N., et al., *Translational regulation by the interferon-induced double-stranded-RNA-activated 68-kDa protein kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(10): p. 4621-5.
146. Thomis, D.C. and C.E. Samuel, *Mechanism of interferon action: autoregulation of RNA-dependent P1/eIF-2 alpha protein kinase (PKR) expression in transfected mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(22): p. 10837-41.
147. McCormack, S.J. and C.E. Samuel, *Mechanism of interferon action: RNA-binding activity of full-length and R-domain forms of the RNA-dependent protein kinase PKR--determination of KD values for VAI and TAR RNAs*. Virology, 1995. **206**(1): p. 511-9.
148. Bevilacqua, P.C., et al., *Binding of the protein kinase PKR to RNAs with secondary structure defects: role of the tandem A-G mismatch and noncontiguous helices*. Biochemistry, 1998. **37**(18): p. 6303-16.
149. Clemens, M.J., et al., *Regulation of the interferon-inducible eIF-2 alpha protein kinase by small RNAs*. Biochimie, 1994. **76**(8): p. 770-8.
150. Patel, R.C. and G.C. Sen, *PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR*. Embo J, 1998. **17**(15): p. 4379-90.
151. Taylor, D.R., et al., *Autophosphorylation sites participate in the activation of the double-stranded-RNA-activated protein kinase PKR*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(11): p. 6295-302.
152. Samuel, C.E., *Antiviral actions of interferons*. Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(4): p. 778-809, table of contents.
153. Vorburger, S.A., et al., *Genetically targeted cancer therapy: tumor destruction by PKR activation*. Am J Pharmacogenomics, 2004. **4**(3): p. 189-98.
154. Clemens, M.J., *Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation*. Oncogene, 2004. **23**(18): p. 3180-8.
155. Espert, L., C. Gongora, and N. Mechti, *[Interferon : antiviral mechanisms and viral escape]*. Bull Cancer, 2003. **90**(2): p. 131-41.

156. Deonarain, R., et al., *Impaired antiviral response and alpha/beta interferon induction in mice lacking beta interferon*. J Virol, 2000. **74**(7): p. 3404-9.
157. Jacobs, B.L. and J.O. Langland, *When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA*. Virology, 1996. **219**(2): p. 339-49.
158. Hiscott, J., et al., *Triggering the interferon response: the role of IRF-3 transcription factor*. J Interferon Cytokine Res, 1999. **19**(1): p. 1-13.
159. Hiscott, J., *Another detour on the Toll road to the interferon antiviral response*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(11): p. 1028-30.
160. Stewart, M.J., M.A. Blum, and B. Sherry, *PKR's protective role in viral myocarditis*. Virology, 2003. **314**(1): p. 92-100.
161. Connolly, J.L., et al., *Reovirus-induced apoptosis requires activation of transcription factor NF-kappaB*. J Virol, 2000. **74**(7): p. 2981-9.
162. Samuel, C.E., *Reoviruses and the interferon system*. Curr Top Microbiol Immunol, 1998. **233**(Pt 2): p. 125-45.
163. Sherry, B., C.J. Baty, and M.A. Blum, *Reovirus-induced acute myocarditis in mice correlates with viral RNA synthesis rather than generation of infectious virus in cardiac myocytes*. J Virol, 1996. **70**(10): p. 6709-15.
164. Haller, O. and G. Kochs, *Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity*. Traffic, 2002. **3**(10): p. 710-7.
165. Gale, M., Jr. and M.G. Katze, *Molecular mechanisms of interferon resistance mediated by viral-directed inhibition of PKR, the interferon-induced protein kinase*. Pharmacol Ther, 1998. **78**(1): p. 29-46.
166. Sharpe, A.H. and B.N. Fields, *Reovirus inhibition of cellular RNA and protein synthesis: role of the S4 gene*. Virology, 1982. **122**(2): p. 381-91.
167. Miller, J.E. and C.E. Samuel, *Proteolytic cleavage of the reovirus sigma 3 protein results in enhanced double-stranded RNA-binding activity: identification of a repeated basic amino acid motif within the C-terminal binding region*. J Virol, 1992. **66**(9): p. 5347-56.

168. Wang, Q., et al., *Site-directed mutagenesis of the double-stranded RNA binding domain of bacterially-expressed sigma 3 reovirus protein*. Virus Res, 1996. **41**(2): p. 141-51.
169. Denzler, K.L. and B.L. Jacobs, *Site-directed mutagenic analysis of reovirus sigma 3 protein binding to dsRNA*. Virology, 1994. **204**(1): p. 190-9.
170. Olland, A.M., et al., *Structure of the reovirus outer capsid and dsRNA-binding protein sigma3 at 1.8 A resolution*. Embo J, 2001. **20**(5): p. 979-89.
171. Schiff, L.A., et al., *Distinct binding sites for zinc and double-stranded RNA in the reovirus outer capsid protein sigma 3*. Mol Cell Biol, 1988. **8**(1): p. 273-83.
172. Mabrouk, T. and G. Lemay, *Mutations in a CCHC zinc-binding motif of the reovirus sigma 3 protein decrease its intracellular stability*. J Virol, 1994. **68**(8): p. 5287-90.
173. Shepard, D.A., et al., *Mutations in the zinc-binding motif of the reovirus capsid protein delta 3 eliminate its ability to associate with capsid protein mu 1*. J Virol, 1996. **70**(3): p. 2065-8.
174. Jacobs, B.L. and J.O. Langland, *Reovirus sigma 3 protein: dsRNA binding and inhibition of RNA-activated protein kinase*. Curr Top Microbiol Immunol, 1998. **233**(Pt 1): p. 185-96.
175. Danis, C., et al., *Interferon has no protective effect during acute or persistent reovirus infection of mouse SC1 fibroblasts*. Virus Res, 1997. **51**(2): p. 139-49.
176. Rudd, P.a.L., G., *Correlation between interferon sensitivity of reovirus isolates and ability to discriminate between normal and Ras-transformed cells*. Journal of general Virology, 2005. **86**(Sous presse).
177. Strong, J.E. and P.W. Lee, *The v-erbB oncogene confers enhanced cellular susceptibility to reovirus infection*. J Virol, 1996. **70**(1): p. 612-6.
178. Strong, J.E., et al., *The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus*. Embo J, 1998. **17**(12): p. 3351-62.

179. Danis, C., S. Garzon, and G. Lemay, *Further characterization of the ts453 mutant of mammalian orthoreovirus serotype 3 and nucleotide sequence of the mutated S4 gene*. *Virology*, 1992. **190**(1): p. 494-8.
180. Hashiro, G., P.C. Loh, and J.T. Yau, *The preferential cytotoxicity of reovirus for certain transformed cell lines*. *Arch Virol*, 1977. **54**(4): p. 307-15.
181. Duncan, M.R., S.M. Stanish, and D.C. Cox, *Differential sensitivity of normal and transformed human cells to reovirus infection*. *J Virol*, 1978. **28**(2): p. 444-9.
182. Taylor, M.W., et al., *Viruses as an aid to cancer therapy: regression of solid and ascites tumors in rodents after treatment with bovine enterovirus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1971. **68**(4): p. 836-40.
183. Bos, J.L., *ras oncogenes in human cancer: a review*. *Cancer Res*, 1989. **49**(17): p. 4682-9.
184. Hancock, J.F., *Ras proteins: different signals from different locations*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(5): p. 373-84.
185. Johnson, L., et al., *K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras*. *Genes Dev*, 1997. **11**(19): p. 2468-81.
186. Ehrhardt, A., et al., *Ras and relatives--job sharing and networking keep an old family together*. *Exp Hematol*, 2002. **30**(10): p. 1089-106.
187. Bos, J.L., *All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral*. *Embo J*, 1998. **17**(23): p. 6776-82.
188. Flotho, C., et al., *RAS mutations and clonality analysis in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML)*. *Leukemia*, 1999. **13**(1): p. 32-7.
189. Reuter, C.W., M.A. Morgan, and L. Bergmann, *Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies?* *Blood*, 2000. **96**(5): p. 1655-69.
190. Hamad, N.M., et al., *Distinct requirements for Ras oncogenesis in human versus mouse cells*. *Genes Dev*, 2002. **16**(16): p. 2045-57.
191. Norman, K.L., et al., *Reovirus oncolysis: the Ras/RalGEF/p38 pathway dictates host cell permissiveness to reovirus infection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(30): p. 11099-104.

192. Midgley, R.S. and D.J. Kerr, *Ras as a target in cancer therapy*. Crit Rev Oncol Hematol, 2002. **44**(2): p. 109-20.
193. Ross, J.S. and J.A. Fletcher, *The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy*. Oncologist, 1998. **3**(4): p. 237-252.
194. Slamon, D.J., et al., *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. Science, 1987. **235**(4785): p. 177-82.
195. Sanchez, K.M., et al., *Evaluation of HER-2/neu expression in prostatic adenocarcinoma: a requested for a standardized, organ specific methodology*. Cancer, 2002. **95**(8): p. 1650-5.
196. Coffey, M.C., et al., *Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway*. Science, 1998. **282**(5392): p. 1332-4.
197. Green, C.L. and P.A. Khavari, *Targets for molecular therapy of skin cancer*. Semin Cancer Biol, 2004. **14**(1): p. 63-9.
198. Wilcox, M.E., et al., *Reovirus as an oncolytic agent against experimental human malignant gliomas*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(12): p. 903-12.
199. Yang, W.Q., et al., *Efficacy and safety evaluation of human reovirus type 3 in immunocompetent animals: racine and nonhuman primates*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(24): p. 8561-76.
200. Hirasawa, K., et al., *Oncolytic reovirus against ovarian and colon cancer*. Cancer Res, 2002. **62**(6): p. 1696-701.
201. Norman, K.L., et al., *Reovirus oncolysis of human breast cancer*. Hum Gene Ther, 2002. **13**(5): p. 641-52.
202. Etoh, T., et al., *Oncolytic viral therapy for human pancreatic cancer cells by reovirus*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(3): p. 1218-23.
203. Alain, T., et al., *Reovirus therapy of lymphoid malignancies*. Blood, 2002. **100**(12): p. 4146-53.
204. Yang, W.Q., et al., *Reovirus prolongs survival and reduces the frequency of spinal and leptomeningeal metastases from medulloblastoma*. Cancer Res, 2003. **63**(12): p. 3162-72.

205. Yang, W.Q., et al., *Reovirus as an experimental therapeutic for brain and leptomeningeal metastases from breast cancer*. Gene Ther, 2004. **11**(21): p. 1579-89.
206. Hirasawa, K., et al., *Systemic reovirus therapy of metastatic cancer in immune-competent mice*. Cancer Res, 2003. **63**(2): p. 348-53.
207. Kilani, R.T., et al., *Selective reovirus killing of bladder cancer in a co-culture spheroid model*. Virus Res, 2003. **93**(1): p. 1-12.
208. Hanel, E.G., et al., *A novel intravesical therapy for superficial bladder cancer in an orthotopic model: oncolytic reovirus therapy*. J Urol, 2004. **172**(5 Pt 1): p. 2018-22.
209. Thirukkumaran, C.M., et al., *Reovirus oncolysis as a novel purging strategy for autologous stem cell transplantation*. Blood, 2003. **102**(1): p. 377-87.
210. Silverstein, S.C., et al., *The mechanisms of reovirus uncoating and gene activation in vivo*. Virology, 1972. **47**(3): p. 797-806.
211. Martinez, C.G., et al., *The entry of reovirus into L cells is dependent on vacuolar proton-ATPase activity*. J Virol, 1996. **70**(1): p. 576-9.
212. Kothandaraman, S., et al., *No role for pepstatin-A-sensitive acidic proteinases in reovirus infections of L or MDCK cells*. Virology, 1998. **251**(2): p. 264-72.
213. Ebert, D.H., et al., *Cathepsin L and cathepsin B mediate reovirus disassembly in murine fibroblast cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(27): p. 24609-17.
214. Ebert, D.H., S.A. Kopecky-Bromberg, and T.S. Dermody, *Cathepsin B Is Inhibited in Mutant Cells Selected during Persistent Reovirus Infection*. J Biol Chem, 2004. **279**(5): p. 3837-51.
215. Golden, J.W., et al., *Addition of exogenous protease facilitates reovirus infection in many restrictive cells*. J Virol, 2002. **76**(15): p. 7430-43.
216. Turk, V., B. Turk, and D. Turk, *Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities*. Embo J, 2001. **20**(17): p. 4629-33.
217. Kornfeld, S., *Trafficking of lysosomal enzymes*. Faseb J, 1987. **1**(6): p. 462-8.
218. Roshy, S., B.F. Sloane, and K. Moin, *Pericellular cathepsin B and malignant progression*. Cancer Metastasis Rev, 2003. **22**(2-3): p. 271-86.

219. Chambers, A.F., et al., *Increased expression of cathepsins L and B and decreased activity of their inhibitors in metastatic, ras-transformed NIH 3T3 cells*. Mol Carcinog, 1992. **5**(3): p. 238-45.
220. Kim, K., et al., *Presence of activated ras correlates with increased cysteine proteinase activities in human colorectal carcinomas*. Int J Cancer, 1998. **79**(4): p. 324-33.
221. Casson, A.G., et al., *ras mutation and expression of the ras-regulated genes osteopontin and cathepsin L in human esophageal cancer*. Int J Cancer, 1997. **72**(5): p. 739-45.
222. Krepela, E., *Cysteine proteinases in tumor cell growth and apoptosis*. Neoplasma, 2001. **48**(5): p. 332-49.
223. Kos, J. and T.T. Lah, *Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer (review)*. Oncol Rep, 1998. **5**(6): p. 1349-61.
224. Lah, T.T. and J. Kos, *Cysteine proteinases in cancer progression and their clinical relevance for prognosis*. Biol Chem, 1998. **379**(2): p. 125-30.
225. Roschke, A.V., et al., *Karyotypic complexity of the NCI-60 drug-screening panel*. Cancer Res, 2003. **63**(24): p. 8634-47.
226. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
227. Danis, C. and G. Lemay, *Protein synthesis in different cell lines infected with orthoreovirus serotype 3: inhibition of host-cell protein synthesis correlates with accelerated viral multiplication and cell killing*. Biochem Cell Biol, 1993. **71**(1-2): p. 81-5.
228. Graham, K.A., et al., *Varying degrees of amplification of the N-ras oncogene in the human breast cancer cell line MCF-7*. Cancer Res, 1985. **45**(5): p. 2201-5.
229. Ottenhoff-Kalff, A.E., et al., *Characterization of protein tyrosine kinases from human breast cancer: involvement of the c-src oncogene product*. Cancer Res, 1992. **52**(17): p. 4773-8.

230. Mitsudomi, T., et al., *p53 gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features*. *Oncogene*, 1992. **7**(1): p. 171-80.
231. Pergolizzi, R.G., et al., *Mutational status of codons 12 and 13 of the N- and K-ras genes in tissue and cell lines derived from primary and metastatic prostate carcinomas*. *Cancer Invest*, 1993. **11**(1): p. 25-32.
232. Rijnders, A.W., et al., *Expression of cellular oncogenes in human prostatic carcinoma cell lines*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985. **132**(2): p. 548-54.
233. Davies, H., et al., *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. *Nature*, 2002. **417**(6892): p. 949-54.
234. Joseph, L.J., et al., *Complete nucleotide and deduced amino acid sequences of human and murine preprocathepsin L. An abundant transcript induced by transformation of fibroblasts*. *J Clin Invest*, 1988. **81**(5): p. 1621-9.
235. Demoz, M., et al., *Transformation by oncogenic ras-p21 alters the processing and subcellular localization of the lysosomal protease cathepsin D*. *J Cell Biochem*, 1999. **73**(3): p. 370-8.
236. Zhang, J.Y. and R.M. Schultz, *Fibroblasts transformed by different ras oncogenes show dissimilar patterns of protease gene expression and regulation*. *Cancer Res*, 1992. **52**(23): p. 6682-9.
237. Donatien, P.D., et al., *Melanosomal and lysosomal alterations in murine melanocytes following transfection with the v-rasHa oncogene*. *Int J Cancer*, 1996. **66**(4): p. 557-63.
238. Fehrenbacher, N., et al., *Sensitization to the lysosomal cell death pathway upon immortalization and transformation*. *Cancer Res*, 2004. **64**(15): p. 5301-10.
239. Sameni, M., et al., *Cathepsin B and D are Localized at the Surface of Human Breast Cancer Cells*. *Pathol Oncol Res*, 1995. **1**(1): p. 43-53.
240. Demchik, L.L., et al., *Cathepsin B and glioma invasion*. *Int J Dev Neurosci*, 1999. **17**(5-6): p. 483-94.

241. Sloane, B.F., et al., *Membrane association of cathepsin B can be induced by transfection of human breast epithelial cells with c-Ha-ras oncogene*. J Cell Sci, 1994. **107 (Pt 2)**: p. 373-84.
242. Linebaugh, B.E., et al., *Exocytosis of active cathepsin B enzyme activity at pH 7.0, inhibition and molecular mass*. Eur J Biochem, 1999. **264(1)**: p. 100-9.
243. Gottesman, M.M., *Transformation-dependent secretion of a low molecular weight protein by murine fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75(6)**: p. 2767-71.
244. de Duve, C., et al., *Commentary. Lysosomotropic agents*. Biochem Pharmacol, 1974. **23(18)**: p. 2495-531.
245. Helgeland, K., *NH₄Cl and protein metabolism in human gingival fibroblasts*. Scand J Dent Res, 1981. **89(5)**: p. 400-6.
246. Hertz, L., et al., *Some metabolic effects of ammonia on astrocytes and neurons in primary cultures*. Neurochem Pathol, 1987. **6(1-2)**: p. 97-129.
247. Hopgood, M.F., M.G. Clark, and F.J. Ballard, *Inhibition of protein degradation in isolated rat hepatocytes*. Biochem J, 1977. **164(2)**: p. 399-407.
248. Poole, B., S. Ohkuma, and M.J. Warburton, *The accumulation of weakly basic substances in lysosomes and the inhibition of intracellular protein degradation*. Acta Biol Med Ger, 1977. **36(11-12)**: p. 1777-88.
249. Ling, H., et al., *Mesangial cell hypertrophy induced by NH₄Cl: role of depressed activities of cathepsins due to elevated lysosomal pH*. Kidney Int, 1998. **53(6)**: p. 1706-12.
250. Golchini, K., et al., *Induction of hypertrophy in cultured proximal tubule cells by extracellular NH₄Cl*. J Clin Invest, 1989. **84(6)**: p. 1767-79.
251. Jiang, L.W., et al., *Alkalinization of the lysosomes is correlated with ras transformation of murine and human fibroblasts*. J Biol Chem, 1990. **265(9)**: p. 4775-7.
252. Boya, P., et al., *Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine*. Oncogene, 2003. **22(25)**: p. 3927-36.

253. Wilson, P.D., R.A. Firestone, and J. Lenard, *The role of lysosomal enzymes in killing of mammalian cells by the lysosomotropic detergent N-dodecylimidazole*. J Cell Biol, 1987. **104**(5): p. 1223-9.
254. Greenberg, A.K., et al., *Selective p38 activation in human non-small cell lung cancer*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. **26**(5): p. 558-64.
255. Hardwick, J.C., et al., *NF-kappaB, p38 MAPK and JNK are highly expressed and active in the stroma of human colonic adenomatous polyps*. Oncogene, 2001. **20**(7): p. 819-27.
256. Elenitoba-Johnson, K.S., et al., *Involvement of multiple signaling pathways in follicular lymphoma transformation: p38-mitogen-activated protein kinase as a target for therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(12): p. 7259-64.
257. Feig, L.A., *Ral-GTPases: approaching their 15 minutes of fame*. Trends Cell Biol, 2003. **13**(8): p. 419-25.
258. <http://www.phac-aspg.gc.ca>.
259. Thomas, S.M. and J.S. Brugge, *Cellular functions regulated by Src family kinases*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1997. **13**: p. 513-609.
260. Muthuswamy, S.K. and W.J. Muller, *Direct and specific interaction of c-Src with Neu is involved in signaling by the epidermal growth factor receptor*. Oncogene, 1995. **11**(2): p. 271-9.
261. Garcia, M., et al., *Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis*. Stem Cells, 1996. **14**(6): p. 642-50.
262. Nishimura, Y., M. Sameni, and B.F. Sloane, *Malignant transformation alters intracellular trafficking of lysosomal cathepsin D in human breast epithelial cells*. Pathol Oncol Res, 1998. **4**(4): p. 283-96.
263. Rochefort, H., F. Capony, and M. Garcia, *Cathepsin D: a protease involved in breast cancer metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 1990. **9**(4): p. 321-31.
264. Rochefort, H., F. Capony, and M. Garcia, *Cathepsin D in breast cancer: from molecular and cellular biology to clinical applications*. Cancer Cells, 1990. **2**(12): p. 383-8.
265. Ledakis, P., et al., *Cathepsins D, B, and L in malignant human lung tissue*. Clin Cancer Res, 1996. **2**(3): p. 561-8.

266. Werle, B., et al., *Cathepsin B in infiltrated lymph nodes is of prognostic significance for patients with nonsmall cell lung carcinoma*. *Cancer*, 2000. **89**(11): p. 2282-91.
267. <http://www.oncolyticsbiotech.com>.
268. Cherry, J.P., et al., *Analysis of cathepsin D forms and their clinical implications in human prostate cancer*. *J Urol*, 1998. **160**(6 Pt 1): p. 2223-8.
269. Gurumurthy, S., K.M. Vasudevan, and V.M. Rangnekar, *Regulation of apoptosis in prostate cancer*. *Cancer Metastasis Rev*, 2001. **20**(3-4): p. 225-43.
270. Rodgers, S.E., et al., *Reovirus-induced apoptosis of MDCK cells is not linked to viral yield and is blocked by Bcl-2*. *J Virol*, 1997. **71**(3): p. 2540-6.
271. Denkert, C., et al., *An inhibitor of stress-activated MAP-kinases reduces invasion and MMP-2 expression of malignant melanoma cells*. *Clin Exp Metastasis*, 2002. **19**(1): p. 79-85.