



Comparaison des propriétés antiapoptotiques de quatre protéines du virus de la vaccine en isolement et au cours de l'infection virale.

David Veyer

► To cite this version:

David Veyer. Comparaison des propriétés antiapoptotiques de quatre protéines du virus de la vaccine en isolement et au cours de l'infection virale.. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2014. Français. NNT : 2014REN1B015 . tel-01156526

HAL Id: tel-01156526

<https://theses.hal.science/tel-01156526>

Submitted on 27 May 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie et Sciences de la Santé

École doctorale Vie-Agro-Santé

présentée par

David Veyer

Préparée à l'unité de recherche EA1254
Équipe d'accueil EA1254 « Microbiologie, Risque infectieux »
UFR Sciences Pharmaceutiques, Université de Rennes 1

**Comparaison des
propriétés
antiapoptotiques de
quatre protéines du
virus de la vaccine en
isolation et au cours
de l'infection virale.**

**Thèse soutenue à Rennes
le 5 décembre 2014**

devant le jury composé de :

Henri AGUT

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier,
Université Pierre et Marie Curie-Paris 6 / *rapporteur*

Laurent BELEC

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier,
Université Paris Descartes-Paris 5 / *rapporteur*

Geoffrey L. SMITH

Professeur des Universités,
Université de Cambridge / *examineur*

Pierre-Yves DONNIO

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier,
Université de Rennes 1 / *examineur*

Ronald COLIMON

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier,
Université de Rennes 1 / *directeur de thèse*



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie et Sciences de la Santé

École doctorale Vie-Agro-Santé

présentée par

David Veyer

Préparée à l'unité de recherche EA1254
Équipe d'accueil EA1254 « Microbiologie, Risque infectieux »
UFR Sciences Pharmaceutiques, Université de Rennes 1

**Comparaison des
propriétés
antiapoptotiques de
quatre protéines du
virus de la vaccine en
isolation et au cours
de l'infection virale.**

**Thèse soutenue à Rennes
le 5 décembre 2014**

devant le jury composé de :

Henri AGUT

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier,
Université Pierre et Marie Curie-Paris 6 / *rapporteur*

Laurent BELEC

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier,
Université Paris Descartes-Paris 5 / *rapporteur*

Geoffrey L. SMITH

Professeur des Universités,
Université de Cambridge / *examineur*

Pierre-Yves DONNIO

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier,
Université de Rennes 1 / *examineur*

Ronald COLIMON

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier,
Université de Rennes 1 / *directeur de thèse*

Je ne suis pas de ce désert
Où l'âme ne fleurit jamais
Faute d'eau fraîche à sa racine.

Je ne suis pas de ce vieux monde
Où les fous saignent les colombes
Sans écouter battre leur cœur.

Je suis de ce soleil je suis de ce village
Je suis de ce grand feu fécond.
Laissez-moi vivre à ma façon!

**Extrait du poème « Août »,
L'arbre à feu. 1950.
Angèle Vannier (1917-1980)**

Remerciements

A Monsieur le Professeur Ronald COLIMON,

Qui a été l'instigateur de cette Thèse,
Pour sa transmission du goût pour la Virologie et les Sciences,
Pour son interprétation du Monde riche d'enseignements,
Pour son soutien constant dans mes projets professionnels,
Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude, de mon profond respect et de mon amitié.

A Monsieur le Professeur Geoffrey L. SMITH,

Qui nous fait l'honneur et le plaisir de juger ce travail,
Qui m'a accueilli dans son laboratoire à un tournant de ma vie professionnelle,
Qui m'a permis de travailler dans des conditions exceptionnelles,
Qu'il soit assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Henri AGUT,

Qui nous fait l'honneur et le plaisir de juger ce travail,
Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon plus grand respect.

A Monsieur le Professeur Laurent BELEC,

Qui nous fait l'honneur et le plaisir de juger ce travail,
Avec qui les connaissances acquises pendant mon parcours devraient être mises à profit avec enthousiasme dans un futur très proche,
Qu'il soit assuré de ma reconnaissance et de mon plus grand respect.

A Monsieur le Professeur Pierre-Yves DONNIO,

Qui nous fait l'honneur et le plaisir de juger ce travail,
Qui en plusieurs occasions a été d'un soutien sans faille,
Qu'il soit assuré de ma gratitude, de mon profond respect et de mon amitié.

Acknowledgments to the Smith Lab

To the Professor Geoffrey Smith,

Dear Geoff,

I will never forget the day when you suggested that I apply for the position in your lab. This thesis would never have been completed otherwise.

Your scientific expertise, the high expectations you place both on yourself and on your team, and your fairness, are inspiring me, as a professional and as a human being.

It has been so enriching to spend these 3 great years in your Lab.

I am obviously incredibly grateful.

To the Dr Carlos Maluquer de Motes,

Dear Carlos,

I could not have expected such a talented and exciting supervisor and friend to start my time in Cambridge. Discussing Life and Sciences every day with you was both fun and fascinating. I am really happy that you are succeeding in your professional and personal life. You are a great man. I wish you all the best.

Furthemore, I would like to thank my colleagues in the Smith Lab. I will miss the tea breaks, the pub sessions, the lab trips. Among them, thanks a lot to the oldest ones who have made my time in Cambridge so special: Becky, Helen, Dave, Guia, Jenny, Pavla, Hongwei, Brian, Michela, Ka Fai, Mike and Rachel. Your support, your friendship and your willingness to share your valuable technical expertise and laughs have been highly appreciated.

Lastly, I would like to wish all the best to the PhD students: Alice, Sarah, Simon, William and Ben.

A Juliette,

Sans doute celle qui a le plus souffert avec ce travail qui s'achève.

Ton soutien sans faille a permis sa réalisation. Merci de tout mon cœur.

Tu es exceptionnelle,

Ta sensibilité et ton intelligence impressionnent,

Je t'aime.

A mes Parents, Régine et Maurice,
Je vous aime.

A ma Sœur, Anne-Sophie,
Je t'aime.

A David, Simon et Louison,
Je vous aime.

A ma tante Annie,
Je t'aime.

Table des matières

Remerciements.....	4
Acknowledgments to the Smith Lab.....	5
Table des matières.....	8
Table des figures	14
Table des tableaux.....	16
Financements.....	16
Liste des abréviations.....	17
Introduction.....	24
A. Introduction bibliographique.....	25
A.1. La famille des poxvirus et le virus de la vaccine (VACV, VV)	26
A.1.1. Virus et classification	26
A.1.2. La classification modifiée de Baltimore.....	26
A.1.3. Poxvirus et virus de la vaccine : caractéristiques virologiques	28
A.1.3.1. Classification	28
A.1.3.2. Analyse phylogénétique.....	29
A.1.3.3. Morphologies des particules virales des poxvirus	29
A.1.3.4. Cycle viral.....	30
A.1.3.4.1. Entrée du virus.	30
A.1.3.4.2. Morphogénèse.....	30
A.1.3.4.3. Propagation.	31
A.1.3.5. Génome.....	33
A.1.3.6. Réplication du génome	33
A.1.3.7. Régulation de l'expression des gènes viraux/Transcription virale	34
A.1.3.7.1. Les gènes précoces :	34
A.1.3.7.2. Les gènes intermédiaires :	35
A.1.3.7.3. Les gènes tardifs :	35
A.2. Pouvoir pathogène des <i>Chordopoxvirinae</i> chez l'homme	36
A.2.1. Orthopoxvirus.....	36
A.2.1.1. Virus de la variole.....	36
A.2.1.1.1. Epidémiologie :	36
A.2.1.1.2. Signes cliniques :	36
A.2.1.1.3. Physiopathologie.....	37
A.2.1.1.4. Diagnostic	37
A.2.1.1.5. Traitement	37
A.2.1.1.6. Vaccination	38

A.2.1.2. Autres orthopoxvirus responsables de maladies humaines	39
A.2.1.2.1. Le virus monkeypox.....	39
A.2.1.2.2. Le virus cowpox.....	39
A.2.2. Parapoxvirus et pouvoir pathogène chez l'homme	39
A.2.3. Molluscum Contagiosum	40
A.3. Poxvirus et immunologie	41
A.3.1. Les principaux composants du système immunitaire et leurs interactions avec VACV.....	41
A.3.1.1. Les cellules de l'immunité innée	41
A.3.1.1.1. Les polynucléaires neutrophiles (PNN)	41
A.3.1.1.2. Les macrophages.....	41
A.3.1.1.3. Les cellules dendritiques.....	42
A.3.1.1.4. Les cellules NK (natural killer).....	42
A.3.1.2. Les cellules de l'immunité adaptative	43
A.3.1.2.1. Les lymphocytes T	43
A.3.1.2.1.1. Les lymphocytes T cytotoxiques :.....	43
A.3.1.2.1.2. Les lymphocytes T helper :	43
A.3.1.2.2. Les lymphocytes B.....	43
A.3.1.3. Le complément	44
A.3.1.4. Cytokines et chimiokines.....	44
A.3.1.4.1. Les cytokines proinflammatoires	44
A.3.1.4.1. Les cytokines proinflammatoires et vaccinia virus	45
A.3.1.4.2. Chimiokines	46
A.3.1.4.3. Chimiokines et virus de la vaccine	46
A.3.1.5. La détection des pathogènes	46
A.3.1.5.1. Les Toll-like receptors: TLR.....	47
A.3.1.5.2. Les RIG-I (retinoic acid inducible gene-I) like receptors: RLR	47
A.3.1.5.3. Les NOD (nucleotide- binding oligomerisation domain-containing protein) like receptors: NLR.....	48
A.3.1.5.4. Les détecteurs d'ADN cytoplasmique	49
A.3.2. Les principales voies activées suite à la détection de pathogène	51
A.3.2.1. La voie d'activation de NF-κB	51
A.3.2.1.1. La voie dépendante de MyD88	52
A.3.2.1.2. La voie des TLR 3 et 4.....	52
A.3.2.1.3. La voie du récepteur au TNF	52
A.3.2.1.4. La voie des RLR	53
A.3.2.1.5. VACV et inhibition de la voie NF-κB	53

A.3.2.2. La voie d'activation des IRF.....	55
A.3.2.2.1. Le complexe IKK non canonique	55
A.3.2.2.2. VACV et inhibition de la voie d'activation IRF3	56
A.3.2.3. La voie d'activation d'AP-1 : la voie des MAP kinases.....	57
A.3.2.4. La voie des interférons : JAK/STAT	58
A.3.2.4.1. Interférons de type I	59
A.3.2.4.2. Interféron de type II	59
A.3.2.4.3. Interférons de type III	59
A.3.2.4.4. Les gènes stimulés par l'interféron	60
A.3.2.4.4.1. PKR :	60
A.3.2.4.4.2. 2'-5' OAS :.....	60
A.3.2.4.4.3. ISG15 :	60
A.3.2.4.5. VACV et interférons	60
A.4. Le virus de la vaccine : un outil pour étudier la mort cellulaire.	63
A.4.1. La mort cellulaire	63
A.4.1.1. Définition	63
A.4.1.2. La mort accidentelle	63
A.4.1.3. La mort cellulaire régulée	63
A.4.2. Les différents types de mort cellulaire régulée	64
A.4.2.1. Apoptose	64
A.4.2.1.1. Définition	64
A.4.2.1.2. Les caspases	66
A.4.2.1.3. La voie intrinsèque de l'apoptose ou voie mitochondriale de l'apoptose....	67
A.4.2.1.4. L'activation des caspases associée à un stress au niveau du réticulum endoplasmique	70
A.4.1.2.5. La voie du PIDosome.....	70
A.4.1.2.6. La voie extrinsèque de l'apoptose.....	71
A.4.2.1.7. Activation des caspases par la voie du granzyme B	72
A.4.2.2. Nécrose régulée : la nécroptose	74
A.4.2.3. Pyroptose ou mort cellulaire dépendante de la caspase 1	77
A.4.3. Inhibition de la mort cellulaire : exemples de modulation par les virus à ADN.....	80
A.4.3.1. Apoptose	80
A.4.3.1.1. Exemples d'inhibition de l'apoptose par des protéines virales de type Bcl-2	80
A.4.3.1.1.1. Protéine E1B-19K des adénovirus.	80
A.4.3.1.1.2. Protéines vMIA (viral mitochondrial inhibitor of apoptosis) du cytomégalovirus.	80

A.4.3.1.1.3. Protéine vIBO (viral inhibitor of Bak oligomerisation) du cytomégalo­virus murin.....	81
A.4.3.1.1.4. Protéines antiapoptotiques des gamma-herpesvirus :.....	81
A.4.3.1.2. Autres stratégies virales d'inhibition de l'apoptose.....	82
A.4.3.1.2.1. La protéine vICA (viral inhibitor of caspase 8 induced apoptosis) du cytomégalo­virus	82
A.4.3.1.2.2. L'ARN β 2.7 du cytomégalo­virus	82
A.4.3.1.2.3. Les protéines de l'unité de transcription E3 des adénovirus	82
A.4.3.2. Né­croptose	83
A.4.3.3. Pyroptose	83
A.4.4. Inhibition de la mort cellulaire par les virus de la vaccine.....	84
A.4.4.1. Les protéines de type Bcl-2	84
A.4.4.1.1. F1	84
A.4.4.1.2. N1.....	85
A.4.4.2. Les protéines de type non Bcl-2	86
A.4.4.2.1. B13	86
A.4.4.2.2. B22.....	88
A.4.4.2.3. GAAP (golgi anti-apoptotic protein)	88
A.4.4.2.4. E3	89
B. Partie expérimentale.....	91
B.1. Objectifs du travail.....	92
B.2. Matériels et méthodes.....	93
B.2.1. Biologie moléculaire.....	93
B.2.1.1. PCR haute-fidélité.....	93
B.2.1.2. PCR de screening.....	93
B.2.1.3. Extraction d'ADN.....	93
B.2.1.3.1. A partir de colonies bactériennes pour screening après clonage.....	93
B.2.1.3.2. A partir de gel d'agarose, de cultures bactériennes pour miniprep ou maxiprep	94
B.2.1.3.3. A partir de cellules eucaryotes infectées par des virus.....	94
B.2.1.4. Quantification d'ADN	94
B.2.1.5. Digestion de plasmides ou des produits de PCR par des enzymes de restriction	94
B.2.1.6. Déphosphorylation des extrémités 5' des vecteurs après digestion.....	95
B.2.1.7. Ligation des inserts à leurs vecteurs	95
B.2.1.8. Transformation des bactéries compétentes	95
B.2.1.9. Séquençage ADN.....	95
B.2.1.10. Oligonucléotides utilisés.....	95

B.2.2. Culture cellulaire	96
B.2.2.1. Entretien des cellules	96
B.2.2.2. Transfection d'ADN	97
B.2.2.2.1. Transfection calcium-phosphate	97
B.2.2.2.2. Transfection avec TransIT LT-1 (Mirus) ou PEI (polyethyleneimine, 1 mg/mL)	97
B.2.2.3. Obtention de lignées cellulaires polyclonales par transduction	97
B.2.3. Analyse des protéines	98
B.2.3.1. Préparation des lysats cellulaires	98
B.2.3.2. SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis).....	98
B.2.3.3. Immunoblots	99
B.2.3.4. Immunofluorescence	99
B.2.3.5. Utilisation du MG132	100
B.2.4. Travail avec les virus	100
B.2.4.1. Déterminations du titre viral	100
B.2.4.2. Détermination de la taille des plaques virales	100
B.2.4.3. Courbes de croissance virale <i>in vitro</i>	101
B.2.4.4. Construction des virus mutants : protocole « infection/transfection »	101
B.2.4.5. Amplification du stock viral	103
B.2.4.6. Virus utilisés au cours de ce travail.	103
B.2.5. Apoptose	104
B.2.5.1. Stimulus utilisés	104
B.2.5.2. Effet cytopathogène (ECP)	104
B.2.5.3. Mesure de l'apoptose	104
B.2.5.4. Mesure de la viabilité cellulaire	105
B.2.6. Analyses des données et analyses statistiques	105
B.3. Résultats	106
B.3.1. Développement d'une plateforme pour tester les capacités antiapoptotiques de molécules virales ou cellulaires.....	106
B.3.1.1. Construction de lignées cellulaires polyclonales exprimant les molécules antiapoptotiques de VACV.....	106
B.3.1.2. Inhibition de l'apoptose extrinsèque par les cellules U2-OS exprimant les molécules antiapoptotiques de VACV	107
B.3.1.2.1. Microscopie	107
B.3.1.2.2. Clivage de PARP-1	109
B.3.1.2.3. Activation des caspases effectrices 3/7	109
B.3.1.3. Inhibition de l'apoptose intrinsèque par les cellules U2-OS exprimant les molécules antiapoptotiques de VACV.	110

B.3.1.3.1. Clivage de PARP-1	110
B.3.1.3.2. Activation des caspases effectrices 3/7	110
B.3.1.4. Conclusion	111
B.3.2. Etude des molécules anti-apoptotiques de VACV exprimées <i>in trans</i>	112
B.3.2.1. vv811, un virus déficient capable d'induire l'apoptose	112
B.3.2.2. Inhibition <i>in trans</i> de l'apoptose induite par vv811 dans les cellules U2-OS exprimant les molécules antiapoptotiques de VACV	113
B.3.2.3. L'expression des protéines antiapoptotiques de VACV <i>in trans</i> n'améliore pas la croissance virale	114
B.3.2.4. Conclusion.	115
B.3.3. Construction de virus recombinants	116
B.3.3.1. Construction du virus VACV WRΔF1	116
B.3.3.2. Construction de virus vv811 recombinants exprimant les protéines antiapoptotiques de VACV.....	117
B.3.3.2.1. Vérification du génotype des virus recombinants	117
B.3.3.2.2. Vérification de l'expression des molécules antiapoptotiques de VACV par les virus recombinants.....	118
B.3.3.2.3. L'expression des protéines antiapoptotiques de VACV <i>in cis</i> n'améliore pas la propagation virale ni la réplication	119
B.3.3.2.4. Conclusion.....	121
B.3.4. Inhibition <i>in cis</i> de l'apoptose induite par les virus recombinants vv811 exprimant les molécules antiapoptotiques de VACV	121
B.3.4.1. Comparaison de l'apoptose induite dans les cellules U2-OS par les virus VACV WT parentaux et recombinants et vv811 parental et recombinants.....	121
B.3.4.2. Comparaison de l'apoptose induite dans les cellules Hela par les virus vv811 parental et vv811 recombinants exprimant <i>in cis</i> les molécules antiapoptotiques de VACV	123
B.3.4.3. Etude de la viabilité cellulaire des cellules infectées par les virus vv811 parental et vv811 recombinants.....	124
B.3.4.4. Conclusion	125
C. Discussion	127
C.1. Expression des molécules anti-apoptotiques en isolation dans les cellules U2-OS et inhibition de l'apoptose.....	128
C.2. Utilisation du virus déficient vv811 comme inducteur d'apoptose.....	130
C.3. Perspectives	131
Conclusion générale.....	134
Bibliographie.....	135
ANNEXE 1	166
ANNEXE 2	181
Résumé - Summary.....	182

Table des figures

Figure 1 : Classification de Baltimore modifiée : réplication et transcription des gènes viraux.	27
Figure 2 : Cycle viral du virus de la vaccine..	32
Figure 3 : Les voies NF- κ B et leurs inhibitions par les protéines du virus de la vaccine.....	54
Figure 4 : Les voies des IRF et leurs inhibitions par les protéines du virus de la vaccine	56
Figure 5 : Les voies des MAPK et leurs inhibitions par les protéines du virus de la vaccine.	58
Figure 6: Les voies JAK/STAT et leurs inhibitions par les protéines du virus de la vaccine.	62
Figure 7 : Représentation schématique des principales protéines Bcl-2.....	68
Figure 8 : Représentation schématique des principales voies de l'apoptose.	73
Figure 9 : Représentation schématique des morts cellulaires induites après stimulation du récepteur au TNF- α	76
Figure 10 : Représentation schématique de 3 détecteurs impliqués dans la formation des inflammasomes.	79
Figure 11 : Représentation schématique des principales voies de l'inflammasome.....	79
Figure 12 : Représentation schématique des principales voies de l'apoptose et leurs inhibitions par les protéines de VACV.	90
Figure 13 : principe du protocole infection/transfection pour la construction de virus mutants par recombinaison génétique.	102
Figure 14 : Représentation schématique du virus vv811 et positions des gènes antiapoptotiques de vaccinia virus.	104
Figure 15 : Expression des protéines antiapoptotiques de VACV dans les cellules U2-OS transduites par lentivirus.	107
Figure 16 : Apoptose extrinsèque dans les cellules U2-OS transduites par lentivirus observée en microscopie.	108
Figure 17 : Apoptose extrinsèque dans les cellules U2-OS transduites par lentivirus.	109
Figure 18 : Apoptose intrinsèque dans les cellules U2-OS transduites par lentivirus.	111
Figure 19 : vv811 peut induire l'apoptose dans les cellules U2-OS.....	113
Figure 20 : Apoptose induite par vv811 sur les cellules U2-OS transduites par lentivirus...	114
Figure 21 : Courbes de croissance de vv811 sur les cellules U2-OS transduites par lentivirus.	115
Figure 22 : Construction du virus VACV WR Δ F1 (délétion du gène <i>FIL</i>).	116

Figure 23 : PCR de vérification de l'insertion des gènes antiapoptotiques de VACV dans le virus vv811.....	118
Figure 24 : Expression des protéines antiapoptotiques de VACV à partir des virus recombinants vv811.....	119
Figure 25 : L'expression des protéines antiapoptotiques de VACV <i>in cis</i> n'affecte pas la propagation du virus vv811.	120
Figure 26 : L'expression des protéines antiapoptotiques de VACV <i>in cis</i> n'affecte pas la réplication du virus vv811.	120
Figure 27 : Induction et inhibition de l'apoptose par les virus VACV WT parentaux et recombinants et vv811 parental et recombinants.....	122
Figure 28 : Induction et inhibition de l'apoptose par les virus vv811 parental et vv811 recombinants.....	123
Figure 29 : Viabilité cellulaire des cellules U2-OS et Hela infectées par les virus vv811 parental et vv811 recombinants.	125

Table des tableaux

Tableau 1 : Classification des Poxviridae	28
Tableau 2 : Oligonucléotides utilisés	96

Financements:

Ce travail a reçu le soutien financier de :

L'Université Européenne de Bretagne (Bourse de Mobilité).

C.H.U. de Rennes et Faculté de Médecine de Rennes (délégation et mise en disponibilité).

Wellcome Trust (financement du poste de Research Assistant occupé à Cambridge).

Liste des abréviations

2'-5' OAS: 2'-5' oligoadénylate synthétase
ADN: acide désoxyribonucléique
AIF: apoptosis-inducing factor
AIM2: absent in melanoma 2
AMP: adenosine monophosphate
ANT: adenine nucleotide translocase
AP-1: activating protein 1
ARN: acide ribonucléique
ASC: apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ATF2: activating transcription factor 2
ATP: adenosine triphosphate
Bcl-2: B-cell lymphoma 2
Bcl-w: Bcl-2 like 2 protein
Bcl-Xl: Bcl-2 related protein, long isoform
BCR: B cell receptor
BH: BCL-2 homology
BI-1: Bax inhibitor 1
BIR: baculovirus IAP repeat
CAD: caspase activated DNase
CARD: caspase activation and recruitment domain
Cardif: caspase recruitment domain adaptor inducing IFN- β
cDC: conventionnal dendritic cell
CED-3: cell-death determining 3
CEV: cell-associated enveloped virus
cGAMP: cyclic-GMP-AMP
cGAS: cGAMP synthase
cIAP : cellular IAP
CIP: calf intestinal phosphatase
CMC: carboxy methyl cellulose
CMH: complexe majeur d'histocompatibilité
CPA: cellule présentatrice d'antigène
CrmA: cytokine response modifier A

CYLD: cylindromatosis
 DAI: DNA-dependent activator of IFN
 DAMP: damage-associated molecular pattern
 DAPI: 4',6-diamino-2-phenylindole
 DD: death domain
 DDX3: DEAD box protein 3
 DED: death effector domain
 DIABLO: direct IAP-binding protein with low pI
 DISC: death-inducing signaling complex
 DMSO: dimethyl sulfoxide
 DNA: deoxyribonucleic acid
 DNA-PK: DNA-protein kinase
 DNA-PKcs: DNA-protein Kinase catalytic subunit
 DNM1L: dynamin1-like
 dNTP: désoxynucléotide triphosphate
 DR: death receptor
 EBV: Epstein-Barr virus.
 Ecogpt: *E. coli* guanylylphosphoribosyl transferase
 ECP: effet cytopathogène
 EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid
 EEV: extracellular enveloped virus
 EGFP: enhanced green fluorescent protein
 eIF2 α : eucaryote translation initiation factor 2
 Erk: extracellular signal-regulated kinase
 FADD: Fas-associated death domain
 FasL: Fas ligand
 FasR: Fas receptor
 FLIP: cellular FLICE inhibitory protein
 FPV : fowlpox virus
 GAAP: golgi anti-apoptotic protein
 GAF: interferon- γ activated factor
 GAS: interferon- γ activated sequence
 GC %: pourcentage en base guanine-cytosine
 GMP: guanosine monophosphate

HEK 293T : human embryonic kidney 293T

HHV-8: human herpes virus 8

HIN200: hematopoietic interferon-inducible nuclear antigens with 200 amino-acid repeats

HMGB1: high mobility groove box 1

HVS: herpesvirus Saimiri

HtrA2: high temperature requirement

IAP: inhibitor of apoptosis

ICAD: inhibitor of CAD

ICE: interleukine-1 β converting enzyme

ICH-1: ICE/CED-3 homologue 1

IEV: intracellular enveloped virus

IFN: interféron

IFNAR: récepteur des interférons α/β

IFNGR: interferon gamma receptor

IFI16: interferon induced 16

IKK: inhibitor of κ B kinase

I κ B α : inhibitor of κ B α

IL: interleukine

IL-1R: interleukine-1 receptor

IL-1ra: IL-1 receptor antagonist

IMV: intracellular mature virus

IPS-1: IFN- β promoter stimulator-1

IRAK: IL-1R associated kinase

IRF: interferon regulatory factor

ISG: interferon stimulated gene

ISGF3: interferon stimulated gene factor 3

ISRE: interferon stimulated responsive element

ITRs: inverted terminal repeats

JAK: Janus tyrosine kinase

JNK: Jun N-terminal kinase

KSBcl2: Kaposi sarcoma-associated Bcl-2

kDa: kilodalton

Kpb: kilo paires de bases

LB: Luria Broth

LGP2: laboratory of genetics and physiology 2
 LPS: lipopolysaccharide
 LRR: leucine rich repeat
 LRRFIP1: leucine rich repeat flightless interacting protein
 LUBAC: linear ubiquitin chain assembly complex
 MAPK: mitogen-activated protein kinase
 MAP2K: MAPK kinase
 MAP3K: MAP2K kinase
 MAVS: mitochondrial antiviral signaling adaptor
 Mcl-1: myeloid leukemia cell-1
 MCMV: murine cytomegalovirus
 MDA-5: melanoma differentiation associated protein 5
 MLKL: mixed lineage kinase domain-like
 MOMP: mitochondrial outer membrane permeabilisation
 MVA: modified *vaccinia* Ankara
 NACHT: nucleotide-binding and oligomerisation
 NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
 NAP1: NF- κ B activation kinase associated protein 1
 NCCD: Nomenclature Committee on *Cell Death*
 NETs: neutrophil extracellular traps
 NF- κ B: nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells
 NK: natural killer
 NLR: NOD-like receptor
 NLRC: NACHT, LRR and CARD domains-containing proteins
 NLRP: NACHT, LRR and PYD domains-containing proteins
 NLS: nuclear localisation sequence
 NOD: nucleotide-binding oligomerisation domain-containing protein
 NOX1: NADPH oxydase 1
 NS: non structural protein
 OMS: Organisation Mondiale de la Santé
 ORF: open reading frame
 PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis
 PAMP: pathogen associated molecular pattern
 PCR: polymerase chain reaction

pDC: plasmacytoid dendritic cell
 PGAM5: phosphoglycerate mutase family member 5
 PKR: double strand RNA-activated protein kinase
 PIDD: p53-inducible protein with a death domain
 PNN: polynucléaires neutrophiles
 PTPC: permeability transition pore complex
 PRR: pattern recognition receptor
 PYD: pyrin domain
 PYHIN: pyrin and HIN *domain*-containing protein
 RAIDD: RIP-associated ICH-1 homologue 1 protein with a death domain
 RHD: Rel homology domain
 RHIM: RIP homotypic interaction motif
 RID: receptor internalisation and degradation complex
 RIG-I: retinoic acid inducible gene I
 RIP: receptor interacting protein
 RLR: RIG-I like receptor
 RNase L: latent ribonuclease
 ROCK I: Rho associated kinase I
 ROS: reactive oxygen species
 RR: ribonucléotide réductase
 SCF^{βTrCP}: SKP1-cullin 1-F-box protein containing β-transducin repeat-containing protein
 SDS: sodium dodecyl sulphate
 SINTBAD: similar to NAP1 TBK1 adaptor
 SKP1: S phase kinase-associated protein 1
 SMAC: second mitochondrial-derived activator of caspase
 SOCE: store operated calcium entry
 SPI-1: serpin inhibitor 1
 SPI-2: serpin inhibitor 2
 STAT: signal transducer and activator of transcription
 STING: stimulator of IFN genes
 STS: staurosporine
 SVF: sérum de veau fœtal
 TAB: TAK1 binding protein
 TAE: tris acetate EDTA

TAK1: TGF- β activated kinase 1
 TANK: TRAF family member associated NF- κ B activator
 TBK1: TANK binding kinase 1
 t-Bid: truncated Bid
 TCR: T cell receptor
 TGF- β : transforming growth factor β
 TIR: toll interleukin 1 receptor
 TK: thymidine kinase
 TLP2: tumor progression locus 2
 TLR: Toll like receptor
 TMBIM: transmembrane Bas inhibitor-containing motif
 Tmpk: thymidylate kinase
 TNF: tumor necrosis factor
 TNFR1: TNF receptor 1
 TRADD: TNF receptor type 1-associated death domain
 TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand
 TRAF: TNF receptor-associated factor
 TRAM: TRIF related adaptor molecule
 TRIF: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
 UBC13: E2 ubiquitin conjugating enzyme 13
 VACV: vaccinia virus, virus de la vaccine
 vCCI: viral CC chemokine inhibitor
 VCP: VACV complement control protein
 VDAC: voltage dependent anion channel
 VETF: VACV early transcription factor
 VHB: virus de l'hépatite B
 vIBO: viral inhibitor of Bak oligomerisation
 vICA: viral inhibitor of caspase 8 induced apoptosis
 VIH: virus de l'immunodéficience humaine
 vIRA: viral inhibitor of RIP activation
 VISA: virus-induced signalling adaptor
 vMIA: viral mitochondrial inhibitor of apoptosis
 VSV: Vesicular stomatitis virus
 VV: vaccinia virus, virus de la vaccine

WR: Western Reserve

WT: wild type

XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis

zVAD-fmk: benzyloxycarbonyl-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketone

ZBP1: Z-DNA binding protein

Introduction

Il est estimé que le virus de la variole a causé la mort de 300 à 500 millions de personnes au 20^{ème} siècle. Le virus de la vaccine, dont l'hôte naturel est inconnu, a été le vaccin utilisé au cours du siècle passé pour éradiquer ce pathogène mortel, avec succès. Malgré la disparition de cette maladie, l'étude du virus de la vaccine a conservé tout son intérêt. Tout d'abord, la menace bioterroriste nécessite d'améliorer la sécurité des souches vaccinales. De plus, une grande quantité d'ADN étranger (jusqu'à 25000 paires de bases) pouvant être incorporée dans le virus de la vaccine, il est possible de l'utiliser comme agent de vaccination contre d'autres pathogènes. Obtenir des vaccins à la fois conformes aux exigences de sécurité et à la fois capables d'induire efficacement une immunité à long terme reste un objectif, malgré les progrès constants enregistrés dans ce domaine. De manière toute aussi importante, la modification génétique de ce virus a permis d'obtenir des souches se répliquant spécifiquement dans les cellules tumorales. L'utilisation de ces virus recombinants comme agents oncolytiques a donné des résultats spectaculaires et encourageants. Les recherches dans ce domaine sont intenses et prometteuses. Enfin, ce virus possède un nombre important de gènes modulateurs de l'activité cellulaire. Sa relative facilité de manipulation en laboratoire en font un modèle de premier choix pour l'étude des interactions hôte-pathogène. Dans ce travail, nous nous intéresserons particulièrement aux capacités antiapoptotiques de ce virus en comparant la contribution relative de quatre molécules antiapoptotiques codées par ce virus.

A. Introduction bibliographique.

A.1. La famille des poxvirus et le virus de la vaccine (VACV, VV)

A.1.1. Virus et classification

Les virus sont des agents infectieux dont la taille va de quelques nanomètres à plusieurs centaines de micromètres. Ils ne peuvent se répliquer qu'au sein de cellules d'organismes vivants et sont donc considérés comme des parasites intracellulaires obligatoires. La diversité parmi les virus est extrême : des infections virales peuvent survenir chez les animaux, les plantes, les bactéries et les archaebactéries. Les virus varient également en taille, en forme, en présence de membrane phospholipidique ou non, en complexité, en type d'acides nucléiques constituant leurs génomes, en stratégies de répllication. De ce fait, plusieurs types de classification peuvent être proposés. David Baltimore a proposé en 1971 une classification basée sur la nature du génome, son mode de répllication et de transcription (Baltimore, 1971). La classification modifiée de Baltimore classe les virus en 7 groupes.

A.1.2. La classification modifiée de Baltimore

Les groupes I et II contiennent les virus à ADN. Les virus du groupe I sont à ADN double brin. Hormis chez les poxvirus, la répllication de leur matériel génétique s'effectue dans le noyau de la cellule infectée (herpèsvirus, adénovirus). La répllication des virus de groupe II, constitué par les virus à ADN simple brin (parvovirus), requiert au préalable la production d'un intermédiaire double brin avant que la répllication du génome soit possible.

Les virus à ARN forment les groupes III, IV, V. Les virus du groupe III sont à ARN double brin (reovirus). Ils nécessitent la présence d'une ARN polymérase dépendante de l'ARN qui transcrit le brin négatif en ARN pré-génomique et en ARN messager qui servira à la synthèse des protéines virales. Cette enzyme, absente de la cellule hôte, est empaquetée dans les virions. Les virus du groupe IV ne sont constitués que d'un seul brin d'ARN positif. La classification modifiée de Baltimore dissocie les virus du groupe IV à ARN directement messager en deux groupes : IVa (picornavirus, flavivirus) et IVb (alphavirus, rubivirus). La répllication des virus du groupe IVa ne nécessite qu'un cycle de traduction. La polyprotéine initiale, obtenue directement à partir de l'ARN génomique, subira plusieurs clivages protéolytiques qui permettront la production de toutes les protéines, structurales et non structurales du virus. *A contrario*, plusieurs cycles de traduction sont nécessaires pour les virus du groupe IVb. Le premier, à partir de l'ARN directement messager, permettra la synthèse de l'ARN polymérase dépendante de l'ARN qui transcrit le brin positif original en brin antisens. Ce brin négatif servira de matrice à la synthèse de nouveaux ARN messagers

viraux subgénomiques codant pour les protéines structurales (second cycle de traduction). Dans ces deux groupes, ces ARN négatifs génomiques serviront de matrice pour la synthèse des nouveaux ARN génomiques positifs qui seront incorporés dans les nouveaux virions.

Les virus à ARN simple brin négatif appartiennent au groupe V (orthomyxovirus, paramyxovirus, rhabdovirus) et nécessitent comme les virus du groupe III la présence d'une ARN polymérase dépendante de l'ARN empaquetée dans le virion. Dans un premier temps, elle assurera la production d'ARN messager nécessaire à la synthèse des protéines virales. Dans un second temps, des ARN positifs qui serviront de matrice pour la production d'ARN négatifs génomiques des futurs virions seront synthétisés.

Les groupes VI et VII ont la particularité de posséder une rétrotranscriptase virale qui permet la synthèse de brins d'ADN à partir d'une matrice ARN. Les rétrovirus, dont le V.I.H. (virus de l'immunodéficience humaine) est l'exemple le plus connu, représentent le groupe VI. L'ADN double brin obtenu après rétrotranscription de l'ARN simple brin positif viral sera intégré au sein du génome de la cellule hôte grâce à une intégrase virale. Les hepadnavirus (virus de l'hépatite B) constituent le groupe VII, ou groupe des reversivirus. A partir de l'ADN viral partiellement double brin la réplication virale nécessite la production de brins d'ARN intermédiaires positifs qui serviront de matrice à une rétrotranscriptase virale qui synthétisera les nouveaux ADN génomiques. (Figure 1).

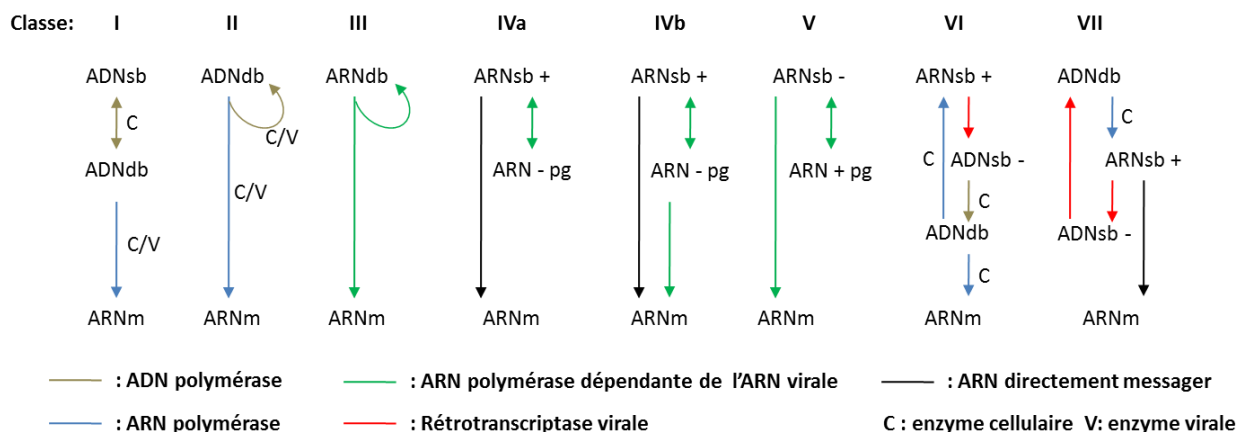


Figure 1 : Classification de Baltimore modifiée : réplication et transcription des gènes viraux (adapté de Agut, 2013).

A.1.3. Poxvirus et virus de la vaccine : caractéristiques virologiques

A.1.3.1. Classification

Les virus appartenant à la famille des *Poxviridae* possèdent un grand génome à ADN double brin linéaire allant de 130 à 360 kilopaires de bases (kpb) dont la réplication s'effectue entièrement dans le cytoplasme des cellules infectées. Ils infectent une large gamme d'hôtes eucaryotes incluant les mammifères, les oiseaux, les reptiles et les insectes. Le virus de la vaccine (vaccinia virus, VACV, VV), est le virus prototype de cette famille qui est divisée en deux sous-familles (Tableau 1). Les virus appartenant à la sous famille des *Chordopoxvirinae* infectent les vertébrés quand ceux de la sous famille des *Entomopoxvirinae* infectent les insectes. Huit genres composent les *Chordopoxvirinae* : *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Molluscipoxvirus* et *Yatapoxvirus*. 3 genres composent les *Entomopoxvirinae* : *alpha*-, *beta*- et *gamma*-entomopoxvirus. Les membres d'un même genre, en plus d'être proches génétiquement, partagent une morphologie et un tropisme d'hôtes identiques. VACV qui appartient au genre *Orthopoxvirus* est le poxvirus le plus étudié. Il s'agit en effet du premier virus animal à avoir été observé au microscope, obtenu et amplifié en culture cellulaire, titré précisément, purifié physiquement et analysé chimiquement (Moss, 2007). Sa réputation tient également au fait qu'il s'agit de l'agent utilisé pour la vaccination contre la variole, autre membre des *Orthopoxvirus* (Fenner, 1988). (Tableau 1).

Famille des POXVIRIDAE					
Sous-familles	Genres	Espèces	Génome (kpb)	% G + C	Tropisme d'Hôtes
<i>Chordopoxvirinae</i>	<i>Orthopoxvirus</i>	camelpox, cowpox, ectromelia, monkey pox, racoonpox, skunkpox, Uasin Gishu, vaccinia, variola, volepox	200	36	Large à étroit
	<i>Parapoxvirus</i>	Auzduk disease, bovine papular stomatitis, chamois contagious ecthyma, orf, pseudocowpox, parapox of red deer, seal pox, squirrelparapox	140	64	
	<i>Avipoxvirus</i>	canarypox, crowpox, fowlpox, juncopox, mynahpox, pigeonpox, psittacinepox, quailpox, peacockpox, penguinpox, sparrowpox, starlingpox, turkeypox	260	35	Oiseaux, transmission par arthropodes
	<i>Capripoxvirus</i>	goatpox, lumpy skin disease, sheeppox	150		Ongulés, transmission par arthropodes
	<i>Leporipoxvirus</i>	hare fibroma, myxoma, rabbit fibroma, squirrel fibroma	160	40	Léporidés, écureuils
	<i>Suipoxvirus</i>	swinepox	170		Étroit
	<i>Molluscipoxvirus</i>	molluscum contagiosum	180	60	Humains
	<i>Yatapoxvirus</i>	tanapox, yaba monkey tumor	145	33	Primates
<i>Entomopoxvirinae</i>	<i>Alphaentomopoxvirus</i>	melontha melontha	260-370		Coléoptères
	<i>Betaentomopoxvirus</i>	ansacta moorei, melanoplus sanguinipes	232	18	Lépidoptères et orthoptères
	<i>Gammaentomopoxvirus</i>	Chironinus luridus	250-380		Diptères

Tableau 1 : Classification des Poxviridae (adapté de Moss, 2007)

A.1.3.2. Analyse phylogénétique

L'ADN polymérase virale, indispensable pour la réplication du virus, est parmi les gènes les plus conservés dans la famille des poxvirus, laissant suspecter l'existence d'un ancêtre commun. Sa séquence nucléique est utile pour les analyses phylogénétiques. De plus, une centaine de séquences complètes de poxvirus a été publiée et leur analyse démontre que les protéines des poxvirus sont plus proches des eucaryotes que des bactéries ou des archeobactéries (Lefkowitz *et al.*, 2006). L'analyse phylogénétique des chordopoxvirus, basée sur l'alignement de séquences de plusieurs gènes, permet de distinguer quatre sous-groupes (Gubser *et al.*, 2004). Parmi eux, les genres *Molluscipox* et *Avipox* sont les plus divergents, présentant également le plus grand nombre de gènes uniques. Le troisième sous-groupe, le plus grand, contient les genres *Yatapoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Suipoxvirus* et *Leporipoxvirus*. Enfin, le quatrième sous-groupe inclut le genre des *Orthopoxvirus*. Il apparaît que les protéines virales auraient une origine commune avec les protéines de leurs hôtes eucaryotes, probablement expliquée par un transfert de gènes horizontal au cours de l'évolution. Des preuves de duplication puis divergence de gènes viraux existent, créant des paralogues (Smith *et al.*, 1991b). De nombreuses protéines virales, par exemple, adoptent en effet une structure de type Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) et il est probable que ces nombreuses protéines virales aient été acquises chez l'hôte avant de se dupliquer et diverger (Bahar *et al.*, 2011).

A.1.3.3. Morphologies des particules virales des poxvirus

Etant parmi les plus gros virus à infecter le règne animal, les virions des poxvirus sont à la limite de la détection en microscopie optique. La microscopie électronique est nécessaire pour en observer l'ultrastructure. On distingue deux formes infectieuses de particules virales. La première est appelée virus mature intracellulaire (IMV : intracellular mature virus). Elle est composée du génome entouré par un core protéique. Elle possède en outre une membrane composée de lipides et de protéines. Sa forme typique rectangulaire est dite « en brique ». Les IMV constituent la majeure partie des particules infectieuses qui sont libérées par la lyse cellulaire observée à la fin du cycle viral (Roberts & Smith, 2008). Du fait de la présence d'une seconde enveloppe, l'autre forme infectieuse est appelée virion enveloppé. On distingue les virions enveloppés associés à la cellule (CEV : cell-associated enveloped virus) qui resteront attachés à la surface cellulaire et les virus enveloppés extracellulaires (EEV : extracellular enveloped virus) qui sont des CEV libres à l'extérieur de la cellule (Smith *et al.*, 2002). Les IMV et les CEV/EEV possèdent des propriétés structurales, fonctionnelles et

antigéniques différentes qui s'expliquent notamment par la présence de protéines différentes à leurs surfaces (Boulter & Appleyard, 1973).

A.1.3.4. Cycle viral.

A.1.3.4.1. Entrée du virus.

Le mécanisme d'entrée n'est pas élucidé. Les protéines virales H3 (Lin *et al.*, 2000), A27 (Chung *et al.*, 1998) et D8 (Hsiao *et al.*, 1999) interagissent avec les glycosaminoglycanes présents à la surface cellulaire mais la présence de ceux-ci n'est pas essentielle (Carter *et al.*, 2005) et, à ce jour, aucun récepteur spécifique n'a été identifié. En fonction du type cellulaire et de la souche de VACV, deux mécanismes d'entrée des IMV sont décrits. Le premier est la fusion de la membrane virale avec la membrane cellulaire (Carter *et al.*, 2005); le second est l'endocytose de la particule suivie de la fusion de la membrane virale avec la membrane de la vésicule, processus dépendant du pH (Townsend *et al.*, 2006). Dans les deux cas, un complexe d'entrée composé d'au moins neuf protéines virales est requis (Senkevich *et al.*, 2005). Plus récemment, l'entrée de ces virions par macropinocytose a également été décrite (Mercer & Helenius, 2008). Les EEV pénètrent la cellule après disruption de la membrane externe au contact de la cellule cible révélant ainsi un IMV utilisant, supposément, les mêmes mécanismes décrits auparavant (Law *et al.*, 2006). L'entrée par macropinocytose des EEV requiert la rupture de la membrane externe grâce à une acidification du pH puis la fusion de la membrane interne avec la membrane de la vésicule (Ichihashi, 1996; Schmidt *et al.*, 2011). Dans tous les cas, le core viral est libéré dans le cytoplasme. L'entrée par fusion est sans doute le mécanisme prépondérant d'après l'expérience accumulée au sein de notre laboratoire.

A.1.3.4.2. Morphogénèse.

Le core viral sera transporté dans une région périnucléaire via les microtubules (Carter *et al.*, 2003) et commencera à se disloquer permettant la synthèse des ARN messagers précoces par une ARN polymérase contenue dans le virion. Ces régions périnucléaires, dépourvues d'organite, où le virus va se répliquer et où de nouvelles particules virales vont se former sont appelées « usines virales ». Les premières structures observables ont une forme en croissant. Il s'agit d'une membrane formée *de novo* (Dales & Mosbach, 1968) qui va progressivement entourer une masse dense de nucléoprotéines pour former le virion immature. Cette forme qui devient sphérique contient l'ADN viral. Au cours de la maturation, caractérisée par la réorganisation interne de la masse nucléoprotéique et l'acquisition de nouvelles protéines

membranaires, elle va acquérir la forme caractéristique en « tonneau » ou en « brique » et former l'IMV. La majorité des particules virales va demeurer à ce stade au sein de la cellule en dehors des usines virales. La partie restante va être exportée vers la surface cellulaire via les microtubules et acquérir une double membrane (le virion est alors entouré de trois membranes) lors de ce voyage pour former les virus intracellulaires enveloppés (IEV : intracellular enveloped virus). Cette double enveloppe dérive des citernes du *trans* golgi (Hiller & Weber, 1985) et du réticulum endoplasmique (Tooze *et al.*, 1993). Au moins neuf protéines virales sont associées avec ces membranes : A33, A34, A36, A56, B5, E2, F12, F13, et K2 (Roberts & Smith, 2008). E2, F12 et A36 seront impliquées dans la liaison des IEV aux microtubules afin de gagner la surface cellulaire (Ward & Moss, 2001; Zhang *et al.*, 2000). Au contact de la surface interne de la membrane cellulaire la membrane la plus externe va fusionner libérant ainsi les CEV retenus à cette surface (IMV plus une membrane) qui deviendront les EEV s'ils sont relâchés dans le milieu extracellulaire.

A.1.3.4.3. Propagation.

La fusion des IEV à la membrane plasmique libère la molécule A36 qui va être responsable de la polymérisation de molécules d'actine pour former des filaments qui pousseront les CEV en direction des cellules voisines (Frischknecht *et al.*, 1999). Les EEV seront importantes pour la propagation à distance du virus en culture cellulaire ou bien à l'intérieur de l'hôte (Payne 1980, Smith 2002). En effet, malgré la présence de la protéine B5 qui est une cible privilégiée des anticorps neutralisants (Chen *et al.*, 2006; Putz *et al.*, 2006), sa membrane dérivée de la cellule hôte lui confère une protection relative. Les IMV nécessiteront la lyse cellulaire pour pouvoir infecter d'autres cellules. Ces molécules ont une longue durée de vie en dehors de l'hôte pouvant supporter plusieurs cycles de congélation-décongélation. Leur rôle est important dans la transmission entre individus (Boulter & Appleyard, 1973). Elles sont en revanche peu efficaces pour la dissémination du virus au sein de l'organisme car elles sont, en plus d'être la cible de plusieurs anticorps neutralisants, également détruites par le complément en l'absence d'anticorps spécifiques (Vanderplasschen *et al.*, 1998). Récemment, un nouveau mécanisme original de propagation a été découvert. Au contact d'une cellule infectée, un virion arrivant sous forme d'EEV sera repoussé suite à la formation d'un filament d'actine, prévenant la surinfection de la cellule et facilitant l'infection des cellules saines voisines. Ce mécanisme nécessite les protéines A33 et A36 (Doceul *et al.*, 2010). (Figure 2).

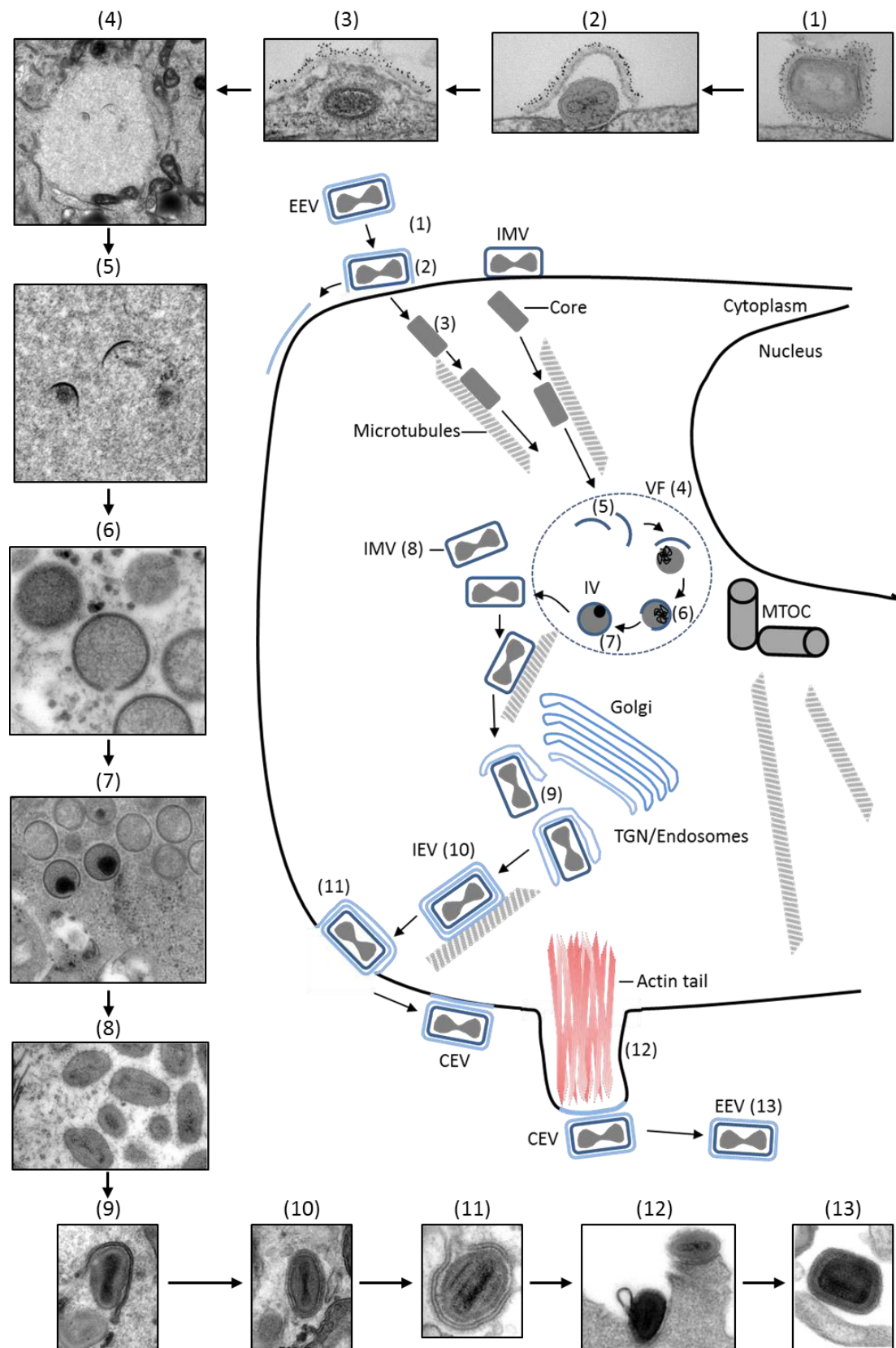


Figure 2 : Cycle viral du virus de la vaccine. (adapté de Roberts & Smith, 2008).

Les images de microscopie électronique ont été données généreusement par Mike Hollinshead (Smith Lab). Elles servent à illustrer le schéma et aucune échelle de taille n'est présentée.

A.1.3.5. Génome

Le génome des poxvirus est constitué de grandes molécules d'ADN double brin. La taille peut varier d'environ 130 kpb à plus de 360 kpb. A chaque extrémité du génome sont présentes des séquences répétées inversées (ITRs) qui varient en taille (0.1 – 12.4 kpb) sous l'influence de recombinaisons entre des blocs de séquences répétées à l'intérieur d'une même région terminale ou suite à des transpositions de ces blocs d'une partie terminale du génome à l'autre. Une structure en épingle à cheveux lie de façon covalente les deux brins en formant une boucle terminale de chaque part du génome et assure une continuité de la chaîne polynucléotidique (Baroudy *et al.*, 1982). La composition en nucléotides varie entre les différents genres. La composition en guanine et cytosine (GC %) est d'environ 36% pour le genre *Orthopoxvirus*. L'obtention des séquences nucléiques d'au moins un membre de chaque genre de la sous famille des *Chordopoxvirinae* a été obtenue et montre qu'une centaine de gènes est conservée parmi eux (Upton *et al.*, 2003). Les gènes des poxvirus ne sont généralement pas chevauchants et ne contiennent pas d'intron. Très peu d'ADN non codant est présent. Les gènes se présentent en blocs au sein desquels la transcription s'effectue dans le même sens, en direction de la terminaison du génome la plus proche, probablement afin d'éviter des collisions de complexes transcriptionnels et limiter la formation d'ARN double brins. La région centrale du génome contient les gènes les plus conservés, souvent impliqués dans des fonctions essentielles pour la réplication, la transcription et l'assemblage des virions. Leur répartition est extrêmement similaire entre les différents chordopoxvirus (Gubser *et al.*, 2004; Upton *et al.*, 2003). L'autre partie du génome, celle qui se trouve de chaque côté de cette partie centrale, plus proche des terminaisons, peut varier considérablement entre les différentes espèces et est composée de gènes non essentiels pour la réplication virale. La plupart de ces gènes terminaux contribue à la virulence du virus et sont impliqués dans la modulation et le contrôle de la réponse antivirale de l'hôte.

A.1.3.6. Réplication du génome

La réplication de l'ADN des poxvirus se déroule dans le cytoplasme des cellules infectées (Pennington & Follett, 1974; Prescott *et al.*, 1971). Les foyers de réplifications, ou usines virales, peuvent être observés en microscopie optique. La réplication commence une à deux heures après l'infection et génère environ 10 000 copies du génome par cellule, dont la moitié sera incorporée dans les virions qui seront produits 8 heures après l'entrée du virus (Joklik & Becker, 1964; Salzman, 1960). Des enzymes virales impliquées dans la synthèse d'acides désoxyribonucléiques facilitent la réplication virale en augmentant le pool de ces précurseurs.

Chez les orthopoxvirus, ces enzymes exprimées en phase précoce de l'infection sont : la thymidine kinase (Bajszar *et al.*, 1983; Hruby *et al.*, 1983), la thymidylate kinase (Smith *et al.*, 1989a), la ribonucléotide réductase (Slabaugh *et al.*, 1988; Tengelsen *et al.*, 1988) et la dUTPase (Broyles, 1993). Il est important de noter que la réplication du virus en culture cellulaire ne nécessite pas la présence de ces enzymes. Les protéines virales indispensables à la réplication du génome sont très conservées et sont au nombre de 3 : l'ADN polymérase, la nucléoside triphosphatase et l'ADN glycosylase (Moss, 2007). Le virus code aussi pour une topoisomérase ADN et une ADN ligase ATP (adenosine triphosphate) dépendante qui ne sont pas indispensables en culture cellulaire. Le mécanisme de réplication du génome des poxvirus n'est pas complètement compris. Suite à une cassure de l'ADN (nick) à environ 200 paires de bases d'une des extrémités du génome, le brin complémentaire sera complété et se repliera en épingle à cheveu sur lui-même, fournissant une extrémité 3' libre pouvant servir d'auto-amorce pour la réplication du génome complet (Moyer & Graves, 1981; Tattersall & Ward, 1976). Ce modèle, semblable à celui des parvovirus, est celui qui est accepté.

A.1.3.7. Régulation de l'expression des gènes viraux/Transcription virale

Lors de l'infection, une cascade régulée et séquentielle d'événements transcriptionnels est observée et partagée entre les poxvirus, où chaque étape régule la suivante (Broyles, 2003). Cette cascade conduit à la synthèse de trois catégories d'ARN messagers et, après traduction, à la production de trois catégories de protéines correspondantes. Ces gènes précoces, intermédiaires et tardifs sont tous transcrits par l'ARN polymérase virale, complexe constitué de plus de neuf sous-unités (Moss, 1994). Les gènes impliqués dans la transcription, de même que les promoteurs des gènes, sont extrêmement conservés parmi les poxvirus (Lefkowitz *et al.*, 2006).

A.1.3.7.1. Les gènes précoces :

Un système de transcription comprenant de nombreux facteurs et enzymes virales est présent à l'intérieur du core du virion permettant la synthèse d'ARN messagers juste après l'entrée du virus dans la cellule. Parmi eux, nous pouvons citer une ARN polymérase composée de plusieurs sous-unités, une protéine associée à l'ARN polymérase (RAP94), un facteur de transcription précoce (VACV early transcription factor, VETF), des enzymes nécessaires au capping et à la méthylation des ARN messagers, et des topoisomérases. Les ARN messagers produits sont cappés, méthylés et polyadénylés et de ce fait ressemblent aux ARN messagers cellulaires (Kates & Beeson, 1970; Kates & McAuslan, 1967; Munyon *et al.*, 1967; Wei & Moss, 1975). Ils sont détectés dès vingt minutes après l'infection. Environ la moitié des gènes

de VACV sont précoces et sont transcrits avant la réplication de l'ADN (Boone & Moss, 1978; Paoletti & Grady, 1977). Ces gènes précoces codent pour des protéines qui seront nécessaires à la réplication du génome viral, à la transcription des gènes intermédiaires et aussi de manière importante à des protéines impliquées dans l'inhibition des mécanismes antiviraux de la cellule hôte. L'arrêt de la transcription de ces gènes coïncide avec la disparition du core (uncoating).

A.1.3.7.2. Les gènes intermédiaires :

Ces gènes sont transcrits après la réplication de l'ADN et avant les gènes tardifs. Cinq gènes appartenant à cette classe ont été caractérisés (Keck *et al.*, 1990; Vos & Stunnenberg, 1988). A1, A2 et G8 codent pour des facteurs de transcription des gènes tardifs (Shuman, 1992). I3 est une protéine qui se lie à l'ADN simple brin et interagit avec la ribonucléotide réductase. I8 code pour une hélicase ARN (Davis & Mathews, 1993; Shuman, 1992; Tseng *et al.*, 1999). La réplication de l'ADN est nécessaire à l'expression de ces gènes intermédiaires en permettant l'accès aux facteurs de transcription.

A.1.3.7.3. Les gènes tardifs :

Leur expression, sous l'influence des gènes intermédiaires, se prolongera jusqu'à la fin du cycle viral. Les protéines tardives regroupent les protéines de structures nécessaires à la formation du virion, les protéines d'enveloppe et les protéines nécessaires à la transcription des gènes précoces (VETF, RAP94) qui seront empaquetées dans les virions (Broyles, 2003). La demi-vie des ARN messagers étant courte, leur production doit être continue et soutenue pendant cette période.

A.2. Pouvoir pathogène des *Chordopoxvirinae* chez l'homme

A.2.1. Orthopoxvirus

A.2.1.1. Virus de la variole

Le virus de la variole est responsable de la maladie du même nom, également connue sous le nom de « petite vérole ». La variole est une maladie strictement humaine, déclarée éradiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1980, le dernier cas ayant été recensé en 1977. Au sein de l'espèce *variola*, on distingue deux souches génétiquement différentes : *variola major* et *variola minor*. Les manifestations cliniques de l'infection à *variola minor* sont atténuées.

A.2.1.1.1. Épidémiologie :

La transmission interhumaine de la variole s'effectue principalement par inhalation de gouttelettes aériennes contaminées. Un contact rapproché facilite la transmission. La contamination peut également s'effectuer au contact des lésions cutanées ou par du matériel contaminé. Le risque de contamination des individus dans l'entourage d'un premier cas peut atteindre 58,4% (Damon, 2007; Fenner *et al.*, 1988) s'ils ne sont pas vaccinés. La mortalité varie entre 10 et 30% des personnes infectées, celle-ci étant corrélée à l'intensité du rash observé et plus élevée chez les enfants et les femmes enceintes (Rao *et al.*, 1968; Rao *et al.*, 1963). L'épidémiologie de *variola minor* est similaire hormis le taux de mortalité qui est inférieur à 1%.

A.2.1.1.2. Signes cliniques :

Classiquement, la variole est une maladie éruptive systémique caractérisée par l'observation d'une fièvre supérieure à 40°C, de céphalées, de douleurs dorsales entraînant la prostration du malade et de vomissements. Suivant la période d'incubation asymptomatique qui peut durer entre 10 et 14 jours, la fièvre élevée apparaît, suivie, environ un ou deux jours après, par l'apparition d'un énanthème (2 jours) lui-même suivi d'un exanthème (12 à 32 jours) distribué de manière centrifuge touchant particulièrement les muqueuses orales, la face et les extrémités (paumes et voûtes plantaires) plutôt que le tronc. Après le stade macule puis papule, des vésicules apparaissent 4 à 5 jours après la phase d'incubation et se transforment en pustules après 7 jours. Après environ 14 jours, les croûtes se formeront et tomberont laissant apparentes des lésions cicatricielles. Outre la forme classique, on pouvait distinguer la variole sans éruption, observée chez certaines personnes vaccinées, mais aussi des formes

plus sévères, telles la variole plane ou maligne, entraînant une infection généralisée et un taux de mortalité d'environ 80%. La variole hémorragique, constamment fatale dans la semaine suivant le début des symptômes, représentait 1% des cas. Les manifestations cliniques de *variola minor* correspondent à une forme atténuée de la variole classique.

A.2.1.1.3. Physiopathologie

L'infection s'établit, la plupart du temps, par voie respiratoire. Le virus se réplique au niveau des muqueuses et du nasopharynx avant de gagner les ganglions lymphatiques régionaux. Une première virémie est observée lorsque le virus gagne le système réticulo-endothélial. La réplication y sera amplifiée conduisant à une seconde virémie qui sera responsable de l'atteinte des autres organes, particulièrement les kératinocytes de la peau, causant l'apparition de l'éruption. La mort des patients n'est expliquée ni par une intense réplication ni par nécrose au niveau du foie et de la rate. Le choc septique pouvant découler de l'infection serait le principal facteur de gravité de la maladie (Bray & Buller, 2004).

A.2.1.1.4. Diagnostic

Le diagnostic de variole était avant tout clinique, la plupart du temps dans un contexte d'épidémie. La confusion avec certaines autres pathologies vésiculo-pustuleuses et principalement les cas sévères de varicelle représentait la principale difficulté. Parmi les autres sources de confusion, nous pouvons citer certaines infections à entérovirus, l'infection à *Molluscum contagiosum*, des dermatites médicamenteuses et les piqûres d'insectes (Bremner & Henderson, 2002). Malgré l'éradication du virus, la formation du personnel médical reste une nécessité du fait que le virus de la variole est considéré comme une arme biologique (Mahy, 2003). Le diagnostic, notamment dans le cadre du plan Biotox, sera confirmé au laboratoire par PCR (polymerase chain reaction).

A.2.1.1.5. Traitement

Des conditions d'isolement strict, en chambre à pression négative et un traitement symptomatique incluant hydratation et nutrition sont nécessaires. Il n'existe pas de médicaments spécifiques de la variole. Chez l'animal infecté par le virus de la vaccine ou le virus cowpox, le cidofovir a montré des effets intéressants sur la charge virale pulmonaire s'il était administré précocement lors de la maladie. L'administration d'immunoglobuline est inefficace une fois la maladie déclarée.

A.2.1.1.6. Vaccination

Jenner a observé en 1798 (Damon, 2007) que l'inoculation de l'agent infectieux responsable de lésions cutanées chez les vaches et les paysans en contact avec elles, le virus cowpox, protégeait de la variole. Ce virus fut utilisé comme agent de vaccination au 19^{ème} et 20^{ème} siècle. Il fut remplacé par le virus de la vaccine pendant la campagne d'éradication menée par l'OMS, dans la seconde moitié du 20^{ème} siècle, avec le succès que l'on connaît (Fenner, 1988). L'absence de réservoir animal de la variole et l'immunité à long terme induite par ce vaccin vivant permettent d'expliquer ces résultats, jamais atteints avec aucun autre pathogène. De plus, la vaccination peut également avoir des effets bénéfiques si elle est effectuée pendant la période d'incubation, atténuant les symptômes.

Bien que la variole ait été éradiquée, les travaux d'amélioration du virus de la vaccine comme agent de vaccination demeurent nombreux. La vaccination de sujets immunodéficients s'est avérée problématique et la sécurité du vaccin s'est révélée insuffisante chez ces personnes. Dans le but d'améliorer cette sécurité, la souche MVA (modified vaccinia Ankara) a été générée par plus de 500 passages successifs sur des fibroblastes d'embryon de poulet. Le virus a perdu, au cours de ce processus, de larges portions de son génome mais a conservé ses capacités à se répliquer dans certains types cellulaires. Le virus MVA induit une réponse immune robuste tout en présentant un profil de sécurité élevé permettant la vaccination de personnes immunodéficientes (Sutter & Moss, 1992; Wyatt *et al.*, 2004).

De plus, il a été montré au début des années 1980 que le virus de la vaccine pouvait être utilisé comme vaccin contre des antigènes provenant d'autres pathogènes (Panicali *et al.*, 1983; Paoletti *et al.*, 1984; Smith *et al.*, 1983a; Smith *et al.*, 1983b). Il est en effet possible d'incorporer dans le virus de la vaccine une quantité d'ADN allant jusqu'à 25000 paires de bases (Smith & Moss, 1983). Cette capacité, couplée au développement de la souche MVA et de la souche NYVAC (une autre souche de virus de la vaccine atténuée) (Tartaglia *et al.*, 1992) sont exploitées actuellement dans le développement de vaccin contre des pathogènes d'importance majeure en santé publique : paludisme, V.I.H., la tuberculose (Gomez *et al.*, 2008; Walsh & Dolin, 2011).

A.2.1.2. Autres orthopoxvirus responsables de maladies humaines

A.2.1.2.1. Le virus monkeypox

Contrairement à la variole, il s'agit alors de zoonoses, l'homme n'étant qu'un hôte accidentel. Le virus monkeypox, dont l'hôte naturel semble être des rongeurs, contrairement à ce que laisse penser son nom, est retrouvé en Afrique de l'ouest et centrale. Après infection par voie respiratoire, ou percutanée, il est associé à un taux de mortalité de 10% chez les personnes non vaccinées avec un taux de transmission interhumain plus faible qu'avec la variole (9,3%) (Jezek *et al.*, 1988; Jezek *et al.*, 1986). La vaccination contre la variole est protectrice. Les signes cliniques ressemblent à la variole avec toutefois des lymphadénopathies beaucoup plus prononcées, notamment au niveau cervical ou inguinal.

A.2.1.2.2. Le virus cowpox

Le virus cowpox a pour hôte naturel des rongeurs comme les campagnols et les mulots. Ce virus possède un large tropisme d'hôte. Il peut infecter le bétail mais également les chats, source majeure de contamination chez les enfants. Les lésions douloureuses engendrées par ce virus demeurent localisées. On observe tous les stades : macules, pustules puis croûtes. Un syndrome pseudogrippal avec altération de l'état général, fièvre et lymphadénopathies est généralement observé. Les lésions disparaissent en 6 à 8 semaines. On peut donner en exemple les infections des pies de vaches et des doigts des fermiers pratiquant la traite à la main sans protection.

A.2.2. Parapoxvirus et pouvoir pathogène chez l'homme

Les infections à parapoxvirus sont ubiquitaires. Il s'agit de zoonoses transmises par le bétail et les ovins. Elles sont considérées comme des maladies professionnelles chez les personnes effectuant des activités agricoles, les vétérinaires, les personnels d'abattoir. La transmission s'effectue au contact direct d'un épithélium abîmé avec les lésions. Le virus Orf, dont les ovins sont le réservoir, est le principal parapoxvirus d'intérêt en clinique humaine. La maladie n'est pas systémique et la lésion, souvent unique, n'est pas très douloureuse. Des lymphadénopathies peuvent être observées. Le diagnostic est généralement réalisé par PCR et il n'existe pas de traitement spécifique.

A.2.3. Molluscum Contagiosum

Appartenant au genre *Molluscipoxvirus*, ce virus est responsable de lésions cutanées molles ressemblant à des verrues. C'est une infection spécifiquement humaine. Le contact direct d'une peau infectée avec une peau endommagée permet la transmission du virus mais la transmission peut aussi être véhiculée par des objets contaminés (serviette de toilettes par exemple). Il semblerait également que ce soit une maladie sexuellement transmissible. Les lésions, en général de quelques-unes à une vingtaine, sont des petites papules de 2 à 5 millimètres, arrondies et molles, souvent ombiliquées. Chaque papule disparaît en environ deux mois mais il est parfois nécessaire d'attendre 6 à 9 mois pour que l'infection soit définitivement résolue. Le diagnostic est surtout clinique mais peut être confirmé par PCR au laboratoire. Ce virus est un des rares poxvirus à ne pas être amplifiable en culture cellulaire. La couverture des lésions et une hygiène des mains après le contact avec ces lésions sont des mesures efficaces pour prévenir la propagation du virus. Des traitements locaux peuvent être proposés (Damon, 2007).

A.3. Poxvirus et immunologie

La réponse immunitaire aux infections chez les mammifères fait appel à deux lignes de défense successives : l'immunité dite innée en première ligne sera nécessaire au développement de la réponse adaptative en seconde ligne.

A.3.1. Les principaux composants du système immunitaire et leurs interactions avec VACV.

A.3.1.1. Les cellules de l'immunité innée

Les cellules de l'immunité innée, en première ligne suite à l'infection par un organisme pathogène, sont nécessaires pour sa détection, son élimination et la mise en place d'une réponse immune adaptative.

A.3.1.1.1. Les polynucléaires neutrophiles (PNN)

Leucocytes granulaires d'origine myéloïde, ces cellules sont impliquées dans divers processus inflammatoires. Parmi les premières cellules à être recrutées au site de l'infection en réponse à la production d'interleukine (IL)-8 et d'interféron (IFN)- γ , les PNN permettent le recrutement d'autres cellules du système immunitaire en produisant une quantité importante de cytokines. Ils peuvent éliminer les pathogènes soit par phagocytose, soit par la libération de leurs granules qui contiennent des composés antimicrobiens (défensine, cathepsins) (Segal, 2005), soit par la production de filets de chromatine et de protéases (neutrophil extracellular traps : NETs). Suite à l'infection par VACV, les PNN auraient la capacité de phagocyter les virions (West *et al.*, 1987). Les protéines A46 et A52 de VACV inhiberaient l'action pro-inflammatoire de l'élastase qui est sécrétée par les PNN (Carroll *et al.*, 2005).

A.3.1.1.2. Les macrophages

Leucocytes d'origine myéloïde, ils dérivent de précurseurs monocytes infiltrés (Curtis & Kaltreider, 1989). Ils représenteraient 95% des cellules phagocytaires résidant dans les poumons et les voies respiratoires. Ces cellules peuvent phagocyter directement les pathogènes ou les cellules infectées par les pathogènes et jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigène (CPA) aux lymphocytes T. Elles produisent de grandes quantités d'IFN et de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 et TNF- α). Les macrophages présentent les antigènes de VACV aux lymphocytes T dans les deux heures qui suivent l'infection (Ramirez

& Sigal, 2002) et leur rôle protecteur dans l'infection à VACV a été suggéré (Rivera *et al.*, 2007).

A.3.1.1.3. Les cellules dendritiques

Comme les macrophages, ce sont des cellules dont le rôle majeur est la présentation des antigènes aux lymphocytes T CD4 et CD8 via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) II et I, respectivement. Du fait de leur fonction sentinelle, on les trouve dans différents tissus tels la peau, les voies respiratoires, le système digestif. Cette présentation de l'antigène est possible après la phagocytose des pathogènes ou des cellules infectées et la migration des cellules dendritiques, ainsi activées, vers les ganglions lymphatiques où elles rencontreront les cellules de la réponse immunitaire adaptative. Les cellules dendritiques sont divisées en deux sous-types : les cellules dendritiques conventionnelles (cDC) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Les cellules dendritiques sont riches en TLR (toll like receptor) et produisent de grandes quantités d'interférons de type I, notamment en réponse à l'infection par VACV (Liu *et al.*, 2008; Yao *et al.*, 2007).

A.3.1.1.4. Les cellules NK (*natural killer*)

Leucocytes granulaires d'origine lymphoïde, les cellules NK jouent un rôle important dans la réponse immune, en particulier contre les virus, bien avant que la réponse adaptative, qu'elles permettent, ne se mette en place. Leur premier mode d'action va être la sécrétion d'INF- γ qui va à la fois provoquer un état antiviral chez les cellules avoisinantes mais également stimuler les macrophages à phagocyter les cellules infectées. Le second mode d'action implique la libération de granules cytoplasmiques par les cellules NK devant l'absence de présentation de molécules du CMH de classe I par la cellule infectée. Ces granules contiennent des composés appelés perforines qui s'insèrent dans les membranes lipidiques. Ils contiennent également des composés appelés granzymes, qui après passage à travers les pores formés par les perforines, provoqueront l'apoptose des cellules infectées (Vivier *et al.*, 2008). Suite à l'injection intradermique de VACV, les cellules NK sont recrutées au site de l'infection (Jacobs *et al.*, 2006). Leur rôle protecteur dans le contrôle de l'infection à VACV a également été suggéré par le fait que des souris dépourvues de ces cellules étaient bien plus sensibles à l'inoculation du virus (Bukowski *et al.*, 1983).

A.3.1.2. Les cellules de l'immunité adaptative

En réponse à une infection, l'immunité adaptative, spécifique du pathogène, facilitera sa clairance et conduira à la constitution d'une mémoire immune qui permettra une réponse rapide en cas de réinfection par ce même pathogène. Elle nécessite le recrutement et l'activation des lymphocytes B et T qui seront spécifiques des antigènes de l'agent infectieux.

A.3.1.2.1. Les lymphocytes T

La réponse immune cellulaire correspond à l'activation de lymphocytes qui ont à leurs surfaces un récepteur unique appelé le récepteur des cellules T (TCR). Ce récepteur est le fruit d'une recombinaison des segments VDJ.

A.3.1.2.1.1. Les lymphocytes T cytotoxiques :

Ils sont caractérisés par l'expression à leur surface du marqueur CD8. Ils reconnaissent les antigènes présentés par les molécules du CMH de classe I et sont capables de tuer les cellules infectées par des virus de façon spécifique. Ces cellules sont également impliquées dans l'élimination de cellules tumorales.

A.3.1.2.1.2. Les lymphocytes T helper :

Ils sont caractérisés par l'expression à leurs surfaces du marqueur CD4. Ils reconnaissent les antigènes présentés par les molécules du CMH de classe II. Ces lymphocytes doivent leur nom au fait qu'ils assistent d'autres cellules de la réponse immunitaire. Ils sont divisés en plusieurs sous-groupes. Les lymphocytes Th1 secrètent de l'IFN- γ et du TNF- β (tumor necrosis factor- β) qui activent les lymphocytes T cytotoxiques et les macrophages. La sécrétion d'IL-4, -5, -6, -10 et -13 par les lymphocytes Th2 stimule la prolifération des lymphocytes B ainsi que leur maturation. Les lymphocytes Th17 en produisant l'IL-17 sont impliqués dans le contrôle des infections par les organismes extracellulaires (McGeachy & Cua, 2008). Les lymphocytes T régulateurs contribuent au maintien d'une tolérance immune et à la résolution des réponses immunes (Rudensky, 2011). La persistance longtemps après l'infection de lymphocytes T mémoires, qui se diviseront rapidement si une nouvelle rencontre avec l'agent infectieux avait lieu, participe de la mémoire immunitaire offrant une réponse spécifique et rapide.

A.3.1.2.2. Les lymphocytes B

Acteurs principaux de la réponse immunitaire humorale, ils produiront les anticorps spécifiques contre l'agent infectieux. Ils possèdent à leurs surfaces un récepteur unique appelé le récepteur des cellules B (BCR) qui est une immunoglobuline spécifique liée à la

membrane. Cette immunoglobuline est composée de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères. Une région variable est responsable de la spécificité antigénique et est générée par recombinaison des gènes VDJ. Après avoir rencontré l'antigène complémentaire, le lymphocyte B se différenciera en plasmocyte, qui sécrètera les anticorps, ou en cellule B mémoire. Cette différenciation nécessite le concours des lymphocytes T helper. Les anticorps sont regroupés en cinq isotypes : IgM, IgG, IgA, IgD et IgE. Ils agiront soit en neutralisant le pathogène et donc son pouvoir infectieux, soit par opsonisation qui conduira à la phagocytose du pathogène, soit en activant la cascade du complément menant à la destruction de l'agent infectieux (Murphy, 2008).

A.3.1.3. Le complément

L'activation du complément par clivage protéolytique de zymogènes permet l'opsonisation et la destruction des pathogènes (Ricklin *et al.*, 2010). Il existe trois voies d'activation du complément qui permettent toutes la formation du complexe d'attaque membranaire. Ce complexe, en s'insérant dans les membranes des pathogènes ou des cellules infectées, entraînera leur lyse. La voie classique est activée quand le composé C1q se lie au complexe antigène-anticorps conduisant au clivage des protéines C4, C2 et C3. La voie alterne est la conséquence du clivage spontané de C3 à la surface des pathogènes. Enfin la reconnaissance des lectines sur la surface des pathogènes active la voie dite des lectines. L'infection à VACV provoque l'activation du complément par la voie alterne (Leddy *et al.*, 1977). Les IMV sont sensibles au complément en l'absence d'anticorps. Les EEV, eux, y sont insensibles en leur absence car la membrane supplémentaire de ces particules virales contient des protéines de l'hôte, CD55 et CD59, régulant l'action du complément (Vanderplasschen *et al.*, 1998). De plus, les cellules infectées par VACV secrètent une protéine de contrôle du complément (VCP, C21) qui, en se liant à C4b et C3b, accélérera leur dégradation, affectant ainsi les voies classique et alterne du complément (Isaacs *et al.*, 1992; Kotwal *et al.*, 1990; Kotwal & Moss, 1988).

A.3.1.4. Cytokines et chimiokines

A.3.1.4.1. Les cytokines proinflammatoires

La production de cytokines inflammatoires par les cellules immunitaires activées par les pathogènes permet la communication entre les composantes du système immunitaire et entre ce dernier et les autres systèmes de l'organisme. La famille de l'IL-1, le TNF- α et l'IL-6 sont les principales cytokines inflammatoires (Espinosa & Chillet, 2010).

Parmi la famille de l'IL-1, les formes actives de l'IL-1 et de l'IL-18 ne seront obtenues qu'après le clivage protéolytique de leurs précurseurs dans le cytoplasme. La caspase 1, composante de l'inflammasome (détaillé ultérieurement) est responsable du clivage de la pro-IL-1 et de la pro-IL-18. L'IL-1 β a été la première découverte. Comme l'IL-1 α , elle est produite par les cellules de la lignée monocyttaire et les mastocytes. Elle joue un rôle dans l'amplification de la réponse inflammatoire, dans l'activation des lymphocytes Th, dans l'expression par les cellules endothéliales de molécules d'adhérence pour les leucocytes et facilite la prolifération des lymphocytes B. Elle agit également sur le système nerveux central et est responsable de l'hyperthermie observée suite à une infection. Enfin, elle provoque la synthèse de protéines de la phase aiguë au niveau hépatique (Dinarello, 2006). L'IL-18 induit la production d'IFN- γ par les lymphocytes T (Gracie *et al.*, 2003). L'IL-1ra (IL-1 receptor antagonist) se fixe sur les récepteurs mais n'induit pas de signal, exerçant un rétrocontrôle négatif. L'IL-33, quant à elle, agit de manière prépondérante dans les infections parasitaires en stimulant les lymphocytes Th2.

Le TNF- α , sécrété par de nombreuses cellules du système immunitaire, en particulier les macrophages et les mastocytes, joue un rôle pléiotropique après liaison à ses récepteurs. Au niveau local, il induit l'expression de molécules d'adhérence et de chimiokines par les cellules endothéliales ; au niveau systémique, il agit sur le système nerveux central, induit la synthèse de protéines de la phase aiguë au niveau hépatique et stimule l'hématopoïèse. Cette cytokine inflammatoire est, entre autres, responsable du choc septique (Locksley *et al.*, 2001; Smith, 1994).

L'IL-6, responsable de l'amplification de la réponse inflammatoire en facilitant le recrutement de cellules immunitaires est produite par de nombreuses cellules (phagocytes, fibroblastes, cellules dendritiques, cellules endothéliales) et stimule la phagocytose.

A.3.1.4.1. Les cytokines proinflammatoires et vaccinica virus

L'équivalent de la protéine A53 du virus de la vaccine chez le virus Shope fibroma (virus rabbitpox) est un récepteur soluble du TNF qui se lie au TNF- α et inhibe son action (Smith *et al.*, 1991a). De même B15 est un récepteur soluble et un inhibiteur de l'IL-1 (Alcami & Smith, 1992; Smith & Chan, 1991; Spriggs *et al.*, 1992). B15 est spécifique de l'IL-1 β . Ces travaux ont permis de conclure au rôle pyrogène majeur de l'IL-1 β lors de l'infection par le virus de la vaccine (Alcami & Smith, 1996). Ces récepteurs solubles ressemblent aux récepteurs naturels de la cellule mais ne possèdent pas de région transmembranaire ni de

domaine de transduction du signal. C12 en se liant à l'IL-18 inhibe son activité en l'empêchant de se lier à son récepteur, inhibant ainsi la production d'IFN- γ (Born *et al.*, 2000; Calderara *et al.*, 2001; Novick *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2000; Symons *et al.*, 2002).

A.3.1.4.2. Chimiokines

Petites molécules (8 à 13 kDa), ces cytokines aux propriétés chimiotactiques permettent de recruter les effecteurs de l'immunité innée au site de l'inflammation, la mise en place de la réponse adaptative et le recrutement de lymphocytes T en cas d'infection. Hors de ce contexte, elles jouent un rôle dans la maintenance de l'homéostasie du système immunitaire. Elles sont caractérisées par la présence de quatre résidus cystéine conservés qui assurent la formation de deux ponts disulfures intramoléculaires et sont classées en plusieurs sous-familles selon la position des deux premiers résidus cystéines : CC, CXC, CXXXXC (Bacon *et al.*, 2002). Les chimiokines sont sécrétées par de nombreuses cellules de manière induite ou constitutive. Elles peuvent se lier aux glycosaminoglycanes cellulaires ou de la matrice extracellulaire, permettant la constitution d'un gradient de concentration dont le rôle est majeur dans le chimiotactisme des leucocytes (Murphy, 2008). Les récepteurs aux chimiokines sont des récepteurs liés aux protéines G.

A.3.1.4.3. Chimiokines et virus de la vaccine

vCCI (viral CC chemokine inhibitor) est une protéine exprimée par de nombreux poxvirus et est sécrétée par les cellules infectées (Alcami *et al.*, 1998; Graham *et al.*, 1997; Lalani & McFadden, 1997; Smith *et al.*, 1997). Cette protéine se lie à CCL2, CCL3, CCL5 et CCL11 (Seet *et al.*, 2001) et prévient le recrutement des cellules inflammatoires au site de l'infection à VACV. La protéine A41 de VACV partage des similarités avec vCCI et inhibe la liaison des chimiokines aux glycosaminoglycanes de la matrice extracellulaire, empêchant ainsi la formation du gradient nécessaire aux recrutements de cellules immunitaires. Elle se lie aux chimiokines CCL21, CCL25, CCL26 et CCL28 et fut décrite comme un facteur de virulence *in vivo* (Bahar *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2001).

A.3.1.5. La détection des pathogènes

Le déclenchement de la réponse immunitaire innée à une infection met en jeu deux composants essentiels. Le premier est propre aux pathogènes qui expriment des motifs moléculaires conservés caractéristiques appelés PAMP (pathogen associated molecular pattern). Les ADN et ARN viraux, simple et double brin, sont les PAMP majeurs associés aux virus. De manière générale, les PAMP sont reconnus par les PRR (pattern recognition

receptors), codés par des gènes n'ayant pas subi de modifications suite à des remaniements somatiques, c'est-à-dire en configuration germinale (Janeway, 1989; Medzhitov, 2009). La détection des pathogènes par les PRR conduira à la transduction d'un signal cellulaire qui *in fine* activera des facteurs de transcriptions majeurs que sont NF- κ B (nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells), IRF (interferon regulatory factor) et AP-1 (activating protein 1) (Takeuchi & Akira, 2010). Ces facteurs de transcription activent la transcription de cytokines pro-inflammatoires et d'interférons de type I. Parmi ces PRR, on distingue plusieurs familles impliquées dans la réponse immune aux virus.

A.3.1.5.1. Les Toll-like receptors: TLR

Au nombre de 10 chez l'homme, les cellules qui en expriment le plus sont les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. Ils sont également retrouvés chez tous les leucocytes ainsi que chez les cellules épithéliales et endothéliales. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires de type I possédant un domaine extracytoplasmique de reconnaissance des PAMP. Ce domaine en forme de crosse contient des motifs répétés riches en leucine (LRR) et est responsable de la dimérisation du récepteur suite à la détection des PAMP. En outre, ils possèdent un domaine intracytoplasmique de transduction du signal (TIR : toll interleukin 1 receptor) qui recrutera des molécules adaptatrices après dimérisation (Kawai & Akira, 2010). Les TLR 1, 2, 4, 5 et 6 sont exprimés à la surface de la cellule alors que les TLR 3, 7, 8 et 9 sont exprimés exclusivement au niveau des endosomes. Ces derniers sont responsables de la détection des acides nucléiques des pathogènes, en particulier des virus (Kumar *et al.*, 2011). Les TLR 3 détectent les ARN viraux double brin, les TLR 7 et 8 détectent les ARN viraux simple brin et les TLR 9 les ADN viraux. Bien que composé d'un génome à ADN, le virus de la vaccine peut être détecté par les TLR 3 du fait de la production d'ARN double brin au cours de la transcription.

A.3.1.5.2. Les RIG-I (retinoic acid inducible gene-I) like receptors: RLR

Protéines solubles cytoplasmiques contenant un domaine DExD/H à activité hélicase, nécessaire à la détection du ligand, RIG-I, MDA-5 (melanoma differentiation associated protein 5) et LGP2 (laboratory of genetics and physiology 2) reconnaissent les ARN viraux et induisent l'activation des voies NF- κ B et IRF (Andrejeva *et al.*, 2004; Rothenfusser *et al.*, 2005; Yoneyama *et al.*, 2004). RIG-I et MDA-5 possèdent également un domaine CARD (caspase activation and recruitment domain) dans leur région N-terminale qui leur permettra, après activation, d'interagir avec une protéine localisée au niveau des mitochondries et des

peroxyosomes appelée MAVS (mitochondrial antiviral signalling adaptor). MAVS également connue sous les noms IPS-1 (IFN- β promoter stimulator-1) (Kumar *et al.*, 2006), Cardif (caspase recruitment domain adaptor inducing IFN- β) (Meylan *et al.*, 2005) et VISA (virus-induced signalling adaptor) (Xu *et al.*, 2005) contient un domaine d'interaction CARD (Seth *et al.*, 2005). RIG-I reconnaît les ARN simple et double brin viraux caractérisés par la présence de trois groupes phosphates à leur extrémité 5' (Hornung *et al.*, 2006; Pichlmair *et al.*, 2006). Elle reconnaît aussi les ARN qui, s'étant repliés sur eux-mêmes à leurs extrémités 5', présentent une forme en boucle caractéristique (Schlee *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2009). MDA-5 détectent les ARN viraux double brin produits en grande quantité lors des cycles de réplication virale, aussi bien des virus à ARN qu'à ADN (Gitlin *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2006). Il a été montré que MDA-5 reconnaissait des molécules d'ARN plus longues que RIG-I (Kato *et al.*, 2008). Le rôle de LGP2 n'est pas clair. Dépourvu de domaine CARD, elle a d'abord été considérée comme un régulateur négatif de RIG-I et MDA-5 (Rothenfusser *et al.*, 2005), incapable d'engendrer une transduction du signal. Cependant un rôle positif dans cette transduction pourrait exister (Sato *et al.*, 2010). Les ARN cellulaires ne seront pas reconnus par les RLR du fait de leur guanosine méthylée en 7 (cap) et de la présence d'un seul phosphate à leur extrémité 5'.

A.3.1.5.3. Les NOD (nucleotide- binding oligomerisation domain-containing protein) like receptors: NLR

Protéines cytoplasmiques solubles, les NLR, au nombre de 23 chez l'homme, reconnaissent un nombre important de ligands, qu'il s'agisse de PAMP ou de DAMP (damage-associated molecular pattern). Leur structure comprend trois domaines. La région C-terminale, impliquée dans la reconnaissance des ligands, est composée de plusieurs LRR ; leur partie N-terminale est constituée par un motif CARD pour les NOD et NLRC4 ou un domaine pyrin (PYD) pour les NLRP. La partie intermédiaire, nécessaire à l'oligomérisation induite par la détection de ligands, est appelée NACHT (nucleotide-binding and oligomerisation). Suite à leur activation, ces détecteurs vont activer la voie NF- κ B, la voie des MAP (mitogen-activated protein) kinases ou permettre la formation d'un complexe multi-protéique appelé inflammasome. Le rôle de ce dernier sera de permettre la maturation de cytokines pro-inflammatoires en cytokines inflammatoires, notamment l'IL-1 β , l'IL-18 et l'IL-33. NOD1 et NOD2 permettent la détection de pathogènes bactériens (McDonald *et al.*, 2005) ou parasites comme *Toxoplasma gondii* (Shaw *et al.*, 2009) ou de virus à ARN simple brin. Ils

activent les voies NF- κ B et des MAP kinases suite à l'engagement de la protéine adaptatrice RIP2 (receptor interacting protein 2) par interaction de leurs domaines CARD respectifs (Park *et al.*, 2007b). NLRC4, NLRP1 et NLRP3, suite à la détection d'un signal de danger ou d'un pathogène, conduiront à la formation de l'inflammasome. L'inflammasome NLRP3 est le mieux étudié. Il joue un rôle important dans les macrophages et les cellules dendritiques et est composé par NLRP3, ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) et la pro-caspase 1 (Martinon *et al.*, 2002). Suite à la reconnaissance du ligand, grâce à des interactions PYD-PYD, des molécules NLRP3 vont former des oligomères et recruter ASC. Le domaine CARD de ASC va ensuite interagir avec le domaine CARD de la pro-caspase 1 qui sera clivée en caspase 1. La caspase 1 sera responsable par clivage protéolytique de la maturation de zymogènes appartenant à la famille des IL-1. Cet inflammasome peut être activé par des virus (Barlan *et al.*, 2011), des bactéries (Muruve *et al.*, 2008), des DAMP comme l'acide urique (Martinon *et al.*, 2002) ou des adjuvants vaccinaux (Hornung *et al.*, 2008). Le virus de la vaccine active l'inflammasome AIM2 (absent in melanoma 2) par la liaison de AIM2 à de l'ADN cytoplasmique viral (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2010; Hornung *et al.*, 2009; Rathinam *et al.*, 2010; Roberts *et al.*, 2009) conduisant à l'activation de la caspase 1. L'inflammasome NLRP1 détecterait également VACV (Gerlic *et al.*, 2013). L'activation des inflammasomes peut conduire à un type de mort cellulaire appelée pyroptose. Cet aspect sera détaillé ultérieurement.

A.3.1.5.4. Les détecteurs d'ADN cytoplasmique

La découverte et la caractérisation de mécanismes capables de détecter l'ADN cytoplasmique est plus récente que celles concernant la détection des ARN. Encore actuellement, les études sur ce sujet sont intenses et le champ à explorer reste important. En 2006, deux équipes ont montré de manière indépendante l'induction de la production d'IFN de type I suite à la transfection d'ADN (Ishii *et al.*, 2006; Stetson & Medzhitov, 2006). En 2007, DAI (DNA-dependent activator of IFN) a été décrite comme le détecteur responsable de l'activation IRF3 dépendante de l'ADN (Takaoka *et al.*, 2007). Cette observation a été mise en doute par des études *in vitro* et *in vivo* qui ont montré que DAI n'était pas indispensable pour activer le système immunitaire dans ce contexte (Ishii *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008b), laissant penser à l'existence d'autres détecteurs. Si AIM2 a clairement été démontré comme capital dans l'activation de l'inflammasome en réponse à de l'ADN étranger, aussi bien viral (cytomégalovirus murin et VACV) que bactérien (*Francisella tularensis*) (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2010; Rathinam *et al.*, 2010), son absence n'empêchait pas l'activation de

IRF3. L'ARN polymérase III a, elle aussi, été suggérée comme étant un détecteur de l'ADN capable d'induire une production d'interféron. La transcription d'ADN riche en séquence A-T en ARN riche en séquence A-U contenant un groupement triphosphate en 5' par cette polymérase permet l'activation ultérieure de RIG-I (Ablasser *et al.*, 2009; Chiu *et al.*, 2009). Devant l'absence de confirmation de son rôle *in vivo* et devant le fait que de l'ADN ne contenant pas de séquences riches en A-T, et donc incapable d'être transcrit par l'ARN polymérase III, active la voie IRF3, l'existence d'autres mécanismes de détection a été supposée. En 2010 (Yang *et al.*, 2010), LRRFIP1 (leucine rich repeat flightless interacting protein 1) a été caractérisée comme un détecteur d'ADN (*Listeria monocytogenes*) et d'ARN (Vesicular stomatitis virus, VSV) capable d'activer la voie des β -caténines chez les macrophages. Toujours en 2010, il a été montré qu'IFI16 (interferon induced 16) pouvait activer la voie IRF3 en réponse à un stimulus ADN (Unterholzner *et al.*, 2010). IFI16 et AIM2 partagent des similarités et IFI16 a en effet la capacité d'activer l'inflammasome en réponse à une infection par HHV-8 (Human herpes virus 8) (Kerur *et al.*, 2011). Il est suggéré que AIM2 détecterait l'ADN dans le cytoplasme quand IFI16 le détecterait dans le noyau (Rathinam *et al.*, 2010). DNA-PKcs (DNA-protein kinase catalytic subunit) a été décrite comme un détecteur d'ADN cytoplasmique chez les fibroblastes murins embryonnaires et les fibroblastes adultes de la peau. L'activation de IRF3 suite à cette détection est dépendante de STING (stimulator of IFN genes) (Ferguson *et al.*, 2012). STING, considérée comme une molécule adaptatrice, localisée dans le réticulum endoplasmique, est essentielle pour l'induction de cytokines et d'IFN en réponse à un stimulus ADN cytoplasmique. Elle active TBK1 (TANK binding kinase 1) qui activera IRF3 (Ishikawa & Barber, 2008; Zhong *et al.*, 2008). Récemment, une avancée importante a été réalisée par la description d'une nouvelle molécule détectrice d'ADN qui active STING : cGAS (cyclic-GMP-AMP (cGAMP) synthase). cGAMP, un dinucléotide cyclique, a été décrit comme un second messenger capable de se lier à STING et de l'activer pour induire la production d'IFN de type I. cGAMP est produit suite à la transfection d'ADN ou l'infection par des virus à ADN (Wu *et al.*, 2013) par un détecteur cytosolique de l'ADN, cGAS (Sun *et al.*, 2013). cGAMP, premier dinucléotide cyclique trouvé chez les mammifères, possède deux liaisons phosphodiester : la première entre le groupe hydroxyle en 2' du GMP (guanosine monophosphate) et le phosphate en 5' de l'AMP (adenosine monophosphate) ; la seconde entre le groupe hydroxyle en 3' de l'AMP et le phosphate en 5' du GMP (Ablasser *et al.*, 2013; Diner *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2013a; Gao *et al.*, 2013b; Zhang *et al.*, 2013). cGAS/cGAMP est probablement un point de convergence à toute détection de l'ADN

cytosolique. En effet, il a été montré que cGAS, exprimée majoritairement dans le cytosol, liait directement le squelette ribose-phosphate de l'ADN et que des mutations dans cGAS abolissant cette liaison, ou bien d'autres mutations supprimant son activité catalytique sans supprimer sa capacité de liaison à l'ADN, supprimaient également la production d'IFN en réponse à un stimulus ADN. La synthèse de cGAMP par cGAS n'arrive qu'en présence d'ADN et la surexpression de cGAS ne peut induire la production d'IFN qu'en présence de STING. Enfin, des cellules dérivées de souris mutantes déficientes pour cGAS sont incapables de produire l'IFN en réponse à un stimulus ADN (Civril *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2013a; Li *et al.*, 2013a; Li *et al.*, 2013b; Sun *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014). Il est fort probable que les virus aient développé des mécanismes pour contrer ce système de défense et ce domaine de recherche est actuellement en effervescence (Cai *et al.*, 2014a).

A.3.2. Les principales voies activées suite à la détection de pathogène

Suite à la détection de pathogènes par les PRR, la transduction du signal conduit à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B, IRF3 et IRF7 et AP-1. Après translocation dans le noyau, ils activeront la transcription des gènes codant pour les IFN (en particulier l'IFN- β), les cytokines et les chimiokines. IRF3, NF- κ B et AP-1 forment un complexe appelé enhanceosome qui se liera au promoteur de l'IFN- β et activera sa transcription.

A.3.2.1. La voie d'activation de NF- κ B

Le facteur de transcription NF- κ B tire son nom de sa liaison à un motif enhancer du gène de la chaîne légère kappa des lymphocytes B (Sen & Baltimore, 1986a; b). Son activation est consécutive à l'activation des récepteurs au TNF- α et des récepteurs à l'IL-1, à la détection de pathogènes par les TLRs, les RLRs et quelques NLRs, à l'activation des molécules détectrices d'ADN. Il joue un rôle clef dans la réponse immune en entraînant la production de molécules pro-inflammatoires. NF- κ B est un terme générique qui regroupe les facteurs de transcription composés par p65 (ou RelA), c-Rel, RelB, p50 et p52. Ils s'associent en hétérodimères via leurs domaines d'homologie Rel (RHD) présents à leurs extrémités C-terminales: p65 avec p50, cRel avec p50 et RelB avec p52 (Vallabhapurapu & Karin, 2009). NF- κ B est retenu dans le cytoplasme par l'inhibiteur kappa B alpha (I κ B α) dont la dégradation sera nécessaire pour que NF- κ B rejoigne le noyau grâce à des séquences de localisation nucléaire (NLS). Cette dégradation est consécutive à la phosphorylation sur les sérines 32 et 36 de I κ B α par le complexe IKK (inhibitors of the κ B kinase) composé par IKK α , IKK β et IKK γ (ce dernier étant aussi appelé NEMO : NF- κ B essential modulator).

Cette phosphorylation entraîne la polyubiquitination de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ par l'ubiquitine ligase $\text{SCF}^{\beta\text{TrCP}}$ (S phase kinase-associated protein 1 (SKP1)-cullin 1-F-box protein containing β -transducin repeat-containing protein) et sa dégradation par le protéasome. L'activation du complexe IKK est un point convergent à différentes voies d'activation de NF- κ B.

A.3.2.1.1. La voie dépendante de MyD88

Elle concerne les voies en aval du récepteur à l'IL1 et de tous les TLR sauf le TLR3. MyD88 recrute une famille de protéines appelées IRAK (IL-1R-associated kinase). MyD88 recrute d'abord IRAK4 qui recrutera et activera à son tour IRAK1 et IRAK2. Ce complexe activé interagit alors avec l'enzyme E3 ubiquitine ligase TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) et l'enzyme de conjugaison d'ubiquitine E2 (UBC13 : ubiquitin conjugating enzyme 13) qui par formation d'une chaîne de molécules d'ubiquitines reliées par leurs lysines en position 63 permettront le recrutement du complexe TAK1 (TGF- β activating kinase 1). Ce complexe est formé par TAK1 et des protéines adaptatrices TAB2 et TAB3 (Kanayama *et al.*, 2004). La chaîne d'ubiquitines reliées par leurs lysines en position 63 fournira les ubiquitines nécessaires à LUBAC (Linear ubiquitin assembly complex) qui avec l'enzyme de conjugaison d'ubiquitine E2 (UBCH7) permettront la synthèse d'une chaîne hybride contenant des molécules d'ubiquitine à la fois reliées par leurs lysine en position 63 et leur méthionine en position 1. Cette chaîne hybride permettra le recrutement du complexe IKK et sa proximité avec TAK1 qui, finalement, sera responsable de l'activation du complexe IKK (Clark *et al.*, 2013).

A.3.2.1.2. La voie des TLR 3 et 4

TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing IFN- β) interagit directement (TLR3) (Oshiumi *et al.*, 2003a) ou indirectement via TRAM (TRIF related adaptor molecule) pour le TLR4 (Oshiumi *et al.*, 2003b) avec le domaine TIR de ces TLR. Consécutivement au recrutement de TRAF6, RIP1 et TRADD (TNF receptor type 1-associated death domain protein) (Meylan *et al.*, 2004), TRIF sera polyubiquitiné (lysines en position 63) et activera à son tour le complexe TAK1 qui conduira à l'activation du complexe IKK.

A.3.2.1.3. La voie du récepteur au TNF

La molécule TRAF2 sera recrutée en aval du récepteur au TNF via une molécule adaptatrice TRADD. L'activation de RIP1 permettra l'activation du complexe TAK1 et consécutivement du complexe IKK (détaillée dans la partie sur la mort cellulaire).

A.3.2.1.4. La voie des RLR

En aval de l'ARN polymérase 3, RIG-I ou MDA-5, la transduction du signal est assurée par MAVS qui via une interaction avec TRAF6 recrutera et activera le complexe IKK (Xu *et al.*, 2005).

A.3.2.1.5. VACV et inhibition de la voie NF- κ B

Plusieurs protéines produites par VACV inhibent l'activation de la voie NF- κ B (Smith *et al.*, 2013). Cette apparente redondance *in vitro* n'est pas observée *in vivo*. Une atténuation de la virulence du virus est en effet observée suite à l'infection par VACV dont ces gènes ont été supprimés individuellement (Bowie & Unterholzner, 2008). Parmi les inhibiteurs de la voie NF- κ B qui adoptent un repliement de type Bcl-2, B14 se lie à IKK β (Chen *et al.*, 2008), N1 interagirait avec le complexe IKK (DiPerna *et al.*, 2004) mais ces données n'ont pu être reproduites et il semblerait que cette inhibition ait lieu au niveau de TAK1 (Chen *et al.*, 2008), A52 et K7 interagissent avec IRAK2 et TRAF6 (Keating *et al.*, 2007; Oda *et al.*, 2009; Schroder *et al.*, 2008). A46 interagit avec plusieurs protéines contenant un domaine TIR comme MyD88, TRIF, TRAM, inhibant la voie NF- κ B en aval de plusieurs TLR. Il est intéressant de préciser que A46, A52 et K7 inhibent l'activation de NF- κ B par la voie des TLR ou de l'IL-1 mais pas par celle du TNF- α . Récemment il a été montré que A49 inhibait la dégradation par le protéasome de I κ B α en se liant à β -TrCP (Mansur *et al.*, 2013; Sumner *et al.*, 2014) et que C4 inhibait NF- κ B au niveau ou en aval du complexe IKK (Ember *et al.*, 2012). Il a également été rapporté que les protéines K1 et M2 inhibaient la voie NF- κ B mais les mécanismes d'action restent à préciser (Gedey *et al.*, 2006; Shisler & Jin, 2004). (Figure 3).

A.3.2.2. La voie d'activation des IRF

Les facteurs de transcription IRF3 et IRF7 jouent un rôle majeur dans l'induction de l'expression d'interféron de type I en réponse à une infection virale. IRF3 est considéré comme l'acteur principal lors de la première vague de production d'interféron- β (Taniguchi *et al.*, 2001). Leur activation a lieu en aval de différents PRR comme RIG-I, MDA-5, TLR3, TLR4 et des molécules détectrices d'ADN cytoplasmique. L'expression de IRF3 est constitutive et élevée dans la plupart des cellules permettant une action rapide en réponse à une infection. IRF7, en revanche, est seulement détecté après expression des gènes stimulés par IRF3 (Sato *et al.*, 2000; Taniguchi & Takaoka, 2002) hormis dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Gilliet *et al.*, 2008). La translocation de IRF3 et IRF7 dans le noyau cellulaire en réponse à un stimulus est possible grâce à leurs séquences de localisation nucléaire.

A.3.2.2.1. Le complexe IKK non canonique

De la même manière que le complexe IKK va phosphoryler I κ B α et permettre la translocation de NF- κ B, le complexe IKK non canonique, formé par TBK1 et IKK ϵ (Fitzgerald *et al.*, 2003; Hemmi *et al.*, 2004; Perry *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2003), une fois activé, va pouvoir phosphoryler IRF3 en de multiples endroits. Cela aura pour conséquence de lever une autoinhibition qui permettra la phosphorylation des sérines en positions 386 (Mori *et al.*, 2004) et 396 (Servant *et al.*, 2003). Ces dernières phosphorylations entraîneront la dimérisation de IRF3 et la translocation dans le noyau de ce facteur de transcription (Mori *et al.*, 2004; Panne *et al.*, 2007). Dans ce processus, il semblerait que TBK1 ait un rôle plus important que IKK ϵ (Matsui *et al.*, 2006; McWhirter *et al.*, 2004). Le changement de conformation laissera apparaître un domaine de liaison à l'ADN nécessaire pour promouvoir la transcription des gènes dépendant du promoteur IRF3. Le dimère de IRF3 s'associera avec la protéine CBP (cAMP response element binding protein (CREB) binding protein) et p300 ce qui empêchera son export du cytoplasme vers le noyau (Lin *et al.*, 1999). TRAF3, que ce soit en aval des TLR3 et TLR4 via la protéine adaptatrice TRIF (Oganesyan *et al.*, 2006), de MAVS après stimulation des RLR (Saha *et al.*, 2006) ou de STING en réponse à la présence d'ADN cytosolique (Ishikawa *et al.*, 2009), permet le recrutement et l'activation du complexe IKK non canonique. Le recrutement de protéines adaptatrices sera nécessaire en aval de TRAF3 : NAP1 (NF- κ B activation kinase associated protein 1) (Fujita *et al.*, 2003), SINTBAD (similar to NAP1 TBK1 adaptor) (Ryzhakov & Randow, 2007), TANK (TRAF

family member associated NF- κ B activator) (Pomerantz & Baltimore, 1999) et DDX3 (Dead box protein 3) (Soulat *et al.*, 2008).

A.3.2.2.2. VACV et inhibition de la voie d'activation IRF3

Plusieurs protéines dont l'expression est précoce durant le cycle viral jouent un rôle dans l'inhibition de la voie d'activation IRF3. A46 en interagissant avec TRIF inhibe cette activation en aval des TLR3 et TLR4 (Stack *et al.*, 2005). K7 se lie à DDX3 (Schroder *et al.*, 2008), C16 inhibe la détection cytosolique de l'ADN par DNA-PK (Fahy *et al.*, 2008; Peters *et al.*, 2013) et E3 peut, par sa partie C-terminale, séquestrer l'ARN double brin produit durant l'infection virale et par sa partie N-terminale inhiber l'activation de DAI (Wang *et al.*, 2008b). C6 inhibe l'activation de IRF3 en se liant aux protéines adaptatrices en amont de TBK1 (Unterholzner *et al.*, 2011). (Figure 4).

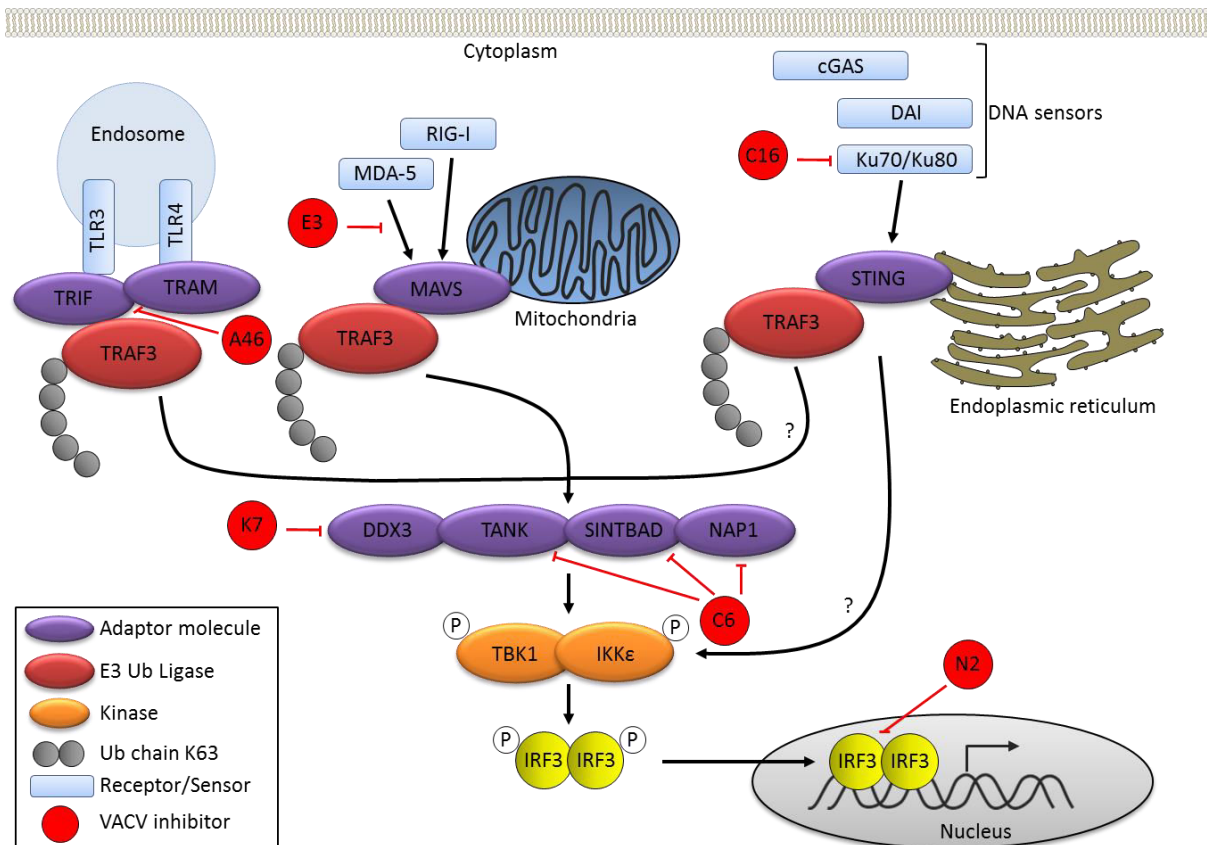


Figure 4 : Les voies des IRF et leurs inhibitions par les protéines du virus de la vaccine (adapté de Smith *et al.*, 2013).

A.3.2.3. La voie d'activation d'AP-1 : la voie des MAP kinases.

AP-1 est un facteur de transcription formé par l'association hétérodimérique des molécules ATF2 (activating transcription factor 2) et c-Jun. Il est activé par une cascade de phosphorylations en aval des PRR et promeut la transcription d'IFN- β . Cette cascade de phosphorylations est caractérisée par trois niveaux ordonnés de phosphorylations successives. Les MAP kinases représentent une famille de kinases sérine/thréonine qui nécessitent d'être phosphorylées pour être actives. Les MAP kinases (MAPK) vont être phosphorylées par les MAPK kinases (MAP2K), elles-mêmes phosphorylées par les MAP2K kinases (MAP3K). Les principales MAPK responsables de l'activation de AP-1 sont JNK (Jun N-terminal kinase), Erk1 et Erk2 (extracellular signal-regulated kinase 1 et 2) et p38. La plupart des études de l'activation de la voie des MAP kinases ont été réalisées en aval de l'activation des TLR. Comme mentionné précédemment, à l'exception de TLR3 qui recrute TRIF et TLR4 qui recrute soit TRIF soit MyD88, les TLR, comme le récepteur à l'IL-1, utilise MyD88 comme molécule adaptatrice suite à leur stimulation. MyD88 recrute IRAK4 qui formera un complexe avec IRAK1, IRAK2, TRAF6 (E3 ubiquitine ligase) et UBC13 (E2 ubiquitin conjugating enzyme). UBC13 et TRAF6 catalyse la formation d'une chaîne d'ubiquitines (liaison par la lysine 63) sur TRAF6 et IRAK1. TAB2 et TAB3 recrutent alors TAK1 vers TRAF6 polyubiquitiné, ce qui va déclencher l'activation des voies p38 α et JNK par TAK1. TAK1 joue alors le rôle d'une MAP3K activant p38 α et JNK via l'intermédiaire de MAP2K. TAK1 va également phosphoryler IKK β du complexe IKK (composé également d'IKK α et IKK γ). En plus d'activer la voie NF- κ B, cette phosphorylation va permettre la protéolyse du précurseur de NF- κ B, p105, dont l'inhibition sur TLP2 (tumor progression locus 2), une MAP3K, sera levée. Cette MAP3K activera les MAPK Erk1 et Erk2 via les MAP2K : MKK1 et MKK 2 (MAPK kinase 1 et 2). L'activation de la voie des MAPK semble nécessaire à la réplication du virus (Andrade *et al.*, 2004). Il a été montré que les protéines A52, B1 et O1 de VACV activaient cette voie (Santos *et al.*, 2006; Schweneker *et al.*, 2012; Stack *et al.*, 2013). La protéine M2, au contraire, semble l'inhiber au niveau de Erk2 (Gedey *et al.*, 2006). (Figure 5).

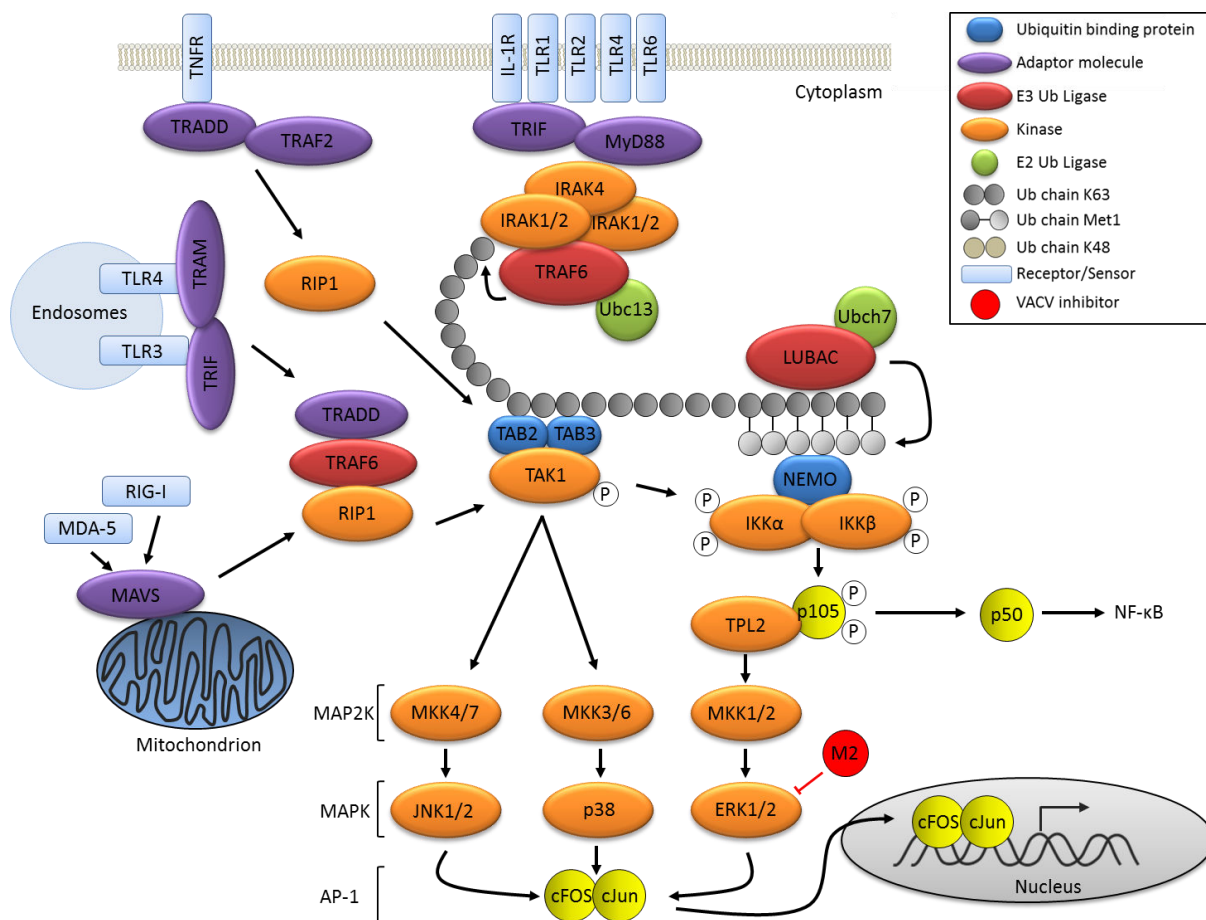


Figure 5 : Les voies des MAPK et leurs inhibitions par les protéines du virus de la vaccine (adapté de Clark *et al.*, 2013).

A.3.2.4. La voie des interférons : JAK/STAT

Les interférons sont des cytokines qui présentent des propriétés antivirales puissantes, conférant à la cellule un état antiviral permettant l'inhibition de la croissance virale. Originellement décrits par Isaacs et Lindenmann (Isaacs & Lindenmann, 1957; Isaacs *et al.*, 1957), ils tirent leur nom du fait que cette molécule soluble interfère avec la croissance virale du virus de la grippe. Les interférons sont présents chez les mammifères, les oiseaux et les poissons (Schultz *et al.*, 2004). Chez les mammifères, on distingue trois types d'interférons en fonction de leurs récepteurs à la surface des cellules.

A.3.2.4.1. Interférons de type I

Les IFN- α (13 sous-types chez l'homme) et l'IFN- β (un seul sous-type chez l'homme) sont les protéines les plus étudiées constituant les IFN de type I. Leur production, qui peut être observée dans la plupart des cellules, est induite par une infection virale. D'autres IFN, - δ , - ϵ , - κ , - τ , et - ω , appartiennent aux IFN de type I mais les IFN- δ et - τ , présents chez les porcs et les bovins, n'ont pas été décrits chez l'homme. Les récepteurs hétérodimériques des IFN- α/β (IFNAR) sont constitués de IFNAR1 et IFNAR2. IFNAR1 est physiquement associé à JAK1 (Janus activated kinase 1) et IFNAR2 à TYK2 (tyrosine kinase 2) du côté cytoplasmique. Suite à l'engagement des IFN de type I avec leurs récepteurs, la voie dite JAK/STAT est initiée. Un changement de conformation activera les kinases ce qui conduira à leur autophosphorylation et à la phosphorylation de STAT-1 et STAT-2 (signal transducer and activator of transcription 1 et 2) qui s'associeront alors en hétérodimères (Platanias, 2005; Randall & Goodbourn, 2008). Cette hétérodimérisation permet le recrutement de IRF-9 (IFN regulatory factor-9) formant le complexe appelé ISGF3 (IFN stimulated gene factor 3) (Horvath *et al.*, 1996; Martinez-Moczygemba *et al.*, 1997; Schindler & Darnell, 1995). ISGF3 est un facteur de transcription qui après translocation dans le noyau de la cellule activera la transcription des ISG (IFN stimulated genes) par liaison à une séquence d'acides nucléiques appelée ISRE (IFN stimulated response element) au niveau de leurs promoteurs.

A.3.2.4.2. Interféron de type II

L'IFN- γ est le seul représentant des IFN de type II. Il est produit par les lymphocytes T et les cellules NK activés. Son récepteur est constitué de sous-unités IFNGR1 et IFNGR2 (IFN gamma receptor 1 et 2) elle mêmes physiquement reliées à JAK1 et JAK2, respectivement. Après liaison de l'IFN- γ à son récepteur, JAK1 et JAK2 vont phosphoryler STAT-1 ce qui conduira à son homodimérisation. Cet homodimère est appelé GAF (IFN- γ activated factor) (Decker *et al.*, 1991) et après translocation dans le noyau, ce facteur de transcription activera les gènes ISG dont les promoteurs contiendront une séquence appelée GAS (IFN- γ activated sequence) (Lew *et al.*, 1991).

A.3.2.4.3. Interférons de type III

Décrit plus récemment, les interférons de type III regroupent les IFN- λ 1, - λ 2 et λ 3, également connus sous les noms IL-29, IL-28A et IL-28B. Comme les IFN de type I, les IFN de type III sont produits dans la plupart des cellules mais plus particulièrement les cellules épithéliales en réponse à une infection. Après liaison à leur récepteurs cellulaires hétérodimériques, constitués par IL-10R2 (IL-10 receptor 2) et IFNLR (IFN- λ receptor), la même voie

JAK/STAT que celle observée dans le cas des IFN de type I est déclenchée (Lew *et al.*, 1991; Meager *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2007). D'autre part, les IFN de type III pourraient également activer la voie des MAPK (Ank & Paludan, 2009).

A.3.2.4.4. Les gènes stimulés par l'interféron

La production d'interféron entraîne la transcription coordonnée de plusieurs centaines d'ISG. Les protéines codées par ces gènes peuvent avoir un impact direct sur la clairance virale, conférer un état antiviral à la cellule, amplifier l'immunité innée de la cellule ou faciliter la mise en place de la réponse adaptative. Parmi les molécules ayant une activité antivirale directe, nous pouvons citer la protéine kinase R (PKR : double strand RNA-activated protein kinase), la 2'-5' oligoadénylate synthétase (2'-5' OAS) et la molécule ISG15.

A.3.2.4.4.1. PKR :

Exprimée constitutivement dans la cellule, sa production va être amplifiée par l'IFN. Après liaison à de l'ARN double brin, elle va s'activer par dimérisation et autophosphorylation. La PKR active pourra phosphoryler eIF2 α (eucaryote translation initiation factor 2) entraînant ainsi l'inhibition de toute synthèse protéique cellulaire dont la synthèse des protéines virales (Balachandran *et al.*, 2000; Garcia *et al.*, 2006).

A.3.2.4.4.2. 2'-5' OAS :

Elle nécessite également sa liaison à de l'ARN double brin pour être activée et synthétiser des oligomères d'AMP liés par un pont phosphodiester en 2'-5' à partir d'ATP. Ces oligomères activeront ensuite la RNase L (latent ribonuclease) qui après dimérisation clivera les ARN simples brins cellulaires et viraux, inhibant ainsi la production de protéines (Silverman, 2007).

A.3.2.4.4.3. ISG15 :

Ressemblant à l'ubiquitine (ubiquitin-like protein), ISG15 va se conjuguer à un grand nombre de protéines dont IRF3, RIF-I, PKR et les stabiliser, empêchant leur dégradation et par conséquent amplifier et prolonger leurs actions (Lu *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2005).

A.3.2.4.5. VACV et interférons

L'importance des IFN de type I dans le contrôle de l'infection à VACV a été démontrée par l'augmentation de la mortalité de souris qui ne possédaient pas de récepteurs IFNAR (van den Broek *et al.*, 1995). De même, l'injection intrapéritonéale d'IFN de type I inhibe drastiquement la réplication virale après infection péritonéale (Rodriguez *et al.*, 1991). Les

interférons de type II jouent eux aussi un rôle important dans l'infection. En effet, l'administration d'anticorps anti-IFN- γ résulte en une mortalité accrue des souris infectées par le virus ectromélie appartenant à l'espèce mousepox, virus dont la souris est un hôte naturel (Karupiah *et al.*, 1993). Le rôle des IFN de type III est moins connu mais un effet protecteur suite à l'infection intranasale de souris par VACV exprimant des IFN- λ 2 ou λ 3 a été observé (Bartlett *et al.*, 2005).

Au cours de l'évolution, des stratégies d'évasion immune ciblant la voie des interférons ont été développées par les poxvirus, augmentant ainsi la virulence virale et soulignant leur rôle de ces molécules dans le contrôle de l'infection. La glycoprotéine B8 de VACV, qui ressemble par sa séquence aux IFNGR, est sécrétée et inhibe l'action des IFN- γ après liaison avec ceux-ci dans le milieu extracellulaire (Alcami & Smith, 1995). La protéine B18, appartenant à la super famille des immunoglobulines, est un récepteur « leurre » des interférons de type I, présente à la fois sur la membrane des cellules infectées et dans le milieu extracellulaire (Colamonici *et al.*, 1995; Symons *et al.*, 1995). La protéine H1 de VACV est une phosphatase qui déphosphoryle STAT-1 et STAT-2 empêchant ainsi la transduction du signal en réponse aux IFN. Elle est présente dans le virion et son action est donc immédiate après l'infection (Mann *et al.*, 2008; Najarro *et al.*, 2001). (Figure 6).

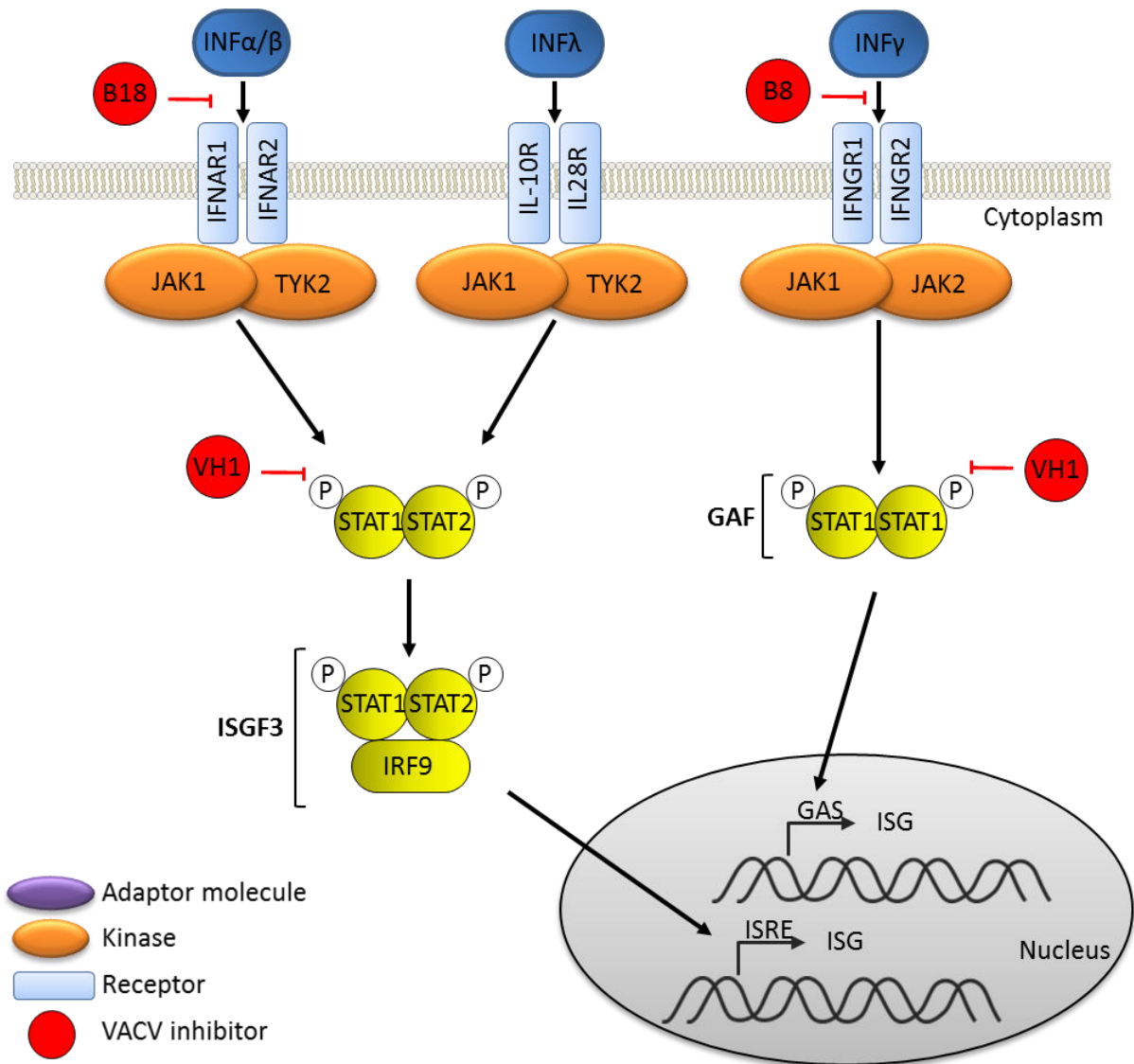


Figure 6: Les voies JAK/STAT et leurs inhibitions par les protéines du virus de la vaccine (adapté de Smith *et al.*, 2013).

A.4. Le virus de la vaccine : un outil pour étudier la mort cellulaire.

A.4.1. La mort cellulaire

A.4.1.1. Définition

Si la définition du vivant peut poser des problèmes notamment en ce qui concerne les virus, la définition de la mort de la cellule, unité de base du vivant (Galluzzi *et al.*, 2014a; Mazzaello, 1999), peut s'avérer également problématique. La perte définitive des fonctions vitales cellulaires est une définition de la mort cellulaire mais les critères qui permettent d'affirmer cet état définitif sont à préciser. En pratique, la mort cellulaire est avérée devant la disparition définitive de la perméabilité de la membrane plasmique ou devant la fragmentation complète de la cellule (Galluzzi *et al.*, 2014a).

A.4.1.2. La mort accidentelle

Elle survient lorsque la cellule subit des agressions externes extrêmes qui peuvent être physiques (variations de températures ou de pressions), chimiques (détergents, variations du pH) ou mécaniques (broyage, cisaillement). Cette mort est quasi immédiate et ne peut être prévenue par aucune intervention pharmacologique ou génétique et n'est donc pas l'objet d'une approche thérapeutique ciblée (Green & Kroemer, 2005).

A.4.1.3. La mort cellulaire régulée

Par contraste avec la mort accidentelle, la mort cellulaire régulée implique l'existence de mécanismes moléculaires précis qui la gouvernent et la possibilité d'interférer avec celle-ci par des interventions génétiques ou pharmacologiques. Cette mort cellulaire régulée peut être physiologique. Elle est observée, à grande échelle, dans le développement embryonnaire et également dans de multiples processus biologiques impliqués dans le maintien de l'homéostasie tissulaire ou la réponse immune par exemple (Delbridge *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2008). Cette entité de mort cellulaire régulée est appelée « mort cellulaire programmée » par opposition à la mort cellulaire régulée provoquée par la modification de l'environnement cellulaire et notamment l'infection par des pathogènes. Elle est la conséquence de l'incapacité cellulaire à rétablir l'homéostasie cellulaire suite à ces changements des conditions du milieu dans lequel évolue la cellule. La mort cellulaire régulée est souvent divisée en deux phases distinctes. La première phase dite « d'initiation » est celle qui activera

par transduction du signal la seconde phase dite « d'exécution » qui sera la phase effectrice responsable biochimiquement de la mort cellulaire.

A.4.2. Les différents types de mort cellulaire régulée

Les premières classifications de la mort cellulaire faisaient appel à des critères morphologiques. L'amélioration des techniques permettant la description biochimique de ces morts cellulaires régulées a permis d'affiner leurs définitions et de révéler une complexité plus importante qu'initialement entrevue. L'apoptose, la nécrose et la pyroptose représentent les morts cellulaires régulées les mieux définies et les mieux établies. L'autophagie est un mécanisme de protection de la cellule qui permet le maintien de l'homéostasie cellulaire, notamment en réponse à une diminution en nutriments. Sur des critères morphologiques, l'autophagie était décrite comme la mort cellulaire de type II, associée à une vacuolisation excessive du cytoplasme (Clarke, 1990; Schweichel & Merker, 1973). La mort cellulaire régulée par autophagie (ou macroautophagie) n'est pas clairement établie et l'autophagie excessive ou dérégulée semblerait être une conséquence d'autres morts cellulaires régulées, apoptose et nécrose, et non une cause directe. La mort régulée par autophagie a été observée dans des cellules déficientes pour l'apoptose (Bax $-/-$, BAK $-/-$) en réponse à des stimuli tels une altération de l'ADN ou le stress du réticulum endoplasmique mais des données physiologiques font toujours défaut (Degterev & Yuan, 2008; Shimizu *et al.*, 2004; Ullman *et al.*, 2008). L'autosis, décrite récemment, serait une forme de mort cellulaire régulée par autophagie mais ces conditions artificielles d'induction font débat (Liu & Levine, 2014; Munoz-Pinedo & Martin, 2014). Pour ces raisons, l'autophagie ne sera pas décrite dans ce travail comme un type de mort cellulaire régulée.

A.4.2.1. Apoptose

A.4.2.1.1. Définition

La description par Lockshin (Lockshin & Williams, 1965) en 1964 de la mort cellulaire programmée des cellules musculaires chez les papillons utilisés pour la production de soie a été un travail précurseur, suivi en 1972 par les travaux de Kerr, Wyllie et Currie qui ont pour la première fois utilisé le terme « apoptose », signifiant chute des feuilles en grec ancien, pour définir cette mort cellulaire programmée. L'apoptose joue un rôle physiologique fondamental dans le maintien de l'équilibre homéostatique entre la prolifération cellulaire et la disparition nécessaire de ces cellules. Ce mécanisme est impliqué dans le développement embryonnaire, le renouvellement des tissus cérébraux ou des cellules impliquées dans la réponse

inflammatoire, la cicatrisation, le vieillissement (Orrenius *et al.*, 2003). Sa dérégulation peut être à l'origine de proliférations cancéreuses et de maladies dégénératives (Alzheimer, Parkinson) (Norenberg & Rao, 2007). L'apoptose est également un moyen de défense contre les pathogènes, en particulier les virus (O'Brien, 1998; Tschopp *et al.*, 1998). L'élimination, par phagocytose, des corps apoptotiques néoformés, est une des raisons principales pour laquelle l'apoptose est considérée comme immunologiquement silencieuse (Bellamy *et al.*, 1995). La définition morphologique de l'apoptose comportait la réduction du volume cellulaire, la condensation de la chromatine en premier lieu au niveau de la membrane nucléaire (marginalisation) puis au niveau du noyau dans sa totalité (pyknosis) conduisant à sa fragmentation (karyorrhexis), l'altération minimale des autres organites, l'émergence de « bulles » (blebbing) au niveau de la membrane plasmique et la fragmentation de la cellule en corps apoptotiques ayant conservés l'intégrité membranaire (Kerr *et al.*, 1972). Cette mort cellulaire particulière est dite de type I et a longtemps été considérée comme le seul type de mort cellulaire régulée. Suite à l'amélioration des techniques, cette définition morphologique est apparue insuffisante, pouvant mener à la confusion. Il est désormais recommandé de s'appuyer sur des caractéristiques biochimiques pour définir le type de mort cellulaire régulée et en particulier l'apoptose. D'après les recommandations du NCCD (Nomenclature Committee on Cell Death), il est nécessaire, pour affiner la définition, d'associer ces caractéristiques biochimiques aux effets obtenus suite à l'utilisation de composés pharmacologiques ou à des interventions au niveau génétique. L'apoptose est ainsi définie comme une mort cellulaire régulée dépendante des caspases (cystein-dependent aspartate-specific acid proteases) entraînant l'activation des caspases effectrices 3, 6 et 7. Les caspases humaines et murines sont au nombre de 14 (Fan *et al.*, 2005) et représentent une famille de protéases extrêmement conservée. Par ailleurs, l'exposition de phosphatidylsérine sur la surface externe de la membrane plasmique est souvent associée à l'apoptose (Martin *et al.*, 1995) mais n'est pas observée dans tous les contextes (Segawa *et al.*, 2014). Il existe trois voies majeures conduisant à l'apoptose : la voie extrinsèque, la voie intrinsèque et la voie du granzyme B. Toutes les trois convergent et activent les caspases effectrices.

A.4.2.1.2. *Les caspases*

Les travaux sur *Caenorhabditis elegans* ont été les premiers à identifier et caractériser les caspases comme des cystéine-protéases jouant un rôle majeur dans la mort cellulaire (Ellis & Horvitz, 1986; Galluzzi *et al.*, 2014b; Yuan *et al.*, 1993; Yuan & Horvitz, 1990). Elles sont exprimées largement dans les tissus sous forme inactivée (zymogène) et peuvent, une fois activées, cliver les protéines au niveau des résidus acide aspartique, ce qui est une propriété peu répandue parmi les protéases. Les caspases pour être activées nécessitent ce clivage au niveau de leur propre résidu acide aspartique, et cette activation d'une première caspase entraîne alors une cascade d'activations d'autres caspases, dans un processus finement régulé prévenant le déclenchement aléatoire de l'apoptose (Nicholson, 1999; Slee *et al.*, 1999a). Les 12 caspases humaines partagent des similarités de séquence protéique, de structure et de spécificité de substrat. Les caspases sont des protéines à simple chaîne, le zymogène contenant un prodomaine N-terminal, une grande sous-unité et une petite sous-unité. Parmi les caspases impliquées dans l'apoptose (et non dans l'inflammation comme les caspases 1, 4, 5 et 12), on distingue deux classes. La première regroupe les caspases dites initiatrices (caspases 2, 8, 9, 10). Elles seront à l'origine des cascades d'activations d'autres caspases. Le prodomaine N-terminal des caspases initiatrices est long et contient des motifs DED (death effector domain) ou CARD qui sont des motifs d'interaction protéines-protéines nécessaires pour le recrutement de ces caspases, entre elles ou via des protéines adaptatrices (Logue & Martin, 2008). Les caspases effectrices (caspases 3, 6, 7) représentent le second groupe et sont responsables des activités destructrices, responsables de la mort cellulaire et des caractéristiques morphologiques de la cellule apoptotique. Leur prodomaine est court voire absent. L'activation des zymogènes initiaux par autoactivation est possible du fait de leur faible activité résiduelle qui peut être suffisante lorsqu'une promiscuité soutenue est permise (Adrain & Martin, 2001; Ashkenazi & Dixit, 1998; Salvesen & Dixit, 1999). Le clivage protéolytique responsable de l'activation des caspases aura lieu entre la grande et la petite sous-unité qui s'associeront en hétérodimères puis en hétérotétramères actifs. On dénombre plus de 400 substrats de ces caspases effectrices et la conséquence du clivage de chacun d'entre eux n'est pas connue dans la plupart des cas (Luthi & Martin, 2007). Néanmoins, l'activation de trois protéines a été associée avec les changements morphologiques observés pendant l'apoptose. La protéolyse de la kinase sérine/thréonine ROCK I (Rho associated kinase I) est associée avec la fragmentation nucléaire et le blebbing membranaire (Coleman *et al.*, 2001; Croft *et al.*, 2005). Le clivage de ICAD (inhibitor of CAD, caspase activated DNase) libère CAD qui est une nucléase qui initiera la fragmentation de l'ADN (Enari *et al.*,

1998). Enfin le clivage de protéines structurales comme la vimentine, Gas2 et la plectine contribuera aux modifications de la morphologie cellulaire au cours de l'apoptose (Brancolini *et al.*, 1995; Byun *et al.*, 2001; Nakanishi *et al.*, 2001; Stegh *et al.*, 2000).

A.4.2.1.3. La voie intrinsèque de l'apoptose ou voie mitochondriale de l'apoptose

Cette voie de l'apoptose est activée en réponse à divers stimuli parmi lesquels on peut citer l'altération de l'ADN, un choc thermique, un stress oxydatif et la détection de pathogènes, en particulier des virus.

L'évènement majeur associé au déclenchement de l'apoptose par la voie intrinsèque est la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (MOMP : mitochondrial outer membrane permeabilisation) qui entraînera, entre autres, l'efflux dans le cytosol du cytochrome *c*. Ce relargage permettra l'assemblage d'un complexe de haut poids moléculaire dans le cytoplasme appelé « apoptosome » (Adrain & Martin, 2001; Cain *et al.*, 2000; Wang, 2001). Présent sous forme monomérique dans le cytosol d'une cellule saine, le facteur Apaf-1 en présence de cytochrome *c* et d'ATP s'oligomérisera pour former l'apoptosome, dont la structure en roue, composée de sept molécules d'Apaf-1, recrutera et activera un nombre équivalent de procaspases 9 (Cecconi *et al.*, 1998). La caspase 9 sera responsable de l'activation en aval de caspases exécutrices comme les caspases 3 et 7. La caspase 3 activera à son tour les caspases 2 et 6 (Slee *et al.*, 2001; Slee *et al.*, 1999b). La perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie est associée à une perte du potentiel transmembranaire de la mitochondrie ($\Delta\psi_m$) et un arrêt des processus énergétique et des fonctions de biosynthèse. Elle est régulée par les protéines de la famille Bcl-2 (Cory & Adams, 2002; Petros *et al.*, 2004) qui regroupe 17 membres. On distingue parmi celles-ci, les protéines antiapoptotiques des protéines proapoptotiques. Elles possèdent entre un et quatre domaines BH (Bcl-2 homology). Les protéines antiapoptotiques contiennent toutes quatre domaines BH (BH1, BH2, BH3, BH4) et presque toutes un domaine transmembranaire. Elles sont donc typiquement associées à des membranes. Dans ce groupe on trouve Bcl-2, Bcl-xL (Bcl-2 related protein, long isoform), Bcl-w (Bcl-2 like 2 protein), Mcl-1 (myeloid leukemia cell-1), Bcl2A1 et Bcl-B. Parmi les protéines proapoptotiques, Bax, Bak et Bok contiennent trois domaines BH (BH1, BH2 et BH3) et un domaine transmembranaire. On distingue enfin les protéines proapoptotiques à domaine BH3 unique (BH3 only) qui contiennent ou non des domaines transmembranaires : Bim, Bad, Bid, Puma, Noxa, HRK, Bmf et Bik. (Figure 7).

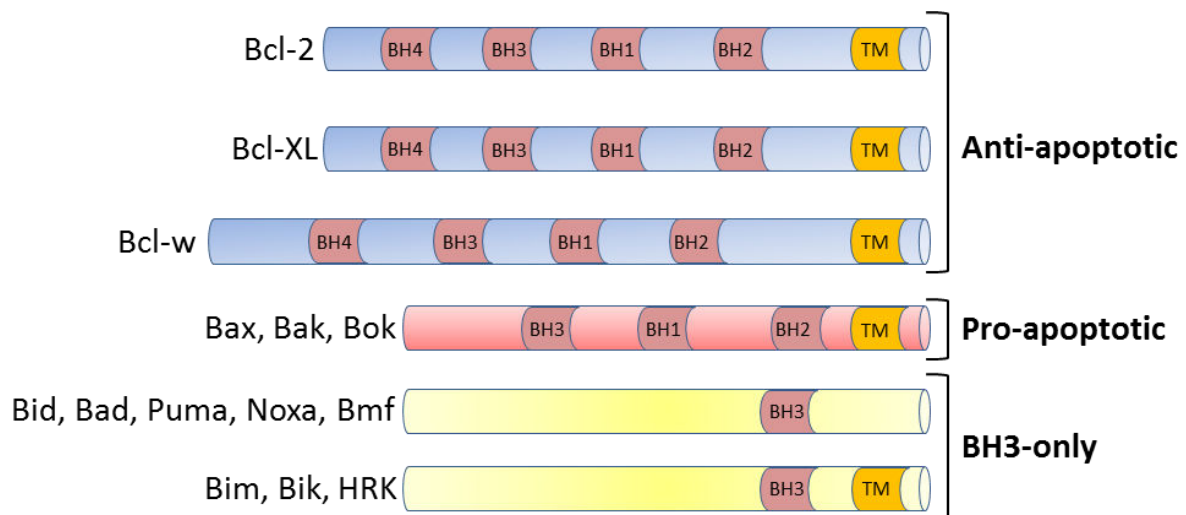


Figure 7 : Représentation schématique des principales protéines Bcl-2 (adapté de Taylor *et al.*, 2008).

Bax et Bak ont des propriétés proapoptotiques redondantes. Bax est localisé dans le cytoplasme, où il est maintenu dans une configuration inactive, probablement du fait d'interactions avec Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1. Bak, protéine membranaire, est localisée dans la membrane externe de la mitochondrie où son activité proapoptotique est inhibée par des protéines antiapoptotiques de type Bcl-2. Il faudra, suite à des signaux proapoptotiques, une augmentation de la quantité de protéines à domaine BH3 unique proapoptotiques pour lever l'inhibition par les molécules antiapoptotiques. Ces augmentations peuvent être la conséquence d'une augmentation de l'activité transcriptionnelle des gènes en question (Puma et Noxa sont transactivés par la protéine p53 suite à des altérations de l'ADN) ou la conséquence de modifications post-traductionnelles (Bim, bad, Bid) (Puthalakath & Strasser, 2002). On peut distinguer, parmi les protéines proapoptotiques à domaine BH3 unique, les activateurs et les dérépresseurs. Bad, Bik, Noxa et Puma, par exemple, sont des dérépresseurs : ils n'activent pas directement Bax ou Bak mais neutralisent l'effet inhibiteur des molécules antiapoptotiques. Il a été montré que Bad interagissait avec Bcl-2 et Bcl-xL mais pas Mcl-1 alors que l'inverse est vrai pour Noxa (Chen *et al.*, 2005). Bid et Bim sont eux considérés comme des activateurs directs de l'oligomérisation de Bax et Bad pour former des canaux dans la membrane externe de la mitochondrie entraînant la perméabilisation de la mitochondrie (Kuwana *et al.*, 2005). Dans tous les cas, l'activation de ces molécules proapoptotiques crée un déséquilibre en leur faveur et lève l'inhibition de Bax et Bak par les protéines Bcl-2 antiapoptotiques. (Figure 8).

Le mécanisme de la perméabilisation de la mitochondrie n'est pas complètement élucidé. Deux modèles sont possibles. Le premier décrit la formation de larges canaux par assemblage de Bax, Bak et éventuellement VDAC (voltage dependent anion channel) sous forme d'homo- ou d'hétéro-oligomères au niveau de la membrane externe. L'augmentation de la perméabilité qui en découle permettra aux protéines retenues dans l'espace intermembranaire mitochondrial s'échapper dans le cytoplasme (Kuwana *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2001). Dans ce cas, la chute du potentiel de membrane n'est pas instantanée. Le second modèle est responsable de l'augmentation de la perméabilité membranaire de la mitochondrie par augmentation de la perméabilité de la membrane interne. Ce phénomène est observé en cas de surcharge en calcium ou en présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, reactive oxygen species) qui entraînent l'activation du PTPC (permeability transition pore complex) dont la composition n'est pas complètement élucidée mais dont VDAC et ANT (adenine nucleotide translocase) font partie (Galluzzi *et al.*, 2008). Une fois le PTPC ouvert, il y a perte instantanée du potentiel de membrane mitochondriale et la rupture des deux membranes internes et externes suite au choc osmotique généré. Consécutivement, la libération des composés présents dans l'espace intermembranaire, dont le cytochrome *c*, se produira (Zamzami *et al.*, 2005). Si ce deuxième modèle semble être régulé par des protéines de la famille Bcl-2, ceci ne fait pas de doute pour le premier. Bcl-2 et Bcl-xL stabilisent les membranes mitochondriales en inactivant par séquestration Bax, Bak et t-Bid (truncated Bid) (Kim, 2005; van Delft & Huang, 2006). Elles auraient également un rôle inhibiteur dans la formation du PTPC (Marzo *et al.*, 1998; Shimizu *et al.*, 1999).

Le cytochrome *c* n'est pas le seul composé être relargué suite à la perméabilisation de la membrane mitochondriale. On trouve notamment deux autres facteurs proapoptotiques : Smac (second mitochondrial-derived activator of caspase)/DIABLO (direct IAP-binding protein with low pI) et HtrA2 (high temperature requirement)/Omi qui inhibent les inhibiteurs de l'apoptose (IAP : inhibitors of apoptosis). Enfin, des effecteurs de mort cellulaire indépendante des caspases sont également relargués. Il s'agit de AIF (apoptosis-inducing factor), de l'endonucléase G et de CAD (Li *et al.*, 2001; Modjtahedi *et al.*, 2006; Susin *et al.*, 1999). Leurs présences sont détectées tardivement, quand la cellule est déjà engagée de façon irréversible vers la mort. Ils sont tous les trois responsables de la fragmentation de l'ADN en morceaux, CAD nécessitant son activation par la caspase 3 (Enari *et al.*, 1998; Joza *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001).

A.4.2.1.4. L'activation des caspases associée à un stress au niveau du réticulum endoplasmique

La mort cellulaire peut être engendrée par un stress du réticulum endoplasmique. Ce stress est la conséquence de l'accumulation de protéines dont le repliement est imparfait ou d'une perturbation de l'homéostasie calcique. Il est suggéré que l'apoptose observée suite à ce stress soit dépendante de la voie d'activation mitochondriale puisque l'activation des caspases 9, 3, 6 et 7 a été rapportée. De même, la surexpression de la protéine Bcl-2, l'utilisation de fibroblastes dépourvus de caspases 9 ou de Bax ou de Bak, préviendraient cette activation (Ruiz-Vela *et al.*, 2005). Bim pourrait jouer un rôle majeur dans le déclenchement de l'apoptose par voie mitochondriale suite à un stress du réticulum endoplasmique car celle-ci est diminuée en l'absence de cette protéine à domaine BH3 unique (Puthalakath *et al.*, 2007).

A.4.1.2.5. La voie du PIDDosome

A l'origine, du fait de la présence de domaines CARD, la caspase 2 était envisagée être une protéine initiatrice. Cependant, aucune caspase n'est apparue comme étant un substrat de la caspase 2 contrairement à Bid qui, après clivage en t-Bid, entraînera la libération du cytochrome *c* de la mitochondrie (Guo *et al.*, 2002). L'hypothèse de l'existence d'un complexe d'activation de la caspase 2 similaire à celui de la caspase 9 (apoptosome) ou de la caspase 8 (DISC, death-inducing signaling complex, décrit plus loin) a été formulée. Un complexe appelé PIDDosome a ensuite été décrit. Ce complexe est formé par RAIDD (RIP-associated ICH-1 (ICE (interleukine-1 β converting enzyme)/CED-3 (cell-death determining 3) homologue 1 protein with a death domain) qui est une molécule adaptatrice et PIDD (p53-inducible protein with a death domain) qui est une protéine permettant la formation et le maintien de la structure du PIDDosome (Read *et al.*, 2002; Tinel & Tschopp, 2004). La formation du PIDDosome met en jeu des interactions entre les domaines de mort de RAIDD et PIDD et les domaines CARD de RAIDD et de la caspase 2. Ce complexe observé en cristallographie comporterait cinq PIDD et sept RAIDD permettant le recrutement et la probable activation de sept molécules de caspase 2 (Park *et al.*, 2007a). L'activation de la caspase 3, en aval de l'apoptosome, serait un prérequis nécessaire à l'activation de la caspase 2. Cette observation complique l'étude du rôle de la caspase 2 (Slee *et al.*, 1999b). Des études complémentaires seront nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes d'action et d'activation de la caspase 2 ainsi que les contextes dans lesquels celle-ci joue un rôle. (Figure 8).

A.4.1.2.6. La voie extrinsèque de l'apoptose

L'induction de cette voie est initiée par la liaison de ligands à des « récepteurs de mort » transmembranaires, présents à la surface cellulaire, appartenant à la super famille des récepteurs au TNF. Ces récepteurs possèdent des domaines extracellulaires riches en cystéine qui permettent l'interaction avec les ligands et des domaines cytoplasmiques qui assureront la transduction du signal. Ces domaines cytoplasmiques contiennent environ 80 acides aminés et sont appelés des domaines de mort (DD : death domain) (Ashkenazi & Dixit, 1998). Parmi les couples ligands/récepteurs, on peut citer FasL (Fas ligand)/FasR (Fas receptor aussi connu sous le nom d'ApoI ou CD95), TNF- α /TNFR1 (TNF receptor 1), Apo3L/DR3 (death receptor 3), Apo2L (aussi connu sous le nom de TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand)/DR4 et Apo2L/DR5 (Ashkenazi & Dixit, 1998; Chicheportiche *et al.*, 1997; Peter & Krammer, 1998; Rubio-Moscardo *et al.*, 2005; Suliman *et al.*, 2001). Que ce soit avec FasL ou TNF- α , la trimérisation des récepteurs est nécessaire pour la liaison des ligands. Une fois le ligand lié à son récepteur, il y a recrutement au niveau cytoplasmique de protéines adaptatrices via leurs domaines de mort (DD). Suite à la liaison de FasL, la protéine FADD (Fas-associated death domain) est recrutée. Après liaison du TNF- α à son récepteur, la protéine TRADD (TNF receptor type 1-associated death domain) est recrutée. Elle permettra le recrutement ultérieur de FADD et RIP-1 (Grimm *et al.*, 1996; Hsu *et al.*, 1995; Wajant, 2002). Les domaines DED de FADD et la procaspase 8 permettront leur interaction, étape ultime de la formation du complexe DISC (death-inducing signaling complex). La procaspase 10, très proche de la procaspase 8, peut également être recrutée dans certains contextes (Sprick *et al.*, 2002). Les caspases 8 ou 10 seront activées par auto-clivage protéolytique des procaspases correspondantes (Kischkel *et al.*, 1995). A ce moment, la phase d'exécution est déclenchée et ces caspases pourront cliver la procaspase 3 en caspase 3 active. Cette transduction du signal est un phénomène très régulé, contrôlé par un polypeptide qui contient un pro-domaine similaire à celui de la procaspase 8 mais qui ne possède pas de site actif protéasique : la protéine c-FLIP (cellular FLICE inhibitory protein) peut se lier à FADD de façon compétitive et inhiber le recrutement de la procaspase 8, interrompant ainsi le signal (Earnshaw *et al.*, 1999; Scaffidi *et al.*, 1999). De plus, il faut distinguer les types cellulaires où la stimulation des récepteurs de mort sera suffisante pour propager le signal de mort par activation directe des caspases effectrices (Scaffidi *et al.*, 1998). En effet, dans d'autres cellules (hépatocytes, cellules β du pancréas par exemple), la quantité de caspase 8 activée n'est pas suffisante, à elle seule, pour activer les caspases effectrices. Ceci s'explique par la quantité élevée de protéines à activité ubiquitine-ligase, appelées XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis),

présentes dans ces cellules. Les protéines XIAP empêchent l'activation directe de la procaspase 3 par la caspase 8 (Albeck *et al.*, 2008; Jost *et al.*, 2009). Dans ce cas, le signal proapoptotique doit être amplifié par activation de la voie mitochondriale de l'apoptose. Cette amplification se réalise par clivage de la protéine Bid (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998), protéine à domaine BH3 unique, dont la forme tronquée (t-Bid), correspondant au fragment C-terminal, induira l'oligomérisation de Bax et/ou Bak et au relargage du cytochrome *c* de la mitochondrie consécutif. On explique aisément que dans ces cellules, contrairement aux premières, l'apoptose soit inhibée en présence de molécules antiapoptotiques de type Bcl-2 qui agissent au niveau mitochondrial. Enfin, le facteur mitochondrial Smac/DIABLO qui est relargué suite à l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose peut, par inhibition des XIAP, augmenter la capacité de la caspase-8 à activer directement les caspases effectrices (Adrain *et al.*, 2001; Du *et al.*, 2000). (Figure 8).

La voie extrinsèque de l'apoptose est particulièrement importante dans la régulation du nombre de lymphocytes dans le cadre du maintien de l'homéostasie du système immunitaire, en s'assurant que le nombre de lymphocytes produits en réponse à un stimulus ne croisse pas indéfiniment.

A.4.2.1.7. Activation des caspases par la voie du granzyme B

Cette voie d'activation des caspases nécessite le transfert de granules cytotoxiques des lymphocytes T cytotoxiques ou des cellules NK à la cellule cible transformée ou infectée par un virus (Trapani & Smyth, 2002). Ces granules contiennent la molécule perforine qui va former un pore dans la cellule cible et permettre le passage des autres composés du granule dans la cellule cible. Parmi ces composés, le granzyme B est une protéase qui clive les protéines au niveau de leurs résidus acide aspartique (Odake *et al.*, 1991; Poe *et al.*, 1991), suggérant sa capacité à activer les caspases directement. Le granzyme B et la perforine ne sont pas les seuls constituants des granules mais il a été montré que la présence de ces deux protéines était suffisante pour induire l'apoptose (Waterhouse & Trapani, 2002). Les caspases 3, 7, 8 et 10 sont des substrats directs du granzyme B (Adrain *et al.*, 2005) mais l'inhibition de leur activité par un pan-inhibiteur des caspases tel zVAD-fmk (benzyloxycarbonyl-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketone) n'est pas cytoprotecteur et suggère la présence d'autres cibles du granzyme B, différentes des caspases (Sutton *et al.*, 1997). La protection fournie par la surexpression de Bcl-2 implique une voie mitochondriale de l'apoptose engendrée par cette voie (Chiu *et al.*, 1995; Schroter *et al.*, 1995). Il a en effet été montré que Bid est une cible directe du granzyme B dont la forme tronquée viendra s'insérer dans la membrane

mitochondriale et provoquera le relargage du cytochrome *c* (Barry *et al.*, 2000). Il a également été précisé que la caspase 8 et le granzyme B clive Bid en des régions distinctes (Sutton *et al.*, 2000). (Figure 8).

Le granzyme A, relargué au même moment que le granzyme B permettra l'activation d'ADNase et jouera un rôle dans la mort cellulaire. Cette voie est indépendante des caspases et ne rentre donc pas dans la définition biochimique de l'apoptose.

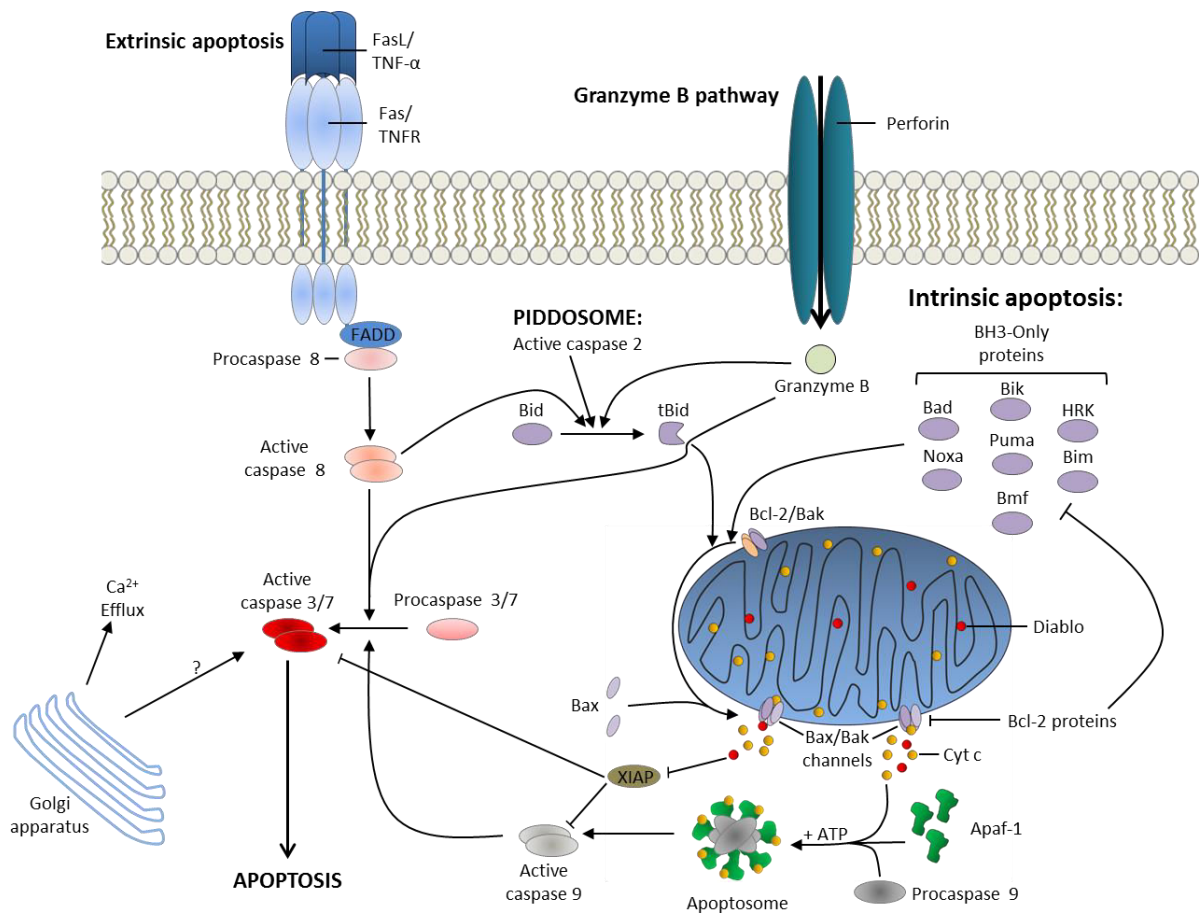


Figure 8 : Représentation schématique des principales voies de l'apoptose (adapté de Taylor *et al.*, 2008).

A.4.2.2. Nécrose régulée : la nécroptose

La nécrose cellulaire est associée à une perte rapide de l'intégrité de la membrane plasmique, une dysfonction mitochondriale et la perte des organites. Elle a longtemps été considérée comme une forme de mort cellulaire non régulée, définie négativement, en l'absence de critères morphologiques typiques de l'apoptose ou de l'autophagie. La classification en mort cellulaire de type III était basée, à l'époque, sur ces critères morphologiques. Ce type de mort, contrairement à l'apoptose, est responsable de la fuite de DAMPs dont des modulateurs de la réponse immune innée (HMGB1 : high mobility groove box 1, IL-1 α , ATP, ADN mitochondrial) qui propageront le signal de danger. Alors qu'il est connu, depuis les années 1980, que la nécrose pouvait être induite par liaison du TNF- α à ses récepteurs dans certains types cellulaires (Laster *et al.*, 1988), il a fallu attendre 2005 pour que l'hypothèse d'une nécrose régulée pouvant être inhibée par un agent pharmacologique soit confirmée. En effet, la nécrostatine 1, une molécule inhibant l'activité kinase de RIP-1, prévient la nécrose cellulaire en réponse au TNF- α associé à des inhibiteurs de caspases (Degterev *et al.*, 2005; Degterev *et al.*, 2008; Degterev *et al.*, 2013; Takahashi *et al.*, 2012). Depuis lors, il a été établi que la nécrose régulée jouait un rôle physiologique important, notamment dans le développement embryonnaire mais aussi dans des contextes pathologiques (ischémie post reperfusion, sepsis, neurotoxicité).

Le terme nécroptose est employé pour définir une forme de nécrose régulée qui est dépendante de la kinase RIP-3 (Rebsamen *et al.*, 2009). RIP-1 a tout d'abord été envisagée comme un acteur indispensable dans cette voie. En effet, après activation du récepteur au TNF- α associée à l'inhibition pharmacologique des caspases, la nécroptose est inhibée suite à l'action de la nécrostatine sur RIP-1. Cependant, il a été montré que RIP-1, via un domaine d'interaction protéine-protéine appelé RHIM (RIP homotypic interaction motif), présent également dans RIP-3, recrutait cette dernière (Cho *et al.*, 2009; He *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). RIP-3 est nécessaire dans tous les cas à l'engagement dans la voie de la nécroptose, contrairement à RIP-1. Le tronc commun à l'activation de cette voie est la formation d'un complexe supramoléculaire appelé nécrosome (Vandenabeele *et al.*, 2010), contenant au moins RIP-3, plus ou moins RIP-1, qui va acquérir la capacité de phosphoryler la pseudokinase MLKL (mixed lineage kinase domain-like) (Murphy *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2012). En plus de RIP-1, les deux autres protéines pouvant appartenir à ce complexe grâce à leur domaines RHIM sont TRIF et DAI/ZBP1 (Z-DNA binding protein) (He *et al.*, 2011; Rebsamen *et al.*, 2009). Si PGAM5 (phosphoglycerate mutase family member 5) a été

considéré comme un effecteur indispensable en aval de MLKL en provoquant la fragmentation de la mitochondrie dépendante de DNM1L (dynamin1-like) (Wang *et al.*, 2012), il semble que cela soit contredit par des travaux qui mettent en évidence que les absences de PGAM-5 ou de la mitochondrie n'empêchent pas le rôle pronécroptotique de MLKL (Murphy *et al.*, 2013; Tait *et al.*, 2013). Deux autres modes d'action de MLKL ont été suggérés récemment. Le premier nécessiterait la formation d'oligomères de MLKL à la membrane plasmique qui pourrait rompre l'homéostasie cellulaire en déclenchant un influx d'ions calcium et potassium (Cai *et al.*, 2014b; Chen *et al.*, 2014). Le second est hypothétique et correspondrait à la production de ROS par des enzymes d'oxydo-réduction (NOX1, NADPH oxydase 1) au niveau de la membrane plasmique par MLKL (Vanden Berghe *et al.*, 2014).

L'engagement typique dans la voie de la nécroptose est consécutif à l'activation du récepteur au TNF- α en présence d'une inhibition de la caspase 8. Ce récepteur est un régulateur qui peut, en fonction des conditions, déclencher la voie NF- κ B, l'apoptose extrinsèque ou la nécroptose. Suite à l'engagement du TNFR1 par son ligand, un complexe I est formé et lié à la partie intracellulaire du récepteur. Ce complexe est formé par TRADD, RIP-1, TRAF2 et cIAP 1/2 (cellular IAP 1 et 2). RIP-1 est polyubiquitiné par LUBAC et cIAP1/2 qui sont des E3 ubiquitin ligases, empêchant RIP-1 de se lier à la procaspase-8. La voie NF- κ B sera alors activée (Silke & Meier, 2013; Varfolomeev *et al.*, 2006; Vince *et al.*, 2009). La déubiquitynilation de RIP-1 par CYLD (cylindromatosis), l'inhibition des cIAP ou la diminution des quantités de cFLIP (inhibiteur de la caspase 8) entraînent la formation du complexe IIa cytosolique (le ripoptosome). A ce niveau, FADD s'associe à RIP-1 par ses domaines de mort (DD) pour ensuite recruter et activer la procaspase 8 (Cho *et al.*, 2009; He *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2008a). La caspase 8 activée, en clivant RIP-1, RIP-3 ou CYLD inhibe le signal nécroptotique et la cellule s'engage dans l'apoptose. Lorsque la caspase 8 est inhibée ou absente, il y a alors formation du complexe IIb (nécrosome) comprenant RIP-1, RIP-3 et MLKL qui engagera la cellule dans la voie nécroptotique (Khan *et al.*, 2014). Les TLR 3 et 4, localisés dans l'endosome pour les premiers où ils détectent l'ARN double brin et à la membrane plasmique pour les seconds où ils détectent le LPS (lipopolysaccharide), peuvent recruter RIP-1 par l'intermédiaire de TRIF qui comporte un domaine RHIM. En fonction de la présence de caspase-8 ou non, il y aura formation du ripoptosome ou du nécrosome. De même, DAI, après détection d'ADN double brin (Cytomégalo virus) peut activer ces deux voies. (Figure 9).

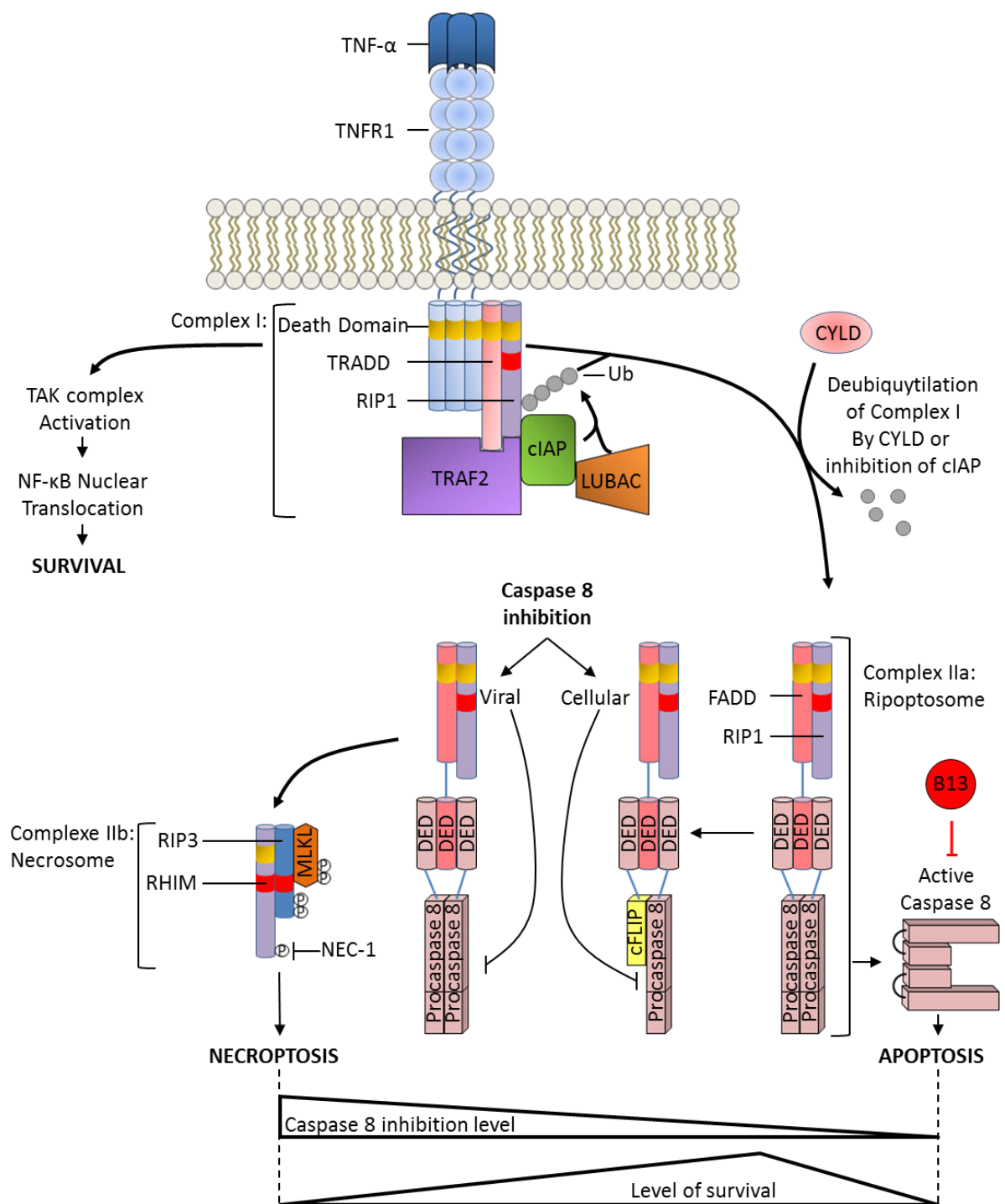


Figure 9 : Représentation schématique des morts cellulaires induites après stimulation du récepteur au TNF- α (adapté de Vanden Berghe *et al.*, 2014).

A.4.2.3. Pyroptose ou mort cellulaire dépendante de la caspase 1

La pyroptose est une mort cellulaire régulée proinflammatoire, dépendante de la caspase 1. Morphologiquement, la pyroptose partage des caractéristiques propres à la fois à l'apoptose et à la nécrose : perte rapide de l'intégrité membranaire, gonflement du cytoplasme, fragmentation de l'ADN. La pyroptose a été originellement décrite dans des macrophages infectés par *Salmonella typhimurium* (Hersh *et al.*, 1999). La caspase 1, autrefois connue sous le nom de ICE, appartient au groupe des caspases inflammatoires et n'est pas nécessaire pour la voie apoptotique. Présente dans le cytosol sous forme de procaspase 1 inactive, l'activation de la caspase 1 nécessite la formation d'un complexe macromoléculaire appelé inflammasome, complexe formé en réponse à une agression de la cellule (voir chapitre sur les NLR.). Les principaux inflammasomes sont NLRC4 (NACHT, LRR and CARD domains-containing proteins), NLRP1 et NLRP3 (NACHT, LRR and PYD domains-containing proteins) et AIM2 (Figure 10). N'appartenant pas à la famille des NLR décrits précédemment, il est important de signaler que l'inflammasome AIM2 détecte l'ADN double brin microbien ou viral via son domaine se liant à l'ADN, HIN200 (hematopoietic interferon-inducible nuclear antigens with 200 amino-acid repeats). AIM2 appartient aux protéines de la famille PYHIN (pyrin and HIN domain-containing protein). Il détecte en particulier l'ADN du virus de la vaccine (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2009; Hornung *et al.*, 2009). En réponse à des signaux de danger, l'inflammasome se formera par interaction entre des régions homotypiques de ses composants. Grâce une molécule adaptatrice, le plus souvent ASC, la procaspase 1 sera recrutée dans ce complexe. L'interaction entre ASC et la procaspase 1 met en jeu des domaines CARD. La promiscuité induite dans ce complexe permettra le clivage autoprotéolytique de la procaspase 1 en caspase 1. Celle-ci sera active après association en tétramère de deux petites et deux grandes sous-unités. La caspase 1 convertira le précurseur inactif de l'IL-1 β en IL-1 β mature qui jouera un rôle proinflammatoire bien décrit dans la réponse aiguë engendrant l'inflammation, la vasodilatation, l'hyperthermie et l'extravasation des cellules immunes. Il est important de noter que la production de pro-IL-1 β est limitée dans les cellules au repos et que sa transcription est stimulée par activation des TLR et activation de la voie NF- κ B (Dinarello, 2009). L'activation de la caspase 1 permet également le clivage de pro-IL-18 en IL-18 active proinflammatoire, qui en collaboration avec l'IL-12 stimulera la production d'IFN- γ par les cellules Th1, les cellules NK et les lymphocytes T cytotoxiques. L'IL-33 est une cytokine importante pour la réponse Th2. Elle est également considérée comme « cytokine intracellulaire » car elle se lie à l'ADN nucléaire pour réguler la transcription (Carriere *et al.*, 2007). L'IL-33 est inactivée par clivage par la caspase 1.

La maturation ou l'inactivation de cytokines par la caspase 1 ne sont pas requises pour l'exécution du programme de mort cellulaire (Sarkar *et al.*, 2006), contrairement à la caspase 1 qui, une fois activée, peut engendrer la pyroptose. La formation de pores de 1.1 à 2.4 nanomètres dans la membrane plasmique, sous la dépendance de la caspase 1 active, est responsable d'un déséquilibre des gradients ioniques provoquant l'influx d'eau dans la cellule, son gonflement et l'éclatement de la membrane qui entraînera le relargage de composés proinflammatoires (Bergsbaken & Cookson, 2007; Fink *et al.*, 2008; Fink & Cookson, 2006). L'ADN est également clivé durant la pyroptose mais l'ADNase responsable de cette observation n'a pas été identifiée. L'implication de CAD, comme observée au cours de l'apoptose, a été exclue (Watson *et al.*, 2000). Les caractéristiques de ce clivage de l'ADN sont différentes de celles observées au cours de l'apoptose. Si on observe une condensation nucléaire, l'intégrité du noyau est maintenue, ce qui n'est pas le cas pendant l'apoptose. Le clivage de l'ADN et la lyse cellulaire sont tous les deux dépendants de la caspase 1 mais la lyse cellulaire est indépendante du clivage de l'ADN (Fink & Cookson, 2006). D'autres mécanismes pouvant être associés à la pyroptose ont été suggérés comme la dégradation du cytosquelette d'actine (Edgeworth *et al.*, 2002) et la dégradation des cIAP (Wickliffe *et al.*, 2008). Des études complémentaires seront nécessaires pour confirmer leurs implications. On ne dénombre pas moins de 40 substrats de la caspase 1. Leurs potentiels rôles dans le déclenchement de la pyroptose ne sont pas déterminés.

Au total, l'activation de l'inflammasome est responsable d'une activité proinflammatoire pouvant conduire à la mort cellulaire appelée pyroptose (Bauernfeind & Hornung, 2013). Une activation exagérée de la caspase 1 est associée à des pathologies telles l'infarctus du myocarde, l'ischémie cérébrale, des maladies neurodégénératives, des maladies inflammatoires de l'intestin et le choc septique (Bergsbaken *et al.*, 2009). L'inhibition pharmacologique de la caspase 1 ou sa délétion génétique permet de protéger de l'inflammation et de la mort cellulaire associées à ces maladies (Duprez *et al.*, 2009). Si cela reste à confirmer, il est proposé que jusqu'à un certain niveau d'activation, la caspase 1 initie des réponses de survie cellulaire, de contrôle de la croissance bactérienne et stimule la production de cytokines inflammatoires. En revanche, lorsque les niveaux d'activation de la caspase 1 sont trop élevés, elle peut entraîner des processus inflammatoires pathologiques et la mort cellulaire par pyroptose. (Figure 11).

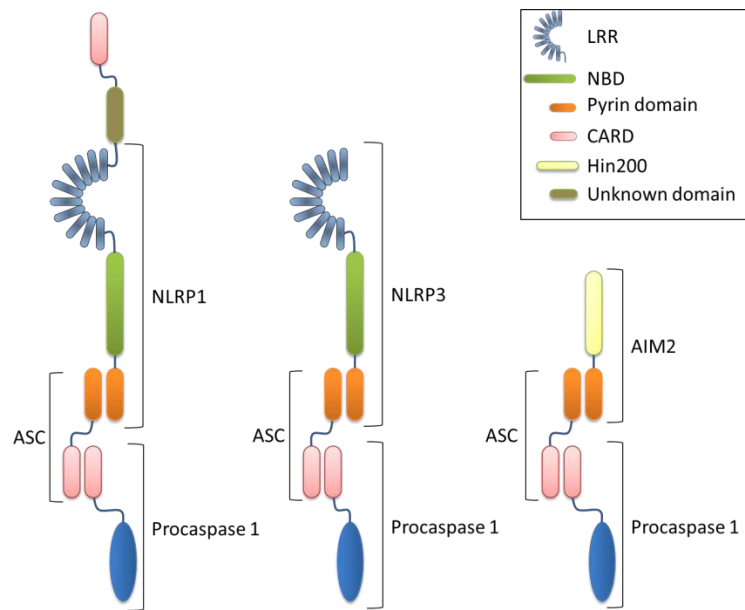


Figure 10 : Représentation schématique de 3 détecteurs impliqués dans la formation des inflammasomes (adapté de Bauernfeind & Hornung, 2013).

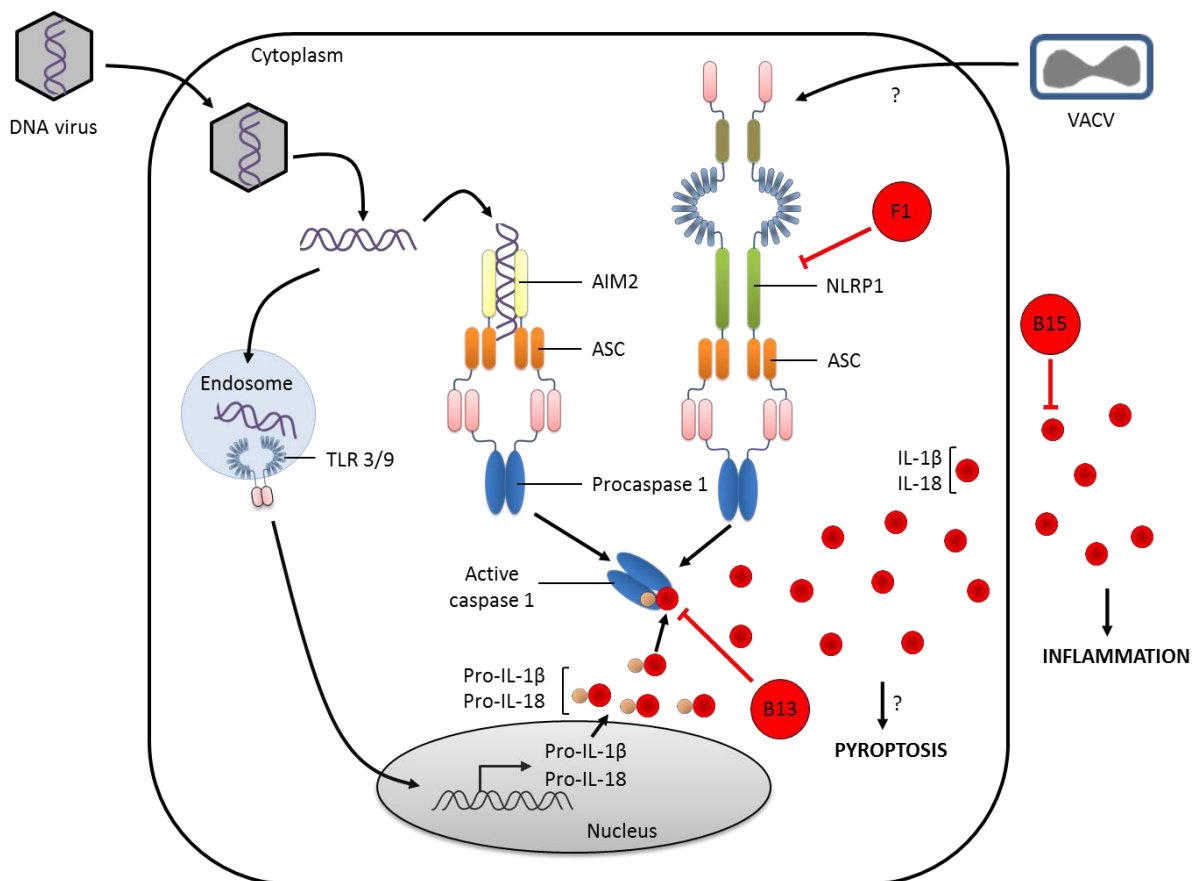


Figure 11 : Représentation schématique des principales voies de l'inflammasome (adapté de Bauernfeind & Hornung, 2013).

A.4.3. Inhibition de la mort cellulaire : exemples de modulation par les virus à ADN

A.4.3.1. Apoptose

Le déclenchement de l'apoptose par une cellule infectée par un virus représente un des mécanismes de défense antivirale parmi les plus anciens. Alors que la mort cellulaire peut être bénéfique pour la dissémination du virus dans les stades tardifs de l'infection, il est primordial pour les virus d'éviter une mort cellulaire prématurée qui interviendrait avant que le cycle viral soit achevé. Au cours de l'évolution, différentes stratégies d'inhibition de l'apoptose par les virus se sont mises en place.

A.4.3.1.1. Exemples d'inhibition de l'apoptose par des protéines virales de type Bcl-2

A.4.3.1.1.1. Protéine E1B-19K des adénovirus.

Le rôle de cette protéine dans l'apoptose et le maintien de la réplication virale fut l'un des premiers à être décrit (White *et al.*, 1991). E1B-19K inhibe de nombreux stimuli apoptotiques : l'activation de p53 par une autre protéine de l'adénovirus, E1A ; l'apoptose extrinsèque après liaison de TNF, de TRAIL ou de Fas à leurs récepteurs membranaires (Huang *et al.*, 1997; Perez & White, 1998; Tollefson *et al.*, 2001) ; l'apoptose intrinsèque induite par la surexpression de Bax (Han *et al.*, 1998). E1B-19K se localise au niveau de la membrane mitochondriale où il séquestre Bax et Bak (Cuconati *et al.*, 2002; Han *et al.*, 1996a). Les protéines Bak et Bcl-2 ont notamment été découvertes grâce à leurs interactions avec E1B-19K (Farrow *et al.*, 1995; Han *et al.*, 1996b). En plus d'un domaine transmembranaire, E1B-19K possède des domaines BH1, BH2 et BH3 dont les parties les plus conservées parmi les sérotypes d'adénovirus sont aussi présentes chez Bcl-2. La surexpression de Bcl-2 complémente l'absence de E1B-19K et permet la réplication virale en l'absence de celle-ci (Chiou *et al.*, 1994; Cuconati & White, 2002).

A.4.3.1.1.2. Protéines vMIA (viral mitochondrial inhibitor of apoptosis) du cytomégalovirus.

Codée par l'exon 1 du gène UL37 du cytomégalovirus, vMIA est nécessaire à la réplication virale et inhibe comme E1B-19K différents stimuli apoptotiques au niveau mitochondrial (Goldmacher, 2002; Goldmacher *et al.*, 1999). Parmi d'autres fonctions antiapoptotiques, vMIA recrute Bax au niveau de la mitochondrie et inhibe son activité proapoptotique. Des analyses *in silico* ont révélé que vMIA ressemblait à Bcl-xL. Cependant, les interactions seraient de nature électrostatique entre vMIA et les régions BH2 et BH3 de Bax. Cette région

d'interaction étant absente de Bak, vMIA, contrairement à Bcl-xL, n'interagit pas avec elle (Arnoult *et al.*, 2004; Pauleau *et al.*, 2007). Localisée à une position similaire dans le génome du CMV murin, la protéine m38.5 bloque l'apoptose en recrutant Bax au niveau de la mitochondrie pour empêcher l'activation de l'apoptose par Bax (Arnoult *et al.*, 2008).

A.4.3.1.1.3. Protéine vIBO (viral inhibitor of Bak oligomerisation) du cytomégalovirus murin
L'ORF m41.1 code pour une petite protéine localisée à la mitochondrie. Elle inhibe l'oligomérisation de Bak et l'induction de l'apoptose consécutive (Cam *et al.*, 2010). L'action complémentaire de vMIA et vIBO suggère des fonctions non redondantes de Bax et Bak au cours de l'infection virale.

A.4.3.1.1.4. Protéines antiapoptotiques des gamma-herpesvirus :

La protéine BHFRF1 du virus Epstein-Barr (EBV) est une protéine homologue de Bcl-2 et, de ce fait, présente des propriétés antiapoptotiques en réponse à une grande gamme de stimuli (Kawanishi, 1997; Marshall *et al.*, 1999; McCarthy *et al.*, 1996; Tarodi *et al.*, 1994). Elle est exprimée tôt au cours du cycle viral et n'est plus exprimée, ni nécessaire, une fois la phase de latence observée chez ces virus installée (Altmann & Hammerschmidt, 2005). Elle colocalise avec Bcl-2 au niveau de la membrane externe mitochondriale (Henderson *et al.*, 1993; Hickish *et al.*, 1994). Contrairement à Bcl-2 ou Bcl-xL, elle n'est en revanche pas capable de séquestrer ni d'inhiber les protéines à domaine BH3 unique (Su *et al.*, 2006).

Codée par l'ORF18, la protéine KSBcl2 (Kaposi sarcoma-associated Bcl-2) du virus HHV-8 bloque l'apoptose aussi efficacement que Bcl-2 ou Bcl-xL (Cheng *et al.*, 1997). Sa structure est très semblable à Bcl-2 bien que de légères différences l'empêchent de se dimériser avec elle-même ou d'autres membres de la famille Bcl-2. Elle échappe, pour cette raison, à une régulation négative par des membres proapoptotiques de cette famille (Huang *et al.*, 2002).

La protéine K7 d'HHV-8 possède une homologie limitée avec Bcl-2 et se rapproche plus structurellement de la protéine survivin qui appartient à la famille des IAP. K7 inhibe aussi bien l'apoptose extrinsèque qu'intrinsèque. Elle permettrait l'inhibition des caspases par Bcl-2 en établissant un « pont » entre ces protéines : d'un côté, elle lie la caspase 3 par son domaine BIR (baculovirus IAP repeat), de l'autre elle lie Bcl-2 par son domaine BH2 (Wang *et al.*, 2002).

La protéine cytoplasmique M11 du γ HV-68 murin (γ -herpes virus 68 murin) est exprimée tôt dans le cycle viral lytique de l'infection *in vitro* et son expression est détectée pendant la phase de persistance virale *in vivo* (Roy *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1999). Elle contient un domaine BH1 mais pas de domaine BH2 et ressemble donc peu à Bcl-2. Malgré cela, elle peut inhiber l'apoptose induite par Fas ou le TNF- α ainsi que prévenir la toxicité de Bax chez la levure. Son domaine BH3 serait capable de séquestrer des peptides provenant des domaines BH3 de Bak et Bax (Loh *et al.*, 2005). Son rôle serait plus important dans l'établissement de la persistance et l'infection chronique que dans la phase aiguë de l'infection (Gangappa *et al.*, 2002).

A.4.3.1.2. Autres stratégies virales d'inhibition de l'apoptose

A.4.3.1.2.1. La protéine vICA (viral inhibitor of caspase 8 induced apoptosis) du cytomégalovirus

Codée par le gène UL36 du cytomégalovirus humain, vICA inhibe l'apoptose extrinsèque induite par Fas en se liant au prodomaine de la caspase 8 de manière constitutive. vICA ne se lie pas à FADD et, en ce sens, est différent de c-FLIP. Ce recrutement de la procaspase 8 par vICA empêche son clivage protéolytique. Le clivage de Bid et l'activation de la voie intrinsèque qui en découle sont inhibés en amont par vICA. Bien qu'il soit établi que vICA ne soit pas indispensable à la réplication virale *in vitro*, son rôle dans la pathogénie de l'infection virale serait de prévenir la clairance immunologique des cellules infectées par les lymphocytes T cytotoxiques et les lymphocytes NK (McCormick *et al.*, 2003; Skaletskaya *et al.*, 2001).

A.4.3.1.2.2. L'ARN β 2.7 du cytomégalovirus

Au cours de l'infection à CMV, un ARN de 2700 bases interagit avec le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale et prévient le relargage de la sous-unité GRIM-19 de ce complexe. Il en résulte que le potentiel membranaire de la mitochondrie est stabilisé et que la production d'ATP est maintenue, améliorant ainsi la survie cellulaire et permettant au virus d'accomplir son cycle viral (Reeves *et al.*, 2007).

A.4.3.1.2.3. Les protéines de l'unité de transcription E3 des adénovirus

Les sous-unités virales α , E3-10.4K, et β , E3-14.5K, des adénovirus, forment RID (receptor internalisation and degradation complex). RID inhibe l'apoptose extrinsèque en déclenchant l'internalisation et la dégradation lysosomale des récepteurs de morts localisés à la membrane

plasmique (TNFR, Fas, TRAIL) (Chin & Horwitz, 2005; Elsing & Burgert, 1998; Tollefson *et al.*, 2001).

A.4.3.2. Nécroptose

La protéine vIRA (viral inhibitor of RIP activation) du cytomégalovirus murin (MCMV) est le seul exemple décrit à ce jour. La synthèse de cette protéine codée par le gène M45 du MCMV explique que l'inhibition de la caspase 8 par le MCMV ne sensibilise pas les cellules infectées à une mort accrue induite par le TNF- α (Mack *et al.*, 2008; Sridharan & Upton, 2014). En effet, vIRA, via un domaine RHIM, se lie de manière spécifique à RIP3, inhibant ainsi la formation du complexe moléculaire responsable de la nécroptose. La mutation du domaine RHIM de viRA atténue sévèrement le virus aussi bien chez les hôtes compétents qu'immunodéprimés. Cette atténuation a totalement disparu lorsque ce mutant a été utilisé pour infecter des hôtes chez qui RIP3 était absent (RIP3 $-/-$). Ceci a démontré, sans détour, que l'inhibition de la nécroptose dépendante de RIP3 est fondamentale pour l'infection à MCMV (Upton *et al.*, 2008; 2010). Il a par la suite été montré que cette induction de la nécroptose était indépendante de RIP1 mais faisait intervenir DAI. Après avoir détecté le virus, DAI s'associe à RIP3 via son domaine RHIM (Kaiser *et al.*, 2008; Upton *et al.*, 2012).

A.4.3.3. Pyroptose

La protéine M013 du virus myxoma et la glycoprotéine 013L du virus rabbit fibroma se lient à ASC et inhibent l'activation de l'inflammasome (Dorfleutner *et al.*, 2007; Johnston *et al.*, 2005). En plus d'agir sur la maturation de l'IL-1 β , elles inhibent également sa transcription (Rahman *et al.*, 2009).

La protéine Orf63 d'HHV-8 en interagissant avec NLRP1 et NLRP3 inhibe l'activation de l'inflammasome permettant au virus d'établir la phase de latence en échappant à la réponse immune (Gregory *et al.*, 2011; Rathinam *et al.*, 2012).

A.4.4. Inhibition de la mort cellulaire par les virus de la vaccine.

A.4.4.1. Les protéines de type Bcl-2

A.4.4.1.1. F1

F1, protéine précoce de 26 kDa, codée par le gène F1L, est largement conservée parmi les souches du virus de la vaccine. FPV039 (fowlpox virus 039) est un orthologue de F1 chez ce virus qui touche les oiseaux (Banadyga *et al.*, 2007). Suite aux travaux démontrant que l'infection par la souche VACV Copenhagen (qui n'exprime pas B13, inhibiteur de VACV de la voie extrinsèque de l'apoptose, voir plus loin) pouvait inhiber l'apoptose intrinsèque, l'existence d'un inhibiteur viral de cette voie a été supposée (Wasilenko *et al.*, 2001). En tirant profit de virus possédant de larges délétions dans leurs génomes (vv811 et vv759), la protéine F1, exprimée ectopiquement, a été identifiée comme cet inhibiteur. Les mêmes travaux ont montré que sa localisation cellulaire était uniquement mitochondriale et que sa séquence ne présentait aucune homologie avec les protéines Bcl-2 (Wasilenko *et al.*, 2003). Les caractérisations suivantes ont établi que F1 se localisait dans la mitochondrie grâce à un motif d'ancrage présent dans son domaine C-terminal et que cette localisation était indispensable à son activité antiapoptotique (Stewart *et al.*, 2005). Ultérieurement, son interaction avec la protéine Bak, et non avec la protéine Bax, a été montrée. Cette interaction empêche l'oligomérisation de Bak et le relargage du cytochrome *c* après infection virale, prévenant ainsi l'apoptose (Fischer *et al.*, 2006; Postigo *et al.*, 2006; Wasilenko *et al.*, 2005). Peu après, l'interaction de F1 avec Bim a été également confirmée et l'inhibition de l'apoptose par cette interaction nécessitait la présence de Bax, mais pas Bak. Ce résultat suggère que par cette liaison avec Bim, F1 inhibe aussi indirectement l'activation de Bax et son recrutement au niveau de la mitochondrie (Taylor *et al.*, 2006). De manière inattendue, la cristallisation de F1, malgré l'absence d'homologie de séquence, a révélé que F1 était une protéine de type Bcl-2 (Kvansakul *et al.*, 2008). Par des études de liaison *in vitro*, les interactions avec Bim et dans une moindre mesure avec Bak ont été confirmées et ont permis de conclure que F1 était un nouvel exemple d'homodimère de type Bcl-2. Elles ont également permis de suggérer que Bim se liait à F1 comme il le fait avec Bcl-xL ou Mcl-1. Une étude a en effet proposé que F1, plus stable, se substitue à Mcl-1 suite à l'infection par VACV (Campbell *et al.*, 2010). Des travaux récents ont résolu les structures de F1 en complexe avec Bak ou Bim. Ils ont révélé qu'un dimère de F1 pouvait recruter deux molécules de Bak ou Bim au niveau du sillon classique des protéines Bcl-2. Les auteurs ont

également généré, par mutagénèse basée sur ces structures, un grand nombre de virus VACV où F1 conservait ou non sa capacité à lier Bim, Bak ou les deux. Ils ont pu conclure que la séquestration de Bim au cours de l'infection virale serait la cause principale de l'inhibition de l'apoptose au cours de l'infection par VACV (Campbell *et al.*, 2014).

En 2009, F1 a été décrit comme un inhibiteur direct de la caspase 9 et de la formation de l'apoptosome. F1 inhibe à la fois l'activité et l'activation de la caspase 9, ce qui n'avait été décrit chez aucun autre inhibiteur des caspases. F1 peut donc neutraliser l'apoptose à deux étapes distinctes, faisant de cette protéine la première protéine de type Bcl-2 à inhiber une caspase (Yu *et al.*, 2011; Zhai *et al.*, 2010).

Enfin, en 2013, la liaison et l'inhibition de NLRP1 par F1 ont été montrées. L'absence de F1 dans des cultures de macrophages infectées augmente l'activation de la caspase 1, entraînant une sécrétion d'IL1- β plus importante. La présence d'un hexapeptide dans F1 est responsable de sa liaison à NLRP1 et un virus contenant F1 sans l'hexapeptide a été généré. Dans un modèle d'infection intranasale de souris, la virulence de VACV est moins importante quand F1 est absent du virus faisant de cette protéine un facteur de virulence. Les auteurs ont montré que la même diminution de virulence était observée en utilisant un virus exprimant une protéine F1 capable d'inhiber l'apoptose mais incapable de lier NLRP1. Ils ont observé une inflammation plus précoce au niveau pulmonaire, en réponse à l'infection virale avec un virus incapable d'inhiber NLRP1. La régulation de l'inflammasome pourrait donc jouer un rôle plus important que l'apoptose dans la pathogénicité du virus dans ce modèle (Gerlic *et al.*, 2013). (Figure 12).

A.4.4.1.2. N1

Egalement largement conservée parmi les souches du virus de la vaccine, cette protéine de 14 kDa, exprimée tôt au cours du cycle viral forme un homodimère et adopte elle aussi un repliement de type Bcl-2 (Aoyagi *et al.*, 2007; Bartlett *et al.*, 2002; Cooray *et al.*, 2007). Elle possède un sillon dont l'interface permet l'interaction avec les protéines proapoptotiques Bid et Bad et il a été montré qu'elle inhibait l'apoptose (Cooray *et al.*, 2007; Maluquer de Motes *et al.*, 2011). De plus, *in vitro*, l'interaction avec des peptides contenant le domaine BH3 des protéines proapoptotiques Bid, Bim et Bak a été établie (Aoyagi *et al.*, 2007). Une étude a montré que N1 n'interagissait pas avec Bax (Banadyga *et al.*, 2009) et une autre n'a pas pu reproduire le caractère antiapoptique de cette protéine (Postigo & Way, 2012). Néanmoins, un travail de mutagénèse de N1 a montré que la perte de la capacité à lier Bid et Bad corrélait avec la perte de l'activité antiapoptotique de la protéine (Maluquer de Motes *et al.*, 2011). N1

inhiberait également les voies NF- κ B et IRF3 en se liant au complexe IKK et TBK-1 (DiPerna *et al.*, 2004). Cependant, d'autres auteurs, s'ils ont confirmé le rôle de N1 dans ces voies, suggèrent que l'inhibition de la voie NF- κ B aurait lieu au niveau du complexe TAK-1 et non IKK. La perte des fonctions antiapoptotiques par mutagenèse n'affecte pas ces propriétés. Les souches de VACV, dans lesquelles N1 a été retirée, sont moins virulentes chez la souris après infection intranasale (Bartlett *et al.*, 2002; Billings *et al.*, 2004; Jacobs *et al.*, 2008; Kotwal *et al.*, 1989). Dans un modèle d'infection intradermale, N1 s'est aussi révélée être un facteur de virulence puisque le virus n'exprimant pas ce gène donnait des lésions plus petites que celui l'exprimant et les titres viraux obtenus à partir des tissus infectés étaient également plus faibles (Bartlett *et al.*, 2002; Jacobs *et al.*, 2006; Tschärke & Smith, 1999). De plus, il a été montré que la virulence du virus était davantage dépendante de l'inhibition de l'immunité innée que de l'inhibition de l'apoptose par N1 (Maluquer de Motes *et al.*, 2011). Enfin, il a récemment été établi que cette protéine était ubiquitinée en plusieurs sites au cours de l'infection virale (Maluquer de Motes *et al.*, 2014). (Figure 12).

A.4.4.2. Les protéines de type non Bcl-2

A.4.4.2.1. B13

B13 (SPI-2, serpin inhibitor 2) appartient à la famille des serpins qui sont des inhibiteurs de protéines à sérine inhibant plusieurs protéases impliquées dans l'inflammation, l'activation du complément et la coagulation sanguine (Carrell *et al.*, 1987). La présence d'homologues de ces serpins dans les génomes des poxvirus a été établie (Bournsell *et al.*, 1988; Kotwal & Moss, 1989; Pickup *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 1989b) et la protéine CrmA (cytokine response modifier A), présent chez le virus Cowpox, a été décrite initialement de manière intensive. Les travaux sur CrmA ont été à l'origine d'avancées majeures dans le domaine de la mort cellulaire. Tout d'abord, il a été montré que l'absence de CrmA pouvait être responsable d'un syndrome inflammatoire hémorragique chez des œufs fertilisés et infectés par le virus cowpox (Pickup *et al.*, 1986). Suite à ces travaux, CrmA a été identifiée comme un inhibiteur de ICE (interleukine-1 β converting enzyme), équivalent chez les nématodes de CED-3, désormais appelée caspase 1 (Ray *et al.*, 1992). Cette inhibition de la caspase 1, qui était, à l'époque, la seule cible de CrmA connue, a laissé penser pendant quelques années que cette caspase et la production d'IL-1 β , conséquence de son activation par Fas ou TNF- α , était l'effecteur majeur de l'apoptose par voie extrinsèque observée. ICE était également incriminée dans la mort cellulaire neuronale chez les nématodes car CrmA pouvait la prévenir (Enari *et al.*, 1995; Gagliardini *et al.*, 1994; Los *et al.*, 1995; Miura *et al.*, 1995;

Tewari & Dixit, 1995). Ces travaux ont clairement montré que bien qu'homologue des serpins, CrmA avait également une action sur une autre famille de protéines, les caspases, et qu'elle inhibait l'apoptose. Après des travaux montrant que la souche WR de VACV, contrairement à la souche Copenhagen, pouvait inhiber l'apoptose induite par Fas (Heinkelein *et al.*, 1996), la caractérisation de B13 (codée par le gène *B13R*), homologue de CrmA (92% d'homologie) chez le virus de la vaccine, a permis d'établir que cette protéine précoce de 38,5 KDa n'était pas exprimée par toutes les souches de VACV. Elle est absente des souches Copenhagen, Tashkent, Lister et Tian Tian mais présente chez VACV WR. La délétion de ce gène n'a pas d'effet sur la croissance du virus *in vitro*. Dans un modèle d'infection intranasale de souris, son absence n'entraîne aucune différence de pathogénicité (Kettle *et al.*, 1995). Les capacités antiapoptotiques de B13 ont ensuite été confirmées, aussi bien dans un modèle d'infection virale qu'après expression ectopique (Dobbelstein & Shenk, 1996). Les travaux suivants ont démontré la capacité de B13 à inhiber la production d'IL-1 β mais ils ont également prouvé que l'inhibition de l'induction de la fièvre chez la souris était plutôt due au récepteur viral de l'IL-1 β (B15) qu'à B13 (la contribution des cellules infectées dans l'établissement de la fièvre était peu importante) (Kettle *et al.*, 1997). Ce n'est qu'une fois que la voie de signalisation en aval des récepteurs de mort a été disséquée (Boldin *et al.*, 1996; Chinnaiyan *et al.*, 1995; Chinnaiyan *et al.*, 1996; Hsu *et al.*, 1996; Hsu *et al.*, 1995) que la caspase 8 (FLICE) et son inhibition par CrmA a été décrite (Muzio *et al.*, 1996; Srinivasula *et al.*, 1996). C'est donc cette action sur la caspase 8, et non sur la caspase 1 qui explique le rôle de CrmA dans l'inhibition de l'apoptose. Après qu'il ait été décidé d'uniformiser la nomenclature pour les caspases (Alnemri *et al.*, 1996), des travaux ont établi le spectre d'action de CrmA. Malgré quelques controverses principalement dues aux différences dans les essais employés, il est accepté que CrmA, et par extension B13, sont des inhibiteurs à large spectre des caspases, avec un effet sur les caspases 1, 4, 5, 8, 9 et 10 (Ekert *et al.*, 1999; Garcia-Calvo *et al.*, 1999; Nicholson, 1999; Turner *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 1997).

Plus récemment, du fait de sa capacité à inhiber fortement la caspase 8, son rôle dans l'induction de la nécroptose a été démontré. B13 est à la fois un inhibiteur (apoptose) et un inducteur de mort cellulaire (nécroptose) (Cho *et al.*, 2009; Polykratis *et al.*, 2014; Whilding *et al.*, 2013). (Figure 12).

A.4.4.2.2. B22

B22 (SPI-1, serpin inhibitor 1, gène *B22R* chez la souche VACV Western Reserve et *C12L* chez la souche VACV Copenhagen) appartient comme B13 à la famille des serpinines. Sa présence dans les génomes des poxvirus a été établie en même temps que B13 (Boursnell *et al.*, 1988; Kotwal *et al.*, 1989; Pickup *et al.*, 1986). B22 est une protéine précoce de 40 Kda et est homologue à 46% avec CrmA (Smith *et al.*, 1989b). Elle a été détectée dans tous les orthopoxvirus testés, c'est-à-dire : le virus cowpox, le virus rabbitpox, les souches VACV WR, Copenhagen, Taskent, Tian Tian, Lister, Wyeth, IHD-J et IHD-W (Kettle *et al.*, 1995). De plus, le gène *B22R* est également présent dans deux souches de virus de la variole (Massung *et al.*, 1993; Shchelkunov *et al.*, 1993) et dans le virus ectromélie (dont les espèces murines sont l'hôte naturel) (Senkevich *et al.*, 1993), suggérant un rôle important dans l'infection virale *in vivo*. Cependant, comme pour B13, la délétion de ce gène n'a pas entraîné de différence dans la croissance du virus *in vitro* et, dans le modèle d'infection intranasale de souris, aucune différence de pathogénicité n'a été observée en son absence (Kettle *et al.*, 1995). Ce gène n'a pas été intensivement étudié. Deux études utilisant le virus rabbitpox ont montré que ce gène était important pour la restriction d'hôte et que sa délétion entraînait l'apoptose de cellules de rein de porc (pig kidney, PK-15) ou des cellules A549 de carcinome humain pulmonaire (Ali *et al.*, 1994; Brooks *et al.*, 1995). De plus, en utilisant les virus rabbitpox et cowpox, une équipe a montré que l'abrogation totale de la voie extrinsèque de l'apoptose requérait les deux protéines, B13 et B22, dans certaines cellules (Macen *et al.*, 1996). En revanche, les premiers travaux montrant le rôle de B13 dans l'inhibition de l'apoptose extrinsèque n'ont pas pu mettre en évidence le même rôle pour B22 (Dobbelstein & Shenk, 1996). Enfin, ni B22, ni B13, n'inhibent la présentation de l'antigène aux lymphocytes T cytotoxiques (Blake *et al.*, 1995). (Figure 12).

A.4.4.2.3. GAAP (golgi anti-apoptotic protein)

Le gène *E6L* du virus camelpox code pour cette protéine qui est retrouvée chez seulement 3 des 16 souches du virus de la vaccine étudiées pour ce gène dont les souches Lister et Evans (Gubser & Smith, 2002). GAAP viral (vGAAP) a un orthologue humain (hGAAP) avec qui il partage 73% des acides aminés. hGAAP est très conservé parmi tous les eucaryotes et appartient à la famille des TMBIM (transmembrane Bas inhibitor-containing motif) dont BI-1 (Bax inhibitor 1) est le représentant (Gubser *et al.*, 2007). BI-1 est une protéine du réticulum endoplasmique et inhibe l'apoptose induite par Bax, la staurosporine mais pas Fas (Bolduc *et al.*, 2003; Chae *et al.*, 2003; Xu & Reed, 1998). GAAP est très hydrophobique et présente six

domaines transmembranaires (Carrara *et al.*, 2012). Il se situe au niveau de l'appareil de Golgi et forme un canal à ions calcium impliqué dans plusieurs processus cellulaires. GAAP s'oligomérisse (Saraiva *et al.*, 2013b), module les flux de calcium des modules intracellulaires (de Mattia *et al.*, 2009) et favorise l'adhésion cellulaire et la migration par la stimulation du SOCE (store operated calcium entry) et des calpain 2 (Saraiva *et al.*, 2013a). vGAAP n'est pas nécessaire à la réplication virale et est un facteur de virulence. vGAAP inhibe à la fois l'apoptose intrinsèque et extrinsèque (Gubser *et al.*, 2007). La régulation de l'apoptose par l'appareil de Golgi n'est pas usuellement décrite et la découverte de cette fonction grâce à cette protéine virale peut amener à considérer cet organite avec plus d'intérêt dans la régulation de la mort cellulaire régulée. (Figure 12).

A.4.4.2.4. E3

Le gène *E3L* de VACV code pour 2 protéines, p25 et p20, appelées E3 (Watson *et al.*, 1991). Ces protéines sont exprimées précocement au cours du cycle viral (Yuwen *et al.*, 1993) et sont incorporées dans les virions (Murcia-Nicolas *et al.*, 1999). Parmi ses fonctions, E3 a été décrite comme un facteur de restriction d'hôte et est nécessaire à la réplication de VACV dans plusieurs lignées cellulaires (Beattie *et al.*, 1995). E3 est un facteur de virulence car sa délétion du virus entraîne une pathogénicité moins importante dans un modèle d'infection intranasale de souris (Brandt & Jacobs, 2001). E3 a de nombreux effets biologiques. Parmi eux, le plus important est la modulation de la réponse IFN, en inhibant les protéines dépendantes d'une liaison à l'ARN double brin pour être actives, comme PKR et la 2'-5' OAS (Chang *et al.*, 1992; Rivas *et al.*, 1998). PKR, parmi ses nombreuses activités (Garcia *et al.*, 2006; Marchal *et al.*, 2014) est notamment décrite comme un inducteur de l'apoptose. Plusieurs voies d'activation de l'apoptose par PKR ont été suggérées. Tout d'abord, l'activation de la voie NF-κB serait impliquée dans l'apoptose déclenchée par PKR, probablement en induisant l'expression de la protéine p53 (Gil *et al.*, 1999). Ensuite, l'apoptose déclenchée par PKR mettrait en jeu principalement FADD et la caspase 8 bien que le mécanisme précis ne soit pas élucidé, d'autant que les récepteurs de mort ne sont pas nécessaires à cette mort déclenchée par PKR (Balachandran *et al.*, 1998; Gil & Esteban, 2000). L'expression de PKR induirait également l'expression de protéines proapoptotiques telles Fas et Bax (Balachandran *et al.*, 1998). Enfin, la formation de l'apoptosome est observée dans la mort déclenchée par PKR et celle-ci est inhibée par l'expression de protéines Bcl-2 (Gil *et al.*, 2002). Le rôle de E3 comme inhibiteur de l'apoptose a été rapporté initialement dans des cellules Hela infectées avec VACV possédant ou non le gène

E3L (Lee & Esteban, 1994) puis confirmé par d'autres études (Garcia *et al.*, 2002; Kibler *et al.*, 1997). *E3*, via son domaine C-terminal, a la capacité de lier et séquestrer l'ARN double brin (Davies *et al.*, 1993). *E3* inhibe également PKR par une interaction directe conduisant à la formation d'un hétérodimère (Romano *et al.*, 1998; Sharp *et al.*, 1998). En conclusion, bien que PKR soit sans aucun doute à l'origine de la mort cellulaire et qu'elle soit inhibée par *E3*, les mécanismes d'induction de cette mort cellulaire apparaissent comme étant multifactoriels et difficiles à disséquer. (Figure 12).

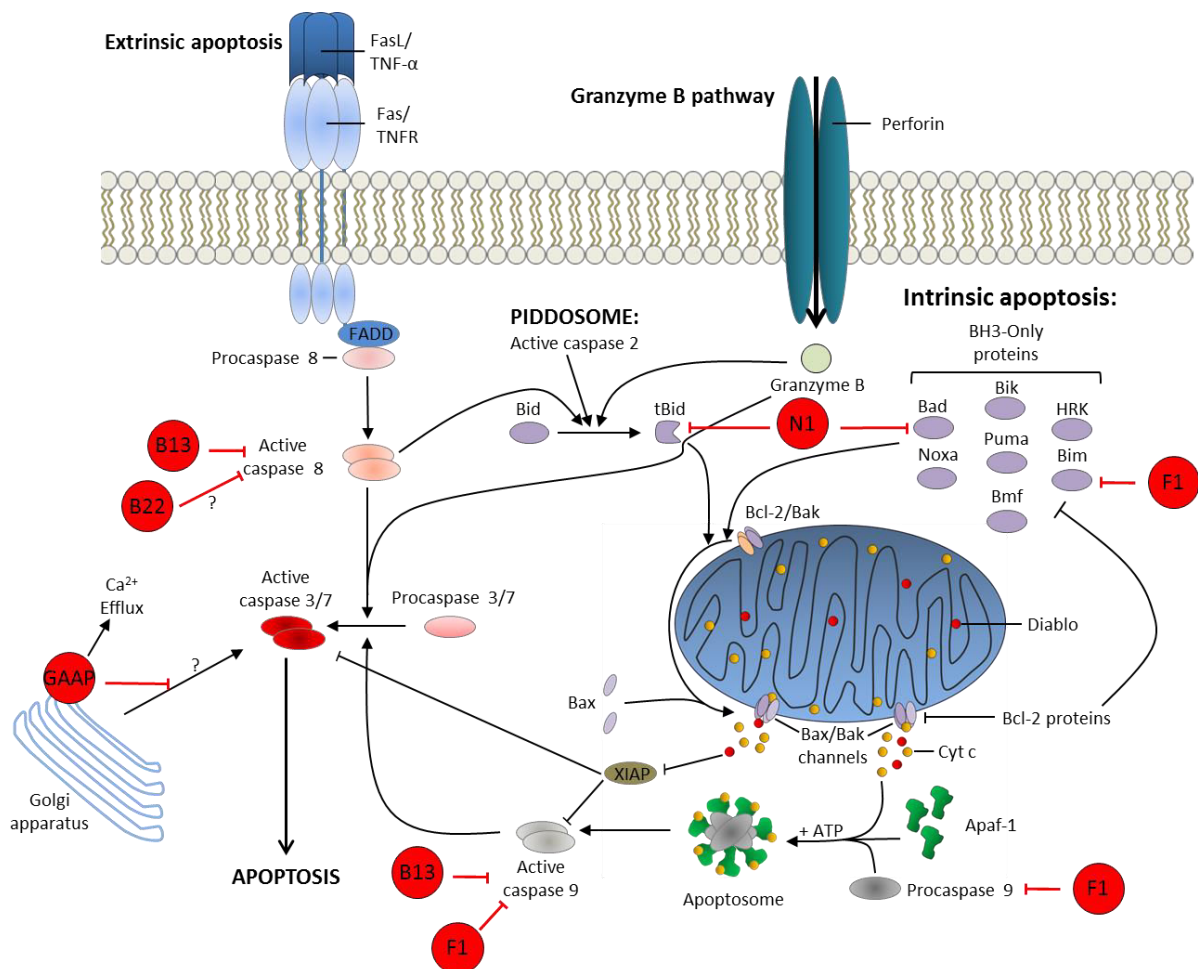


Figure 12 : Représentation schématique des principales voies de l'apoptose et leurs inhibitions par les protéines de VACV.

B. Partie expérimentale.

B.1. Objectifs du travail

Le virus de la vaccine exprime plusieurs molécules antiapoptotiques. Cette redondance fonctionnelle observée *in vitro*, mais pas *in vivo*, complique l'étude de ces protéines vis-à-vis de leurs fonctions dans l'apoptose. Les protéines B13, F1, GAAP et N1 sont celles qui ont été le mieux définies et sont celles que nous allons étudier dans ce travail. Leurs propriétés ont été étudiées individuellement. La plupart du temps, lorsqu'un contexte d'infection virale a été utilisé dans ce but, des virus VACV dans lesquels ces gènes avaient été supprimés individuellement ont été utilisés. La redondance fonctionnelle des molécules antiapoptotiques a rendu nécessaire l'utilisation de drogues pour lever l'inhibition résiduelle conférée par les protéines antiapoptotiques restantes. Aucune étude de leur contribution relative à l'inhibition de l'apoptose n'était disponible avant ce travail. En premier lieu, nous avons décidé de développer des approches qui nous permettraient de comparer les protéines antiapoptotiques de VACV dans un même système expérimental. Dans un deuxième temps, nous avons voulu tirer profit d'une souche de VACV déficiente, vv811, dérivée de la souche Copenhagen. Cette souche ne contient pas les 4 molécules que nous allons comparer, offrant un outil intéressant pour s'affranchir de la redondance fonctionnelle. Ce virus sera utilisé dans un premier temps sur des cellules exprimant les molécules antiapoptotiques de VACV *in trans*. Enfin, des travaux de mutagenèse de cette souche nous permettront de pouvoir comparer la protection apportée par ces molécules de VACV vis-à-vis de l'apoptose après expression par le virus lui-même. Afin d'obtenir un modèle d'induction de l'apoptose proche de la réalité physiologique, nos systèmes utilisant vv811 nous permettront de s'affranchir de la nécessité d'utiliser des drogues pour induire ce phénomène.

Ces travaux ont été acceptés pour publication dans la revue *Journal of General Virology* en août 2014 sous le titre : « Analysis of the anti-apoptotic activity of four vaccinia virus proteins demonstrates that B13 is the most potent inhibitor in isolation and during viral infection. » (Veyer et al., 2014) (Annexe 1).

Ces travaux ont également fait l'objet d'une présentation orale lors du congrès de l'IUMS (International Union of Microbiological Societies) en août 2014 à Montréal.

B.2. Matériels et méthodes

B.2.1. Biologie moléculaire

B.2.1.1. PCR haute-fidélité

Elles ont été réalisées pour amplifier des produits nécessaires à la création de nouveaux vecteurs, à partir d'ADN déjà présent au laboratoire (plasmide ou ADN viral). Le volume de chaque réaction était de 50 μ L et le mix comprenait 10 ng d'ADN à amplifier, 5 μ L de solution tampon 10X (HiFi buffer, Invitrogen), 2 mM de $MgSO_4$, 0,2 mM de dNTP (désoxynucléotide triphosphate), 0,2 μ M de chaque amorce, amont et aval, et 1 unité d'ADN polymérase (Taq HiFi, Invitrogen). Le programme d'amplification consistait en une phase de dénaturation de 5 minutes à 95°C, une phase d'amplification composée de 30 à 35 cycles (30 secondes à 95°C, 30 secondes à 50-55°C et 1 minutes/kb à 68°C) et enfin une phase d'élongation de 5 à 10 minutes à 68°C.

B.2.1.2. PCR de screening

Elles ont été réalisées sur des cultures bactériennes ou sur des extraits d'ADN viral. Le volume de chaque réaction était de 20 μ L et le mix comprenait 1 μ L d'ADN à amplifier, 4 μ L de solution tampon 5X (GoTaq buffer, Promega), 2 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTP, 0,2 μ M de chaque amorce, amont et aval, et 1 unité d'ADN polymérase (GoTaq, Promega). Le programme d'amplification consistait en une phase de dénaturation de 5 minutes à 95°C, une phase d'amplification composée de 30 à 35 cycles (30 secondes à 95°C, 30 secondes à 50-55°C et 1 minutes/kb à 72°C) et enfin une phase d'élongation de 5 à 10 minutes à 72°C.

Les produits de PCR, mélangés à un tampon de charge (DNA loading buffer 5X, Bioline), ont été séparés dans des gels contenant entre 0,8 et 2% d'agarose dans un tampon TAE (40 mM de Tris, 20 mM d'acide acétique, 1mM d'EDTA) comportant du Syber Safe (Invitrogen, 10X), à un voltage compris entre 90 et 120V. Ils ont ensuite été révélés par exposition à une lumière ultraviolette pouvant provenir du système Chemi Doc (Biorad) et analysés avec le programme Quantity One (Biorad).

B.2.1.3. Extraction d'ADN

B.2.1.3.1. A partir de colonies bactériennes pour screening après clonage

Afin de vérifier la présence d'un plasmide d'intérêt après clonage et transformation, les colonies ont été cultivées dans 1 mL de milieu LB (Luria Broth), contenant l'antibiotique

approprié. Après une heure de culture, à 37°C et sous agitation, 1 µL de la culture était ajoutée au tube de PCR prêt pour l'amplification, l'extraction d'ADN se réalisant pendant la première étape à 95°C *in situ*.

B.2.1.3.2. A partir de gel d'agarose, de cultures bactériennes pour miniprep ou maxiprep

Après avoir découpé la bande d'ADN d'intérêt d'un gel d'agarose ou bien cultivé, à 37°C pendant 16 heures et sous agitation, un clone bactérien dans un milieu LB (entre 2 et 8 mL pour les miniprep, 250 mL pour les maxiprep), contenant l'antibiotique approprié, les kit Qiagen adaptés à chaque protocole ont été utilisés suivant les instructions du fournisseur : QIAquick gel extraction kit, Hispeed mini ou Maxi plasmid kit. L'ADN, si besoin, était conservé à -20°C.

B.2.1.3.3. A partir de cellules eucaryotes infectées par des virus

Après 48 heures d'infection dans un puits d'une plaque 96 puits, le milieu était retiré, les cellules lavées une fois avec du PBS et un mix de 50 µL contenant au moins une unité de protéinase K pour 100 µL (Proteinase K de Tritirachium album, Sigma, tampon Hi-Fi 10X, Invitrogen, diluée en fonction du volume final nécessaire) était ajouté au puits. Ce mélange était ensuite congelé une fois pour faciliter la rupture des membranes cellulaires puis chauffé à 56°C pendant 20 minutes et 65°C pendant 15 minutes. 2 µL de cette préparation étaient utilisés comme échantillon pour les PCR de screening.

B.2.1.4. Quantification d'ADN

L'absorbance des préparations d'ADN et leur concentration étaient obtenues en utilisant le spectrophotomètre NanoDrop ND1000 (Labtech international). Les ratios absorbance à 260/280 et absorbance à 260/230 permettaient d'évaluer la qualité des préparations, considérées idéales si les ratios étaient supérieurs à 1,8.

B.2.1.5. Digestion de plasmides ou des produits de PCR par des enzymes de restriction

Les endonucléases appropriées ont été utilisées. Chaque réaction se déroulait dans un volume final de 20 µL contenant 1 à 2 unités d'enzyme par µg d'ADN dans la solution tampon recommandée par le fournisseur d'enzyme (Roche ou NEB). L'incubation à 37°C durait entre 1 et 3 heures. L'ADN était purifié après résolution dans un gel d'agarose pour les plasmides et pour les produits de PCR en utilisant le kit de purification de produits de PCR de Qiagen.

B.2.1.6. Déphosphorylation des extrémités 5' des vecteurs après digestion

L'ADN digéré était incubé à 37°C pendant 1 heure avec 1 unité de phosphatase alcaline d'intestin de veau (CIP, calf intestinal phosphatase, Biolabs) pour prévenir la ligation du vecteur sur lui-même. La réaction était stoppée par incubation 15 minutes à 65°C.

B.2.1.7. Ligation des inserts à leurs vecteurs

Les ligations se déroulaient dans un volume final de 10 µL contenant un ratio 3:1 d'inserts par rapport au vecteur linéarisé, 1 unité de T4 DNA ligase (Roche), et le buffer T4 DNA ligase 10X (Roche). Le mix de ligation était incubé 16 heures à 4°C.

B.2.1.8. Transformation des bactéries compétentes

5 µL de produit de ligation servaient à transformer 50 µL de bactéries compétentes *E. Coli* XL-10 Gold (Agilent). Le mélange ligation-bactéries après 20 minutes dans la glace était soumis à un choc thermique à 42°C pendant 45 secondes et remplacé aussitôt dans la glace pendant 5 minutes. Ce mélange additionné de 200 µL de milieu LB sans antibiotique était ensuite cultivé 1 heure à 37°C sous agitation (phase de récupération), avant d'êtreensemencé sur une gélose de LB contenant l'antibiotique approprié et placé à 37°C pendant 16 heures.

B.2.1.9. Séquençage ADN

Les échantillons d'ADN purifié à séquencer étaient envoyés au Department of Biochemistry, University of Cambridge, qui dispose d'un Applied Biosystems 3730xl DNA analyser. L'analyse des séquences a été obtenue grâce au logiciel FinchTV (Geospiza, Inc). Les amorces utilisées pour le séquençage étaient soit les amorces de PCR soit des amorces génériques spécifiques des vecteurs, disponibles dans le service de séquençage.

B.2.1.10. Oligonucléotides utilisés

La plupart des oligonucléotides utilisés au cours de ce travail sont répertoriés dans le tableau 2.

Name	Sequence	RE sites	ORF
DV07	GTATTATGGAGCTAATGGTTCCACTGCTGAACAGCTATC		B13R
DV08	GATAGCTGTTCAGCAGTGAACCATTAAGCTCCATAATAC		B13R
DV09	GACGCGCCGCGTGTGTCGATGTTTATGTG	Not1+G	FIL
DV10	GACTCTAGACTCGAGTTATCCTATCATGTATTTGAG	XbaI+XhoI	FIL
DV11	GACGCGCCGCGGATATCTTCAGGGAAATCG	Not1+G	B13R
DV12	GACTCTAGACTCGAGTTAATTAGTTGTCGGAGAG	XbaI+XhoI	B13R
DV27	GACTCTAGACTCGAGTTAACAATTAGTTGTCGGAGAG	XbaI+XhoI	B13R
DV28	GACGAATTCAGTATGGAACAAGGATGACGATGAC	EcoRI+SpeI	Bcl-2+BclXI n-Flag
DV29	AGACGAAAGGGCCTCGTGATA		Puc13-Eco-GFP
DV30	AACCTTGTGGCCGTTTACGTC		Puc13-Eco-GFP
DV35	ACGGAGCTCGCCCGGGATCTGTTTACAAAAATG	SacI; XmaI	Tmpk LF+promoter
DV36	ACGCCCGGGTCTAGAAGCGGATCCGTCAGTGTCTTTATGATTC	XmaI; XbaI; BamHI	Tmpk LF+promoter
DV37	GACGGATCC ATGAGGACTCTACTTATTAG	BamHI	N1
DV38	GACGGATCCTTATTTTTCACCATATAGATC	BamHI	N1
DV43	CTTAGATAATAACAATAGTATAGGATAATTTTTTTAACACGG		FIL FR right
DV44	AAATTATCCTATACTATTGTTTATTATCTAAG		FIL FR left
DV45	GCAGAATTC GGTCTGGTCTGTCCTAAAAGG	EcoRI	FIL FR left

Tableau 2 : Oligonucléotides utilisés

(RE: restriction enzyme; FR: right flanking region; FL: left flanking region).

B.2.2. Culture cellulaire

B.2.2.1. Entretien des cellules

Les cellules HEK 293T (human embryonic kidney with SV40 T antigen), U2-OS (human osteosarcoma), BSC-1 (African green monkey epithelial cell line of kidney origin), CV-1 (African green monkey kidney fibroblast) ont été entretenues dans un milieu DMEM (Dubecco's modified Eagle's medium) complété avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) inactivé 1 heure à 56°C et un mélange antibiotique contenant de la pénicilline et de la streptomycine (50 µg/mL). Les cellules HeLa (human cervical cancer) ont été entretenues dans un milieu MEM (minimum essential medium) complété avec 10% de sérum de veau fœtal inactivé, un mélange antibiotique contenant de la pénicilline et de la streptomycine (50µg/mL), 2mM de L-glutamine et la dilution appropriée d'acides aminés non essentiels (Sigma, 100X). Les cellules RK-13 (rabbit kidney) ont été entretenues dans le même milieu que les HeLa sans ajout d'acides aminés essentiels. Toutes les cellules étaient incubées à 37°C dans un incubateur (Heraeus) humide sous une concentration en CO₂ de 5%.

B.2.2.2. Transfection d'ADN

B.2.2.2.1. Transfection calcium-phosphate

Les cellules étaient ensemencées la veille pour atteindre un degré de confluence de 50% le jour de la transfection. Le milieu de culture était échangé avec du milieu frais 1 heure avant l'ajout du mix de transfection. La quantité d'ADN transfectée était dépendante de la taille du contenant : 5 µg pour une surface de 55 cm², 1,5 µg pour une surface de 9,4 cm². A la première quantité étaient ajoutés 450 µL d'eau et 50 µL de CaCl₂ à la concentration de 2,5mM avant une incubation de 20 minutes à température ambiante. A la seconde quantité étaient ajoutés 67,5 µL d'eau et 7,5 µL de CaCl₂ à la concentration de 2,5mM avant une incubation identique. Un volume d'HBS (280mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, 12 mM de glucose, 50 mM d'HEPES, pH=7,05) équivalent à chaque volume de départ était alors ajouté avant une incubation de 12 à 15 minutes à température ambiante. Ce mix était ensuite ajouté par gouttes aux cellules avant de replacer ces dernières dans l'incubateur à CO₂. Si besoin, le milieu était changé après 24 heures.

B.2.2.2.2. Transfection avec TransIT LT-1 (Mirus) ou PEI (polyethyleneimine, 1 mg/mL)

Les cellules étaient ensemencées la veille pour atteindre un degré de confluence de 50 à 70% le jour de la transfection. Le mix de transfection était préparé en mélangeant la quantité appropriée d'ADN avec de l'OPTIMEM (50 µL par µg d'ADN) puis par ajout du réactif de transfection (2 µL par µg) avant mélange bref par vortex. Après une incubation de 20 à 30 minutes, le volume nécessaire de milieu contenant 2% de sérum de veau fœtal était ajouté. Le milieu des cellules était retiré puis était ajoutée la quantité adéquate de milieu mélangé au mix aux cellules avant de les réincuber.

B.2.2.3. Obtention de lignées cellulaires polyclonales par transduction

Pour la production des lentivirus, des cellules HEK 293T, dans une flasque de 25 cm², ont été transfectées par une des techniques précitées avec 1,86 µg de plasmide d'emballage (p8.91), 1 µg de plasmide codant pour la protéine VSV-G (vesicular stomatitis virus glycoprotein) d'enveloppe du lentivirus (pMDG) et 2,86 µg de vecteur lentiviral bicistronique contenant d'une part le gène d'intérêt mais aussi un gène codant pour la EGFP (enhanced green fluorescent protein). Le milieu des cellules était changé après 24 heures puis collecté à 48 heures et/ou 72 heures. Le milieu collecté était alors centrifugé 5 minutes à 1200 tours/minutes avant d'être passé au travers d'un filtre de 45 µm. Ce surnageant ainsi traité, additionné ou non de polybrene (Sigma) à la concentration de 4 µg/mL, servait alors à

remplacer le milieu de culture de cellules U2-OS confluentes à 85%. Ces cellules étaient ou non spinoculées 1 heures à 1500 tours/minutes avant d'être réincubées. Les cellules positives pour la GFP, après quelques jours de croissance, étaient triées par le service de triage des cellules du département de Pathology, Université de Cambridge, avec un MoFloMLShigh-speed (Beckman Coulter) pour obtenir une population cellulaire la plus proche possible de 100%. Les cellules pouvaient alors servir pour les expériences et/ou être conservées par congélation avec 10% de DMSO (dimethyl sulfoxide) et 90% de sérum de veau fœtal. Les gènes d'intérêt utilisés ont été les gènes viraux *B13R*, *FIL*, *GAAP*, *NI*, le gène cellulaire *Bcl-xL* (contrôle positif pour l'inhibition de l'apoptose). Le plasmide ne contenant que le gène codant pour la EGFP a été utilisé comme contrôle négatif (empty vector, EV).

B.2.3. Analyse des protéines

B.2.3.1. Préparation des lysats cellulaires

Après 2 lavages avec du PBS froid, les cellules, sur une surface froide (glace), étaient détachées par grattage dans un volume approprié de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl, pH=7,5, 100 mM NaCl, 1% CHAPS et un comprimé d'inhibiteurs de protéases (Roche)). Les cellules étaient alors collectées dans un tube eppendorf puis laissées à 4°C pendant 30 à 40 minutes en rotation avant centrifugation pendant 20 minutes à 14000 g. Le lysat clarifié était alors transféré dans un tube eppendorf propre et stocké à -20°C.

B.2.3.2. SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)

Les lysats cellulaires additionnés de tampon de charge dénaturant 6X (50 mM Tris-HCl pH=6,8, 2% SDS, 10% de glycérol, 0,1% de bleu de bromophénol, 100 mM de β -mercaptoéthanol) étaient portés à ébullition pendant 5 minutes avant de les charger sur un gel de polyacrylamide divisé en deux parties. La partie supérieure est un gel de concentration permettant aux protéines un départ simultané (stacking gel : 125 mM Tris-HCl, pH=6,8, 5% acrylamide, 0,1% SDS, 0,1% persulfate d'ammonium, 0,1% TEMED) ; la partie inférieure permet la résolution des protéines en fonction de leur taille (375 mM Tris, pH 8,8, 12% acrylamide, 0,1% SDS ; 0,1% persulfate d'ammonium, 0,1% TEMED). Les protéines étaient séparées dans ce gel par application d'un courant compris entre 90 et 120 volts dans un tampon SDS (25 mM Tris-HCl, 250 mM glycine, 0,1% de SDS).

B.2.3.3. Immunoblots

Après migration dans le gel, les protéines étaient électro-transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond ECL, Amersham) dans un tampon de transfert (25 mM Tris-HCl, 250 mM glycine, 20% de méthanol) à l'aide d'un système de transfert semi-sec (Biorad) pendant 38 minutes à 21 volts. Une fois le transfert effectué, la membrane était récupérée et bloquée pendant 1 heure, à température ambiante, avec du PBST (PBS, 0,1% tween) contenant 5% de lait. La membrane était alors incubée pendant la nuit, à 4°C, avec l'anticorps primaire dilué à la concentration appropriée dans du PBST + 5% de lait. Après 3 lavages au PBST, l'anticorps secondaire conjugué à un fluorophore (IRDye, Li-COR) était ajouté dans du PBST + 5% de lait avant incubation pendant une heure à température ambiante. Après 3 lavages au PBST et un au PBS, la membrane était séchée et analysée en utilisant un système d'analyse d'images par infrarouge Odyssey (Li-COR Biosciences), permettant une analyse semi-quantitative de l'intensité des bandes protéiques par intégration du signal. Les anticorps primaires utilisés pour ce travail ont été un anti-tubuline (souris, Upstate Biotech), un anti-FLAG (souris, Sigma), un anti-PARP-1 (souris, Cell Signalling), des anticorps anti-protéines de VACV décrits précédemment : anti-D8 (Parkinson & Smith, 1994), anti-A49 (Mansur *et al.*, 2013), anti-B13 (Kettle *et al.*, 1995), anti-F1 (Postigo *et al.*, 2006), anti-N1 (Bartlett *et al.*, 2002).

B.2.3.4. Immunofluorescence

Les cellules à étudier étaient ensemencées sur des lamelles de verre. Au moment désiré, les cellules étaient lavées 3 fois dans du PBS froid puis fixées avec une solution à 4% de paraformaldéhyde dans 250 mM d'HEPES (incubation 5 minutes sur glace et 15 minutes à température ambiante). Après 3 lavages au PBS, les groupes aldéhydes libres étaient quenchés avec une solution d'ammonium chloride à 50 mM dans du PBS pour éviter des phénomènes d'autofluorescence. Après 3 lavages au PBS, les cellules étaient perméabilisées avec une solution de PBS contenant 0,1% de Triton X-100 pendant 5 minutes. Après lavage, le blocage des cellules s'effectuait par addition d'une solution de PBS contenant 5% de sérum de veau fœtal (blocking buffer) pendant 30 minutes à température ambiante. Les lamelles sont ensuite déposées sur une goutte de 70 µL d'anticorps primaire dilué dans du blocking buffer pour une incubation de 90 minutes en chambre humide. Après 3 lavages au blocking buffer, une incubation de 90 minutes sur une goutte de 70 µL d'anticorps secondaire était effectuée. Les lamelles étaient ensuite lavées 2 fois dans du blocking buffer, une fois dans du PBS puis plongées dans un bain d'eau distillée pour éviter la formation de cristaux de PBS. La lamelle était finalement montée sur une lame via une goutte de liquide de montage

Mowiol 4-88 (Calbiochem) contenant du DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) et laissée à 4°C dans l'obscurité pour séchage. Les images ont été acquises avec un microscope confocal Zeiss LSM780 et analysées avec le logiciel d'acquisition Zen2011. Un anticorps primaire anti-FLAG de lapin (SIGMA) suivi d'un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin Alexa Fluor 546 (Invitrogen) ont été utilisés pour les lignées cellulaires transduites par lentivirus. Pour vérifier l'expression virale de GAAP, un anticorps de lapin anti-GAAP (Gubser *et al.*, 2007) et un anticorps de souris anti-GM130 (marqueur de l'appareil de Golgi, BD Biosciences) ont été utilisés comme anticorps primaires.

B.2.3.5. Utilisation du MG132

La protéine F1 étant dégradée par le protéasome, nous avons utilisé le MG132, inhibiteur pharmacologique du protéasome, pour permettre sa détection. Le composé a été dilué à la concentration de 25 µM dans du milieu de culture et les cellules ont été collectées après 4, 8 et 16 heures.

B.2.4. Travail avec les virus

B.2.4.1. Déterminations du titre viral

Elles ont été réalisées par infection de cellules BSC-1 ou U2-OS confluentes à 90% dans des plaques de 6 puits. Le stock viral était dilué de 10 en 10 jusqu'à la dilution 10^{-9} et 500 µL des trois dernières dilutions servaient à infecter les cellules (opération réalisée en duplicat). Après la phase d'adsorption de 90 minutes sous agitation régulière, le milieu était retiré et remplacé par un milieu semi-solide composé à partie égale de CMC (carboxy methyl cellulose, 3%) et de MEM 2X contenant 5% de sérum de veau fœtal et 100 ug/mL d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine). En fonction des virus, le temps d'incubation pouvait varier de 2 à 5 jours pour permettre la formation de plaques visibles et comptables. Le dernier jour, le mélange CMC/MEM était aspiré, les puits étaient lavés une fois au PBS et une solution de cristal violet (5% de cristal violet en solution, Sigma, 25% d'éthanol) était ajoutée pendant 30 à 60 minutes. Les cellules étaient ensuite lavées à l'eau, séchées avant le comptage des plaques. Les titres viraux sont exprimés en p.f.u./mL (plaque forming unit/mL)

B.2.4.2. Détermination de la taille des plaques virales

Des cellules BSC-1 ou U2-OS étaientensemencées dans des plaques de 6 puits. Chaque puits était infecté avec 50 p.f.u. lorsque la confluence atteignait 90% puis recouvert, après incubation de 90 minutes sous agitation, par un mélange MEM 2X/CMC. Le temps

nécessaire à la formation des plaques pouvait varier entre 48 heures et 5 jours. Les plaques étaient colorées avec du cristal violet comme précédemment et leurs tailles mesurées en utilisant un microscope inversé Zeiss AxioVert A1 et le logiciel d'acquisition Axiovision.

B.2.4.3. Courbes de croissance virale *in vitro*

Les cellules U2-OS ont été utilisées. Ensemencées en flasques de 25 cm², les courbes de croissance en une étape (single-step growth curves) ont nécessité un inoculum de départ de 2,5 p.f.u./cellule et les cellules ont été collectées après 0 heure et 24 heures. Le culot cellulaire a été resuspendu dans un volume constant de DMEM 2% SVF et stocké à -20°C. Le même protocole a été utilisé pour les courbes de croissance en plusieurs étapes (multi-step growth curves) hormis un inoculum de départ plus faible de 0.1 p.f.u./cellule et plusieurs temps de collecte des cellules : 0 heure, 24 heures et 48 heures. Les culots cellulaires, après 3 cycles de congélation/décongélation et une étape de sonication, ont ensuite été titrés sur cellules U2-OS.

B.2.4.4. Construction des virus mutants : protocole « infection/transfection »

La méthode dite « transient dominant selection method » a été utilisée (Falkner & Moss, 1990) (Figure 13). Une flasque de 25 cm² était tout d'abord infectée avec le virus à muter (0.01, 0.1 ou 1 p.f.u./cellule). Après la période d'adsorption (90 minutes), un plasmide contenant le gène à insérer, flanqué de chaque côté d'environ 250 paires de bases correspondantes à la région où le gène devait être inséré, était transfecté. S'il s'agissait de retirer un gène du virus, alors les régions flanquantes de ce gène dans le plasmide étaient en position contiguës. Ce plasmide, en plus de contenir le gène à incorporer et les régions flanquantes contenait également un gène d'expression de la EGFP et un marqueur de résistance aux drogues, la cassette *Ecogpt* (*E. coli* guanylylphosphoribosyl transferase). Après 48 heures, les cellules infectées étaient collectées, resuspendues dans un milieu contenant de l'acide mycophénolique (MPA, 25ug/mL), de l'hypoxanthine (HX, 15 ug/mL) et de la xanthine (X, 250 ug/mL), congelées/décongelées 3 fois, soumises à sonication et diluées de 10 en 10 pour infection de cellules BSC-1 en plaque de 6 puits. Après la phase d'adsorption, le milieu était remplacé par un milieu solide contenant du MEM 2X et de l'agarose (concentration finale 1%) et les drogues citées précédemment. Après 5 jours pour les mutants vv811, ou 2 à 3 jours pour le mutant WR, des plaques d'intérêt exprimant la GFP étaient suffisamment grandes pour pouvoir être prélevées et réinoculées en plaque de 6 puits. La purification du virus intermédiaire, positif pour la GFP, nécessitait 3 cycles de purification en plaque avant de pouvoir commencer la phase de résolution du virus. Celle-ci consistait

également en une purification en plaque, la différence étant l'absence de drogue qui permettra au virus de se débarrasser de l'insert permettant la résistance aux drogues. Devant l'absence de marqueur EGFP à cette étape, les virus vv811 pouvaient être laissés jusqu'à 7 jours pour que les plaques soient suffisamment visibles pour être prélevables. Une coloration au rouge neutre (neutral red solution, Sigma) pouvait aider à la visualisation des plaques : ajout d'1 mL d'une dilution au 20^{ème} de rouge neutre dans un mélange agarose/MEM 2X dans le puits contenant déjà le milieu solide suivi d'une incubation de quelques heures. Les plaques prélevées étaient inoculées à la fois sur une plaque de 96 puits pour amplification du virus, observation de l'effet cytopathogène, confirmation de l'absence de GFP et une plaque de 96 puits en parallèle pour extraction d'ADN à la protéinase K et PCR de vérification. La PCR de vérification utilisait des amorces situées dans les régions flanquantes du gène ou directement dans le gène à insérer ou retirer. Si les résultats de PCR étaient satisfaisants, alors le nouveau virus obtenu était purifié en plaque de 6 puits pendant 3 cycles successifs.

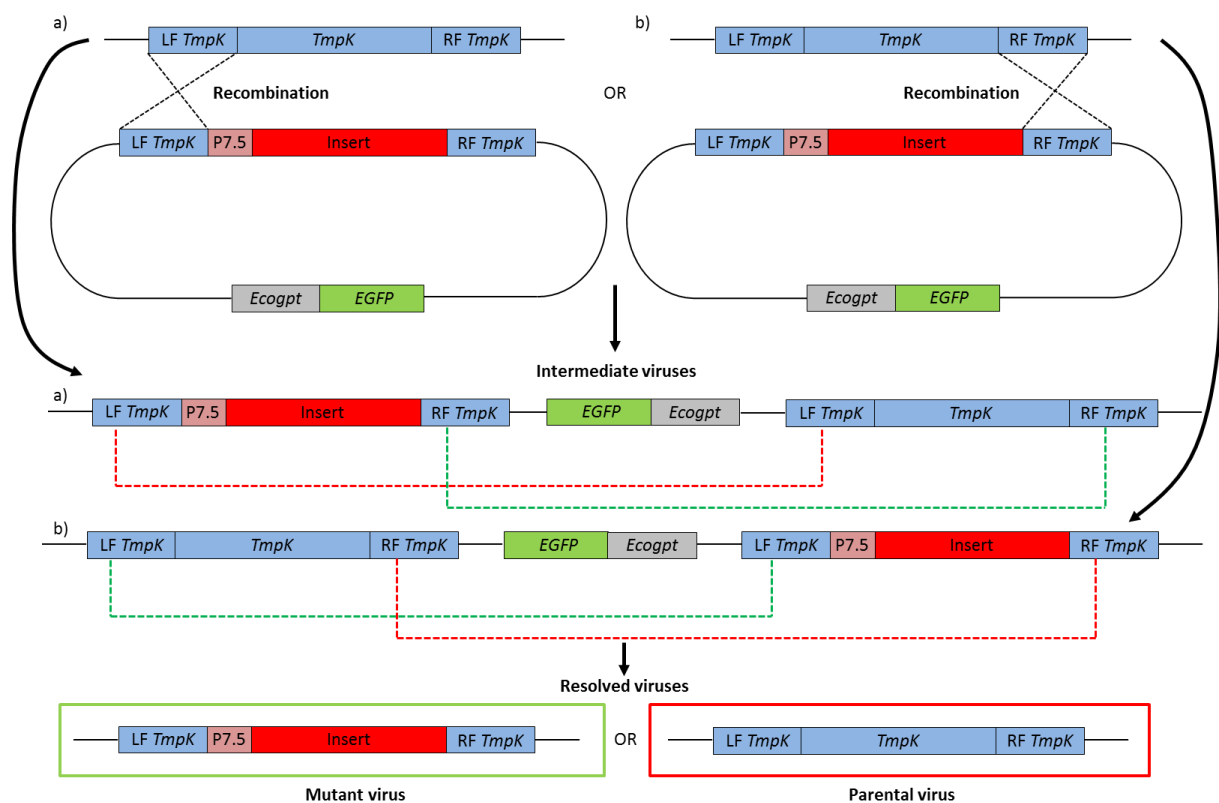


Figure 13 : principe du protocole infection/transfection pour la construction de virus mutants par recombinaison génétique.

B.2.4.5. Amplification du stock viral

Une fois le virus purifié, des cellules U2-OS (pour le virus vv811) ou des cellules RK-13 (pour les virus VACV), ensemencées dans 1 flasque de 25 cm², étaient infectées avec 0.1 p.f.u./cellule pendant 48 heures. Les cellules étaient récupérées par grattage, centrifugées à 500 g pendant 10 minutes et remises en suspension dans 1 mL de DMEM 2% SVF, constituant le « master stock ». Le stock de travail était obtenu comme précédemment en infectant 5 à 10 flasques de 175 cm² puis resuspension des cellules après 48 heures dans 5 mL de DMEM 2% SVF. Les virus amplifiés, après 3 cycles de congélation/décongélation puis sonication ont été conservés à -80°C.

B.2.4.6. Virus utilisés au cours de ce travail.

Le virus parental vv811 a été fourni par Michelle Barry (Université d'Alberta, Canada). Par rapport à la souche parentale, VACV Copenhagen, 55 gènes, dont tous les gènes antiapoptotiques étudiés dans ce travail sont manquants dans le virus vv811. Seule la protéine E3 qui possède des propriétés antiapoptotiques reste présente (Perkus *et al.*, 1991) (Figure 14). Les virus VACV WT (wild type), souche Western Reserve (WR), dont les gènes *B13R*, *NIL* ont été supprimés (WRΔB13, WRΔN1) et le virus VACV WT, souche Evans, dont le gène *GAAP* a été supprimé (EvansΔGAAP) étaient disponibles au laboratoire et décrits précédemment (Bartlett *et al.*, 2002; Gubser *et al.*, 2007; Kettle *et al.*, 1995). Les virus mutants vv811 dans lesquels ont été incorporés individuellement les gènes *B13R*, *FIL*, *GAAP* et *NIL* ont été obtenus par le protocole d'infection/transfection décrit précédemment (vv811-B13, vv811-F1, vv811-GAAP et vv811-N1). Pour cela un plasmide pUC13 disponible au laboratoire, contenant le gène *Ecogpt* fusionné avec un gène codant pour la EGFP dans le même cadre de lecture, a été utilisé (Ember *et al.*, 2012). Les gènes *B13R*, *FIL* et *NIL* ont été flanqués dans ce plasmide par 250 paires de bases du gène *A48R* codant pour la thymidylate kinase (TmpK) (Hughes *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1989a) afin d'insérer les protéines antiapoptotiques dans ce gène non nécessaire à la réplication virale *in vitro*. vv811-GAAP a été obtenu de la même manière par un ancien membre du laboratoire, le Docteur Benjamin Johnson, à la différence que GAAP a été inséré dans le gène *I4L* codant pour la ribonucléotide réductase large subunit (RR), elle aussi non nécessaire à la réplication virale (Tengelsen *et al.*, 1988). Afin de s'affranchir au maximum de différence de niveau d'expression de ces protéines, il a été décidé de placer leur expression sous le contrôle du même promoteur précoce et puissant, P7.5. Les gènes *B13R*, *FIL*, *GAAP* et *NIL* ont été placés, par clonage moléculaire sous le contrôle de ce promoteur. Le virus VACV WR dont

l'expression du gène *FIL* a été supprimée (WR Δ F1) n'étant pas disponible au laboratoire, il a été obtenu par la même méthode (taille de chaque région flanquante du gène *FIL* : 250 paires de bases).

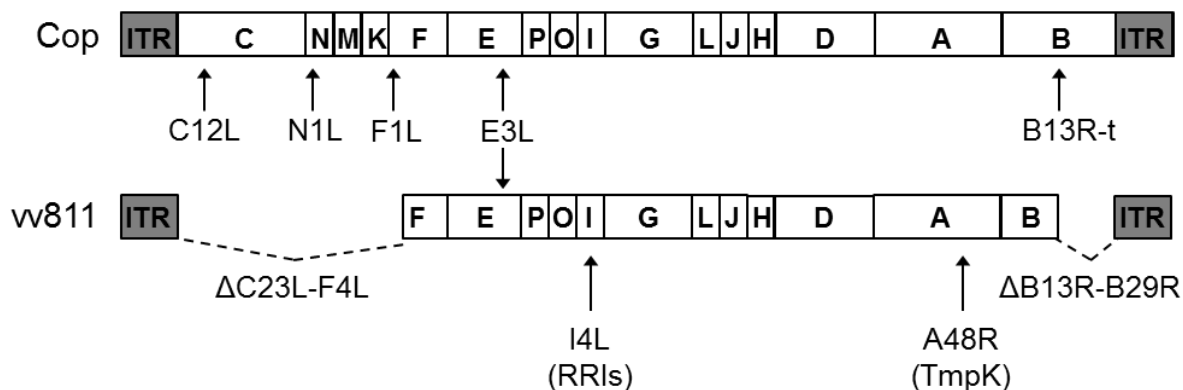


Figure 14 : Représentation schématique du virus vv811 et positions des gènes antiapoptotiques de vaccinia virus.

C12L est l'équivalent dans la souche Copenhagen de *B22R* dans la souche WR. *B13R-t* signifie que la protéine est tronquée.

B.2.5. Apoptose

B.2.5.1. Stimulus utilisés

Les drogues utilisées pour induire l'apoptose ont été la staurosporine (0,5 μ M pendant 8 heures), la doxorubicine (3 μ M pendant 30 heures) ou le TNF- α humain (10 μ g/mL, Peprotech) couplé avec du cycloheximide (30 μ g/mL pendant 16 heures, Sigma). Les virus ont été utilisés, sauf cas précisés, à une concentration de 2.5 p.f.u./cellule pour induire l'apoptose.

B.2.5.2. Effet cytopathogène (ECP)

L'ECP en réponse aux différents stimuli a été observé et des photos ont été prises en utilisant un microscope inversé Zeiss AxioVert A1 et le logiciel d'acquisition Axiovision.

B.2.5.3. Mesure de l'apoptose

Le clivage de PARP-1, détecté par immunoblot, a été utilisé. Les cellules étaient ensemencées dans des plaques de 6 puits puis stimulées comme décrit précédemment. Les cellules étaient collectées, lysées puis les protéines séparées par SDS-PAGE et détectées avec

les anticorps appropriés (cf précédemment). L'intensité du signal a pu être obtenue et l'expérience ayant été répétée trois fois, une analyse statistique a pu être réalisée.

L'activité des caspases 3 et 7 a été détectée en utilisant le kit Caspase 3/7 Glo® (Promega) en accord avec les recommandations du fournisseur en réponse aux différents stimuli dans des plaques à 96 puits. Les puits étaient en triplicat ou quadruplicat, permettant une analyse statistique des résultats.

B.2.5.4. Mesure de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été mesurée dans des plaques à 96 puits en utilisant le kit Cell Titer-Blue® (Promega) en accord avec les recommandations du fournisseur. Les puits étaient en triplicat ou quadruplicat, permettant une analyse statistique des résultats.

B.2.6. Analyses des données et analyses statistiques

Chaque expérience a été reproduite au moins trois fois. Les données numériques étaient importées dans le logiciel GraphPad Prism 5 grâce auquel les représentations graphiques ont été obtenues. Les données ont été analysées en utilisant un *t*-test de Student sur des valeurs appariées, avec une correction de Welch si nécessaire lorsque les variances différaient.

B.3. Résultats

B.3.1. Développement d'une plateforme pour tester les capacités antiapoptotiques de molécules virales ou cellulaires

B.3.1.1. Construction de lignées cellulaires polyclonales exprimant les molécules antiapoptotiques de VACV

Après clonage moléculaire des gènes *B13R*, *FIL*, *GAAP* et *NIL* individuellement dans le plasmide d'expression lentivirale bicistronique exprimant aussi la EGFP, les lentivirus correspondants ont été produits et utilisés pour transduire les cellules U2-OS (voir méthode). En parallèle, le même plasmide contenant le gène codant pour Bcl-xL a été également obtenu pour servir de control positif. Le plasmide sans insert, n'exprimant que la EGFP a été utilisé comme contrôle négatif (EV : empty vector). La vérification de l'expression de chaque protéine dans les cellules transduites et triées pour être 100% positives pour la EGFP a ensuite été réalisée tout d'abord par immunoblot (Figure 15 a). La présence des molécules d'intérêt a été confirmée. On peut remarquer que la détection de GAAP nécessitait une exposition plus importante. La présence de F1 n'a pu être confirmée par immunoblot qu'en présence de l'inhibiteur pharmacologique du protéasome MG132 (Figure 15 b). Cette particularité de l'expression de F1 en isolation avait été décrite précédemment (Postigo *et al.*, 2006). L'expression des protéines a également été vérifiée par immunofluorescence (voir méthode). La présence des molécules étudiées et leur localisation attendue en fonction des données de la littérature ont été confirmées. Cependant, N1, protéine normalement présente uniquement dans le cytoplasme, s'est révélée être également nucléaire, de façon inattendue (Figure 15 c).

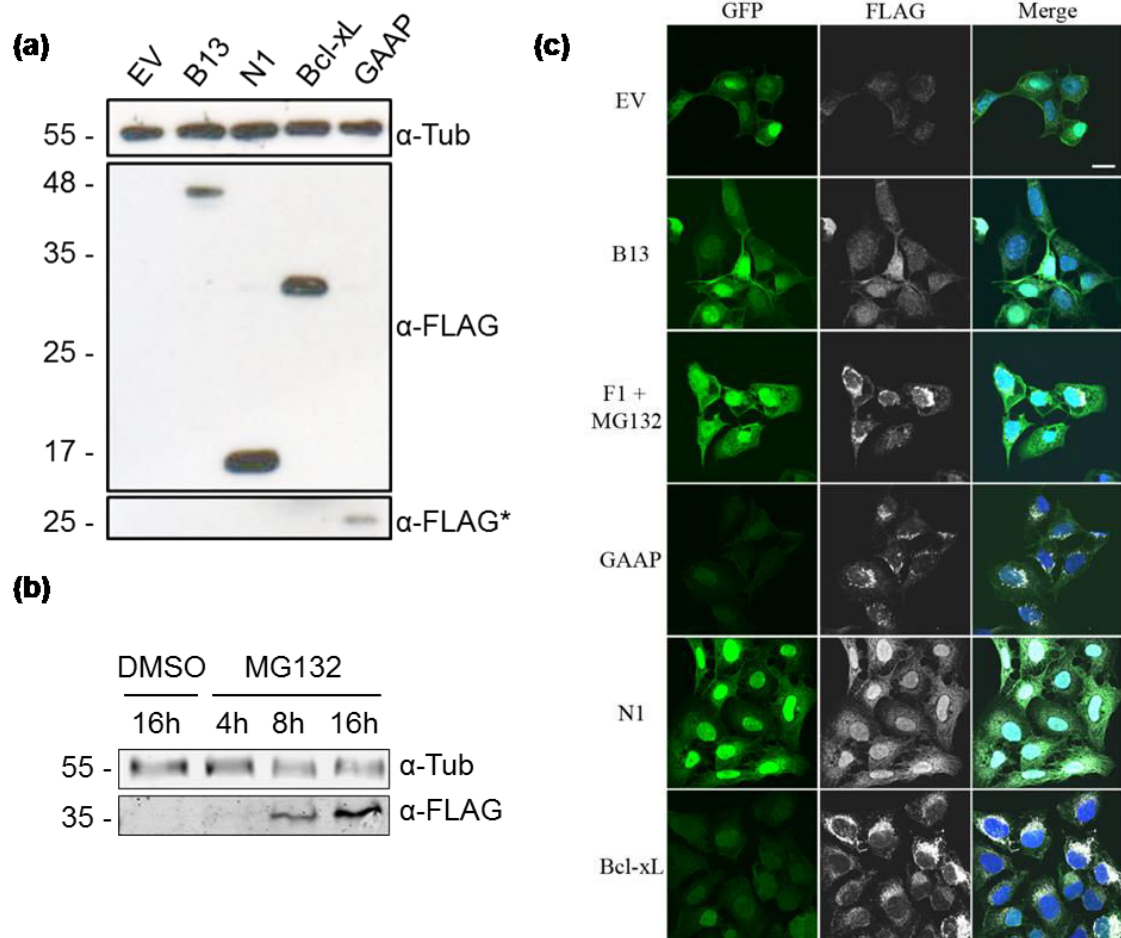


Figure 15 : Expression des protéines antiapoptotiques de VACV dans les cellules U2-OS transduites par lentivirus.

(a) Les lysats cellulaires des cellules transduites par lentivirus ont été analysés par SDS-PAGE et immunoblot avec les anticorps indiqués. Les tailles moléculaires sont indiquées sur la gauche en kDa. L'astérisque précise un temps d'exposition plus long. (b) L'addition de MG132 était nécessaire pour détecter la protéine F1 par immunoblot. (c) Immunofluorescence. Les cellules ont été fixées puis marquées avec un anticorps anti-FLAG de lapin. L'expression de GFP, des protéines taguées avec FLAG et ces images superposées avec la coloration DAPI sont montrées dans les 3 colonnes correspondantes. Barre d'échelle : 20 μ m.

B.3.1.2. Inhibition de l'apoptose extrinsèque par les cellules U2-OS exprimant les molécules antiapoptotiques de VACV

La voie extrinsèque de l'apoptose a été déclenchée par du TNF- α associé à du cycloheximide et plusieurs méthodes ont été utilisées pour mesurer l'action de ce traitement (voir méthode).

B.3.1.2.1. Microscopie

Les changements morphologiques observés et le détachement des cellules EV ont permis de conclure que le stimulus était efficace, entraînant probablement la mort des cellules.

L'absence d'ECP, suite au stimulus, a uniquement été observée dans les cellules exprimant la protéine B13 de VACV, de façon très nette. Cette protection fournie par B13 était comparable à celle observée dans les cellules Bcl-xL, utilisées comme contrôle positif. Les cellules exprimant F1, GAAP et N1 ressemblaient au contrôle négatif, laissant suggérer une activité de protection nulle ou très faible vis-à-vis du stimulus (Figure 16).

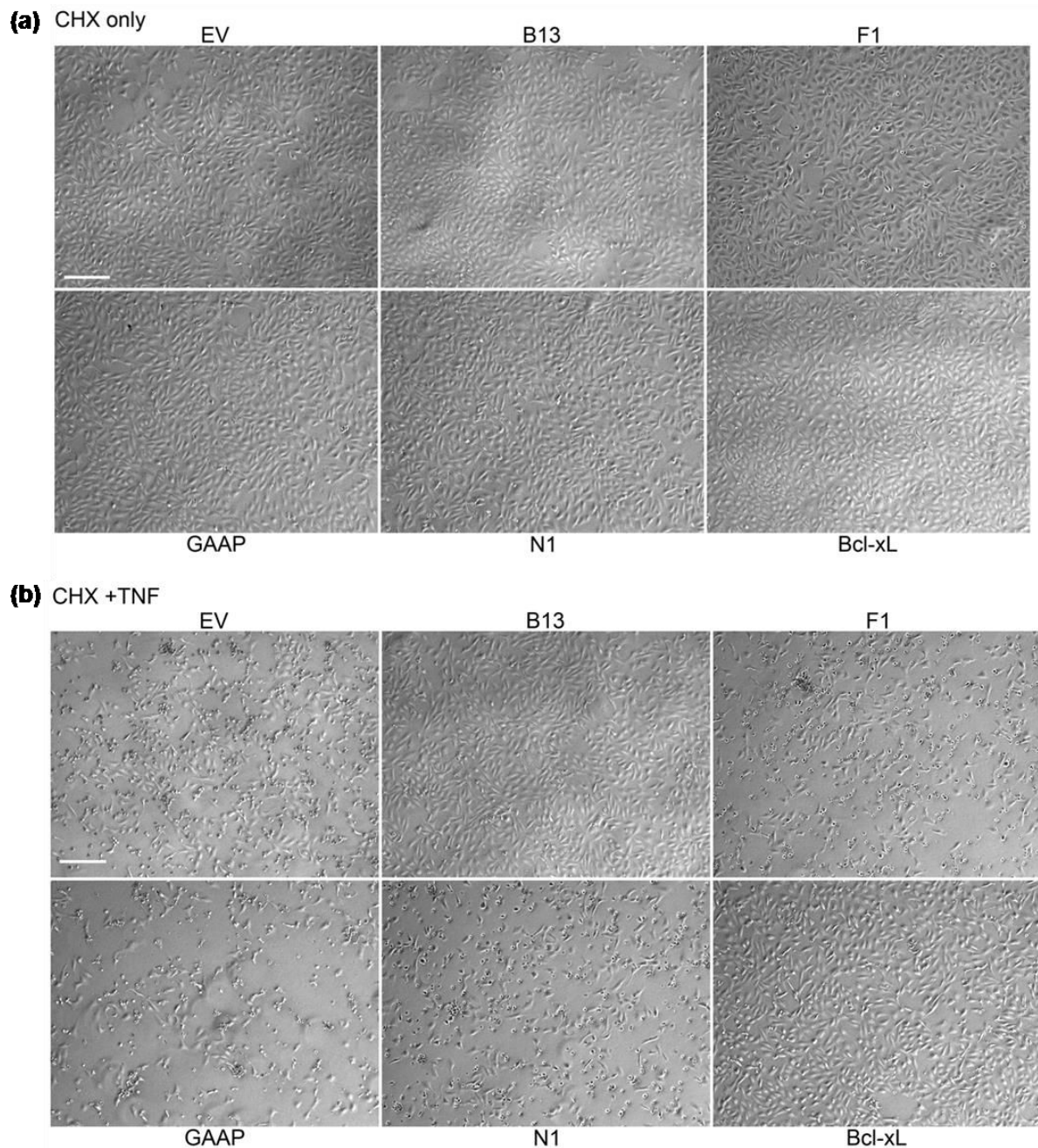


Figure 16 : Apoptose extrinsèque dans les cellules U2-OS transduites par lentivirus observée en microscopie.

L'apoptose a été induite par du TNF- α (10 μ g/mL) et du cycloheximide (30 μ g/mL) pendant 16 heures puis les cellules ont été photographiées. (a) Cellules traitées par cycloheximide seul. (b) Cellules traitées par cycloheximide et TNF- α . Barre d'échelle : 200 μ m.

B.3.1.2.2. Clivage de PARP-1

Le clivage de PARP-1, marqueur de l'apoptose, étudié par immunoblot (voir méthode) a confirmé les données microscopiques puisque seules les lignées cellulaires exprimant B13 et Bcl-xL sont apparues négatives pour le clivage de PARP-1. Les expériences ont été répétées 3 fois, permettant une analyse quantitative des résultats confirmant que B13 était la seule molécule étudiée de VACV capable d'inhiber l'apoptose extrinsèque. L'immunoblot présenté dans la figure est représentatif des 3 expériences (Figure 17 a).

B.3.1.2.3. Activation des caspases effectrices 3/7

Le kit Caspase 3/7 glo® (Promega, voir méthode) permet d'obtenir des résultats quantitatifs quant à l'activation des caspases effectrices en réponse à un stimulus. Dans cette expérience, l'addition de TNF- α et cycloheximide a entraîné une augmentation de l'activité des caspases effectrices de 8 fois dans les cellules U2-OS EV. Cette augmentation n'a été supprimée que dans les cellules exprimant B13 et Bcl-xL de façon drastique (Figure 17 b).

Ces résultats, considérés dans leur ensemble, montrent que dans ce contexte d'isolation, seule la protéine B13 de VACV est capable d'inhiber l'apoptose extrinsèque induite par le TNF- α et le cycloheximide. Ces résultats sont en accord avec la capacité de B13 à bloquer l'activité de la caspase 8 initiatrice.

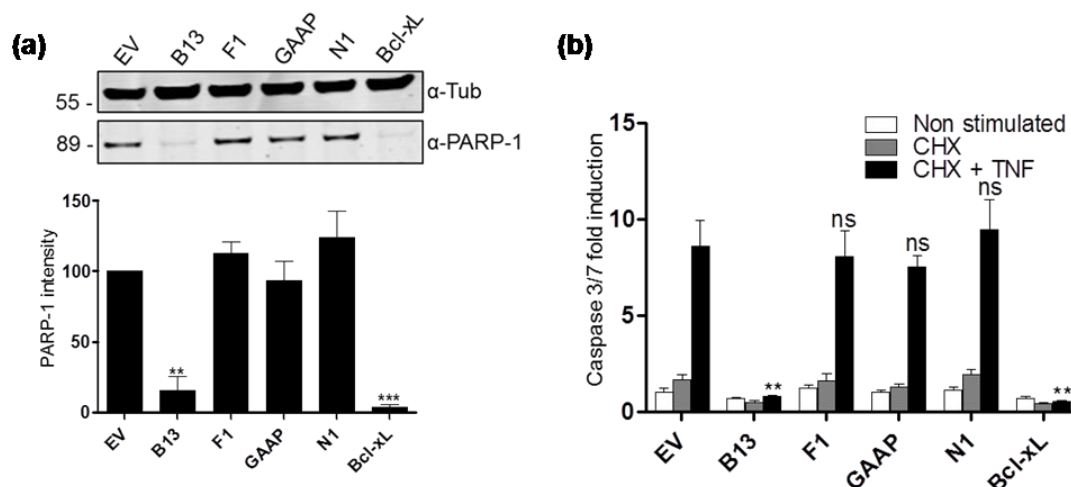


Figure 17 : Apoptose extrinsèque dans les cellules U2-OS transduites par lentivirus.

Les cellules ont été traitées par du TNF- α (10 μ g/mL) et du cycloheximide (30 μ g/mL) pendant 16 heures. (a) Les lysats cellulaires de puits de plaque de 6 puits ont été analysés par SDS-PAGE et les anticorps indiqués ont été utilisés pour l'immunoblot. Un immunoblot représentatif de 3 immunoblots est présenté. Les données quantitatives ont été obtenues par intégration de l'intensité des bandes des 3 répétitions en utilisant un système Li-COR et le logiciel Odyssey. L'intensité du signal de PARP-1 a été normalisée par rapport à l'intensité du signal de la tubuline pour tous les échantillons. (b) L'activité des caspases 3/7 dans les cellules traitées comme en (a) mais dans des puits de plaque 96 puits a été mesurée par le kit Caspase 3/7 Glo®. Les données quantitatives représentées indiquent la moyenne et la déviation standard du rapport entre l'activité observée dans les cellules étudiées par rapport aux U2-OS-EV non traitées. Le *t*-test de Student a été utilisé (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) pour établir la significativité statistique des différences observées.

B.3.1.3. Inhibition de l'apoptose intrinsèque par les cellules U2-OS exprimant les molécules antiapoptotiques de VACV.

La voie intrinsèque de l'apoptose a été déclenchée par des stimuli différents incluant l'utilisation de staurosporine (STS) et de doxorubicine. Comme précédemment, plusieurs méthodes ont été utilisées pour mesurer l'action de ces traitements (voir méthode).

B.3.1.3.1. Clivage de PARP-1

Suite au traitement des cellules par la staurosporine, le clivage de PARP-1 a été étudié par immunoblotting comme précédemment. De nouveau, B13 protège les cellules contre ce clivage de manière très nette. GAAP et N1, quant à elles, montrent un effet intermédiaire. L'analyse quantitative de ce clivage de PARP-1 confirme ce résultat visuel (Figure 18 a).

B.3.1.3.2. Activation des caspases effectrices 3/7

L'activité des caspases 3/7 mesurée en réponse à la staurosporine dans les cellules U2-OS-EV traitées a montré une induction de 5 fois par rapport aux cellules non traitées. Ce chiffre s'est trouvé diminué dans chaque lignée cellulaire exprimant une protéine antiapoptotique de VACV, et les différences étaient statistiquement significatives (Figure 18 b). Le même niveau d'induction a été observé suite au traitement par doxorubicine et de nouveau toutes les protéines de VACV ont montré une capacité inhibitrice de l'activation des caspases (Figure 18 c). A chaque fois, B13 apparaît comme l'inhibiteur le plus puissant dans ce contexte.

Ces résultats, considérés dans leur ensemble, montrent que dans ce contexte d'isolation, toutes les protéines de VACV sont capables d'inhiber l'apoptose intrinsèque induite par la staurosporine ou la doxorubicine. De nouveau, B13 apparaît comme étant l'inhibiteur le plus puissant par rapport aux autres protéines de VACV. Il faut noter toutefois que F1 ne démontre pas de pouvoir inhibiteur de l'apoptose par la méthode du clivage de PARP-1 semi quantitative et que son activité apparaît seulement dans la méthode quantitative, à un niveau à peu près équivalent à GAAP et N1.

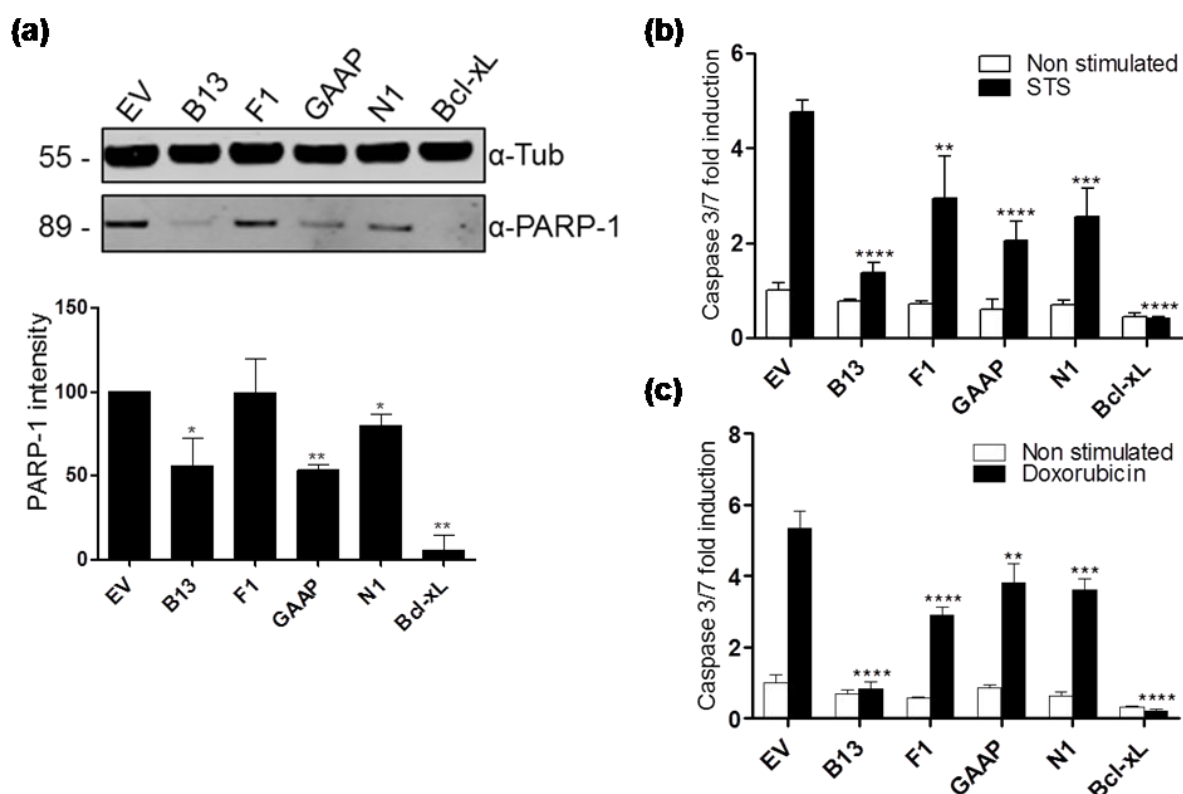


Figure 18 : Apoptose intrinsèque dans les cellules U2-OS transduites par lentivirus.

(a) Les cellules ont été traitées avec de la staurosporine (0,5 μ M, 8 heures). Les lysats cellulaires de puits de plaque de 6 puits ont été analysés par SDS-PAGE et les anticorps indiqués ont été utilisés pour l'immunoblot. Un immunoblot représentatif de 3 immunoblots est présenté. Les données quantitatives ont été obtenues par intégration de l'intensité des bandes des 3 répétitions en utilisant un system Li-COR et le logiciel Odyssey. L'intensité du signal de PARP-1 a été normalisée par rapport à l'intensité du signal de la tubuline pour tous les échantillons. (b, c) Les cellules en (b) ont été traitées comme en (a) et les cellules en (c) ont été traitées avec de la doxorubicine (3 μ M, 30 heures) dans des puits de plaque 96 puits. L'activité des caspases 3/7 a été mesurée par le kit Caspase 3/7 Glo®. Les données quantitatives représentées indiquent la moyenne et la déviation standard du rapport entre l'activité observée dans la cellule étudiée par rapport aux U2-OS-EV non traitées. Le *t*-test de Student a été utilisé (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$) pour établir la significativité statistique des différences observées.

B.3.1.4. Conclusion

La transduction de cellules U2-OS par des lentivirus afin qu'elles expriment des protéines de VACV a permis d'établir des lignées polyclonales stables. Cet outil a été utilisé pour tester les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose, déclenchées par des drogues utilisées couramment dans ce domaine. Nos résultats confirment que toutes les protéines de VACV étudiées dans ce travail possèdent des propriétés antiapoptotiques. Dans ce contexte, B13 est non seulement la seule à inhiber à la fois la voie extrinsèque et la voie intrinsèque mais également la plus puissante dans la voie intrinsèque comparativement à F1, GAAP et N1.

B.3.2. Etude des molécules anti-apoptotiques de VACV exprimées *in trans*

B.3.2.1. vv811, un virus déficient capable d'induire l'apoptose

vv811 ne possédant pas les molécules antiapoptotiques étudiées, nous avons posé l'hypothèse que ce virus déficient devrait, à lui seul, sans ajout d'aucune drogue, être à l'origine du déclenchement de l'apoptose dans les cellules infectées. Pour tester celle-ci, nous avons mesuré l'activité des caspases 3/7 avec le réactif Caspase 3/7 Glo® suite à l'infection de cellules U2-OS parentales par ce virus (2,5 p.f.u./cellule) et comparé cette activation à celle du virus VACV WR à différents temps suivant l'infection (2, 5, 10 et 24 heures). Les résultats de cette expérience montrent tout d'abord que VACV WR, après 24 heures d'infection, n'a pas induit l'activation des caspases effectrices, au contraire il y aurait une légère diminution du taux d'induction. Ceci s'explique par la présence de B13, E3, F1 et N1 dans VACV WR, ces protéines empêchant VACV WR d'induire l'apoptose. Des résultats similaires, non montrés ici, ont été obtenus avec la souche parentale de vv811, VACV Copenhagen. Ensuite, conformément à notre hypothèse, on observe que l'infection par vv811 entraîne une activation des caspases 3/7, modérée mais statistiquement significative après 2 et 5 heures, importante et très significative statistiquement, après 10 et 24 heures (Figure 19). Ce virus déficient devient donc un outil d'induction de l'apoptose à lui-seul, sans aucun doute plus pertinent physiologiquement que les drogues utilisées précédemment pour étudier des protéines virales. Dans la suite de notre travail, suite aux résultats présentés ici, les infections seront réalisées avec 2,5 p.f.u./cellules pendant 24 heures.

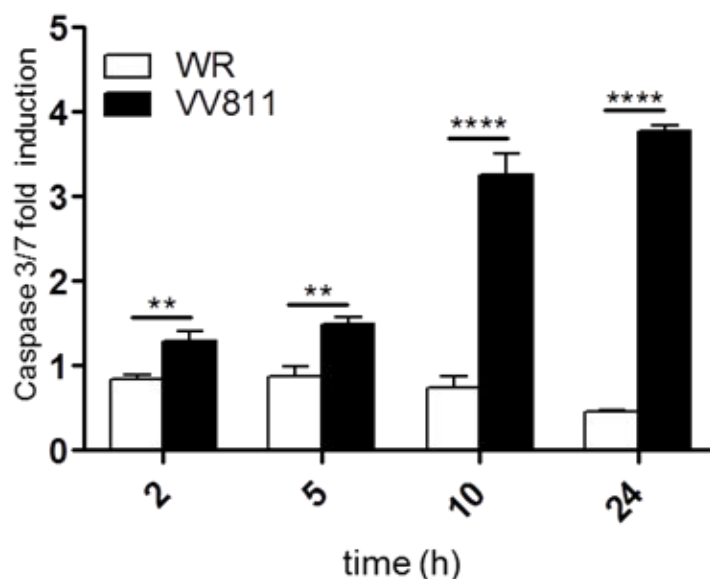


Figure 19 : vv811 peut induire l'apoptose dans les cellules U2-OS.

Les cellules ont été infectées à 2,5 p.f.u./cellule par VACV WR ou vv811 pendant les temps indiqués dans des puits de plaque 96 puits et l'activité des caspases 3/7 a été mesurée avec caspase 3/7 Glo®. Les données quantitatives sont normalisées par rapport à des cellules non infectées pour obtenir un taux d'induction. La moyenne et la déviation standard du rapport entre l'activité observée dans les cellules U2-OS infectées et non infectées sont représentées. Le *t*-test de Student a été utilisé (** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$) pour établir la significativité statistique des différences observées.

B.3.2.2. Inhibition *in trans* de l'apoptose induite par vv811 dans les cellules U2-OS exprimant les molécules antiapoptotiques de VACV

Tout naturellement, nous avons décidé de tirer avantage des propriétés proapoptotiques de vv811 pour tester l'induction induite par ce virus sur nos lignées cellulaires et évaluer si les protéines issues de la même famille virale, exprimées *in trans* pourraient avoir un effet sur l'activation des caspases effectrices. Après 24 heures d'infection (2,5 p.f.u./cellules), les résultats montrent que parmi les protéines virales testées, seules B13 et F1 inhibent l'activité proapoptotique de vv811. Une fois encore, l'activité de B13 est très importante et très significative statistiquement. La protection fournie par F1 dans ce contexte est plus modérée mais néanmoins significative statistiquement. En revanche, contrairement aux résultats observés dans le chapitre précédent après stimulation par des drogues entraînant l'apoptose intrinsèque, GAAP et N1 sont incapables d'inhiber l'activation des caspases effectrices suite à l'infection par vv811 (Figure 20).

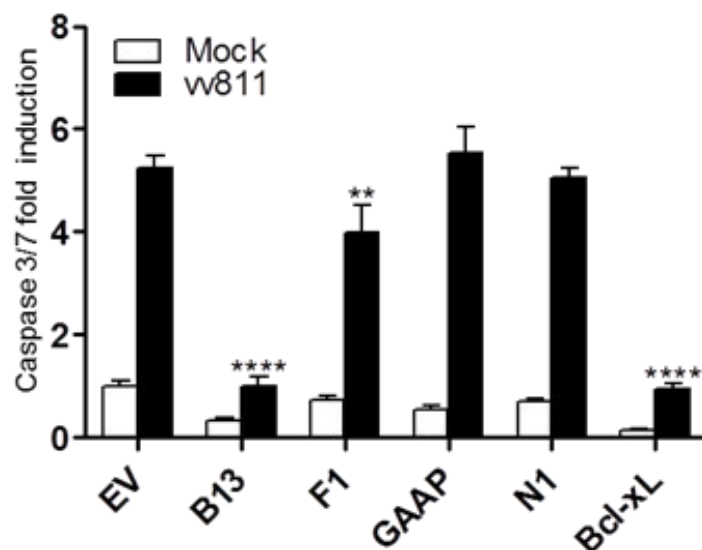


Figure 20 : Apoptose induite par vv811 sur les cellules U2-OS transduites par lentivirus. Les cellules ont été infectées à 2,5 p.f.u./cellule par vv811 pendant 24 heures dans des puits de plaque 96 puits et l'activité des caspases 3/7 a été mesurée avec caspase 3/7 Glo®. Les données sont normalisées par rapport à des cellules non infectées pour obtenir un taux d'induction. La moyenne et la déviation standard du rapport entre l'activité observée dans les cellules U2-OS infectées et non infectées sont représentées. Le *t*-test de Student a été utilisé (** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$) pour établir la significativité statistique des différences observées.

B.3.2.3. L'expression des protéines antiapoptotiques de VACV *in trans* n'améliore pas la croissance virale

vv811 est un virus déficient. Les titres viraux obtenus après amplification (voir méthode) sont bien inférieurs (1 à 2 log) à ceux obtenus avec le virus parental. Ayant à disposition les lignées cellulaires, dérivées des cellules U2-OS, exprimant les protéines virales de VACV, nous avons formulé l'hypothèse que la croissance du virus pourrait être améliorée en cultivant le virus sur ces cellules. Les résultats ne confirment pas notre hypothèse et la courbe de croissance de vv811 est identique sur les cellules U2-OS exprimant B13, F1, GAAP et N1 comparées aux U2-OS-EV. L'infection a été réalisée avec 0,1 p.f.u./mL (multi-step growth curve) et les titres viraux à 24 et 48 heures ont été déterminés (Figure 21).

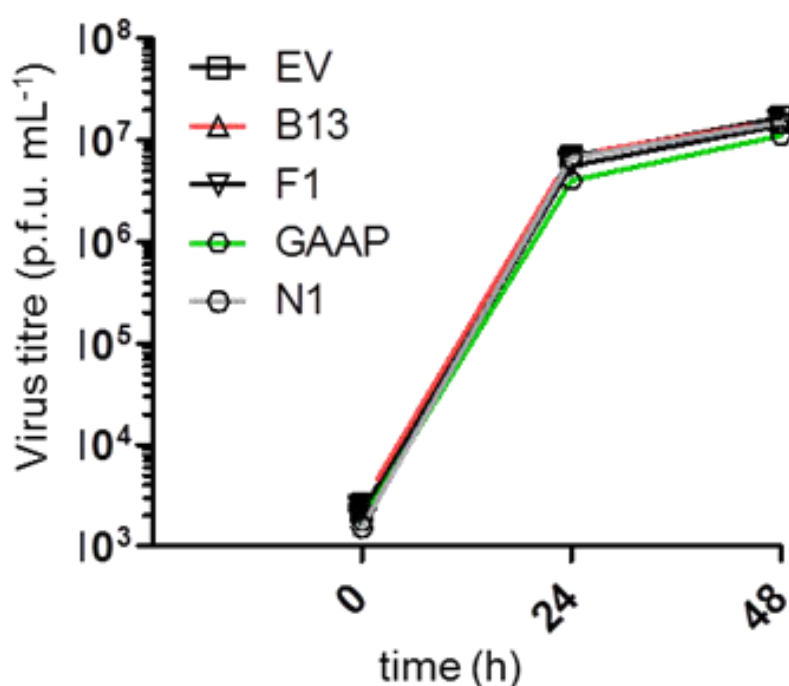


Figure 21 : Courbes de croissance de vv811 sur les cellules U2-OS transduites par lentivirus.

Les cellules ont été infectées, en duplicat, avec 0,1 p.f.u./cellule et collectées aux temps indiqués pour mesures des titres viraux à ces différents temps sur cellules BSC-1. Les titres viraux ont été obtenus par la méthode de dilution puis comptage des plaques obtenues.

B.3.2.4. Conclusion.

Après avoir confirmé que vv811 était capable d'induire l'apoptose sans l'aide d'aucun autre stimulus, nous avons testé les capacités de nos cellules U2-OS exprimant les protéines antiapoptotiques virales *in trans* à prévenir l'activation des caspases 3/7 suite à l'infection par vv811. Comme précédemment, B13 montre les propriétés antiapoptotiques les plus puissantes. Alors que F1, dans ce contexte, possède une capacité modérée à inhiber l'apoptose, GAAP et N1, contrairement aux résultats précédents, ne peuvent empêcher l'apoptose induite par vv811. Il est intéressant de voir que ni les cellules exprimant B13 ou F1, et *a fortiori* ni les cellules exprimant GAAP ou N1 ne peuvent améliorer la croissance de ce virus déficient.

B.3.3. Construction de virus recombinants

B.3.3.1. Construction du virus VACV WRΔF1

Le virus VACV dans lequel le gène *FIL* aurait été supprimé n'était pas présent au laboratoire et nous l'avons donc construit (voir méthode). Comme précédemment, après design et clonage moléculaire, nous avons obtenu le plasmide ne contenant que les régions flanquantes du gène *FIL*. Ce plasmide contenait également les gènes *Ecogpt* et *EGFP*. La transfection par ce plasmide des cellules infectées par le virus parental WR aura permis par recombinaison son intégration dans le génome viral (voir méthode). Après l'étape de résolution, la vérification de l'obtention du virus muté d'intérêt a été obtenue par l'analyse génomique du virus mutant par PCR. Nous avons ensuite vérifié l'absence d'expression de la protéine F1 par immunoblot. Ces résultats nous ont confirmé l'obtention du virus WRΔF1 (Figure 22).

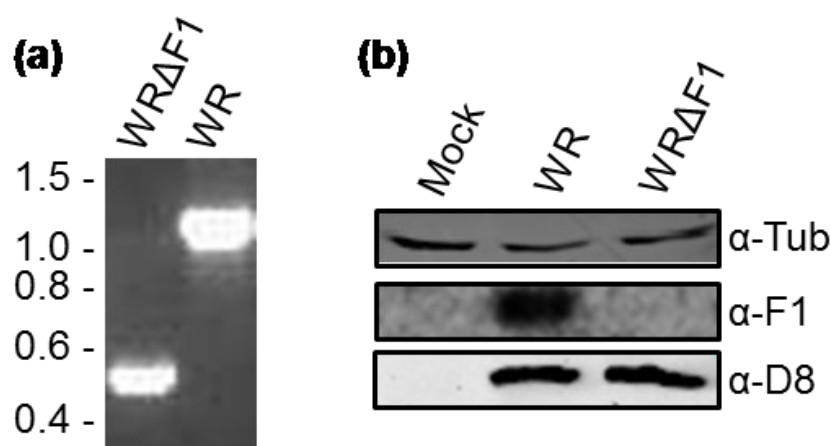


Figure 22 : Construction du virus VACV WRΔF1 (délétion du gène *FIL*).

(a) Après résolution du virus, son génotype a été analysé par PCR après extraction de l'ADN par traitement à la protéinase K à partir de cellules BSC-1 infectées. Les amorces utilisées ont été les amorces des régions flanquantes du gène *FIL*. Les marqueurs de taille moléculaires sont représentés sur la gauche de la figure en kilo paires de bases. (b) Des cellules BSC-1 ont été infectées (5 p.f.u./cellule) avec le virus parental WR et le virus mutant WRΔF1 pendant 8 heures. Les lysats cellulaires ont été analysés par immunoblot en utilisant le sérum polyclonal spécifique anti-F1 comme indiqué. Des anticorps contre la protéine D8, contrôle de l'infection virale, et contre la tubuline, contrôle cellulaire, ont été utilisés.

B.3.3.2. Construction de virus vv811 recombinants exprimant les protéines antiapoptotiques de VACV

Afin de déterminer si l'expression des protéines antiapoptotiques de VACV *in cis* pouvaient donner des résultats différents de ceux exposés dans les parties précédentes, nous avons construits des virus vv811 exprimant individuellement B13, F1, GAAP et N1. Ces virus ont été obtenus par mutagenèse basée sur la sélection dominante transitoire des virus ayant incorporé un gène de résistance à différentes drogues (voir méthode). Ces gènes sont sous le contrôle du même promoteur précoce et fort P7.5.

B.3.3.2.1. Vérification du génotype des virus recombinants

Après résolution des virus mutants, nous avons vérifié par PCR sur le génome viral que ceux-ci contenaient bien les gènes d'intérêt en utilisant des amorces dans les régions flanquantes. Les plasmides ayant servi à l'étape de recombinaison sont utilisés comme contrôle positif. Deux PCR ont été réalisées car *B13R*, *FIL* et *NIL* ont été introduits dans le gène de la thymidilate kinase (*TmpK*) et *GAAP* a été introduit dans le gène de la grande sous-unité de la ribonucléotide réductase (*RR*) (voir méthode). Les résultats de la PCR, dans les deux cas, montrent que les produits d'amplification à partir des virus sont similaires à ceux obtenus à partir des plasmides de départ utilisés pour la recombinaison, aux tailles attendues. Alors que les produits de PCR suite à l'insertion de *B13R*, *FIL* et *NIL* sont plus grands que le gène *TmpK* seul, le produit de recombinaison après insertion de *GAAP* est plus petit (Figure 23). Ceci s'explique facilement par le fait que le gène de la *RR* est plus grand que *GAAP* contrairement à *TmpK* et *B13R*, *FIL*, *NIL*.

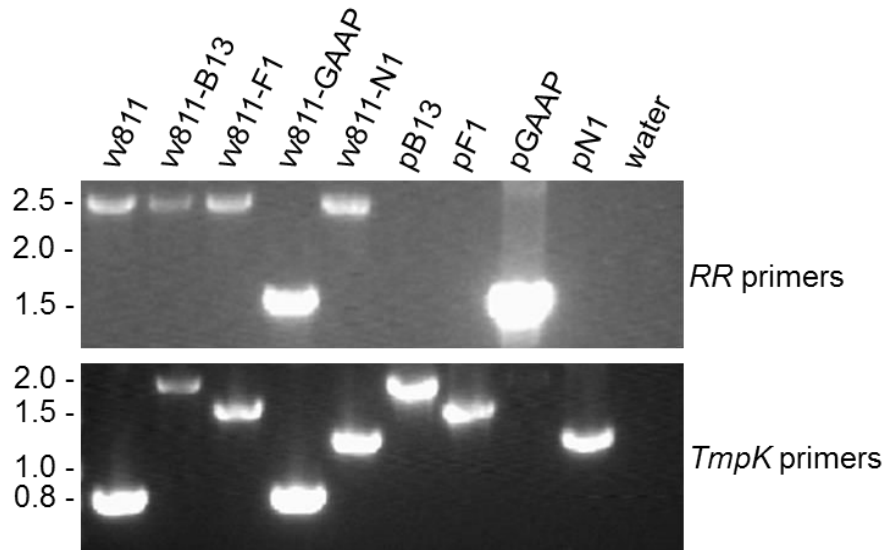


Figure 23 : PCR de vérification de l'insertion des gènes antiapoptotiques de VACV dans le virus vv811.

Après résolution des virus, leurs génotypes ont été analysés par PCR après extraction de l'ADN par traitement à la protéinase K à partir de cellules BSC-1 infectées. Les amorces utilisées ont été les amorces des régions flanquantes du gène *RR* (panel du haut) ou du gène *TnpK* (panel du bas). Les résultats de PCR à partir des virus sont comparés aux résultats de PCR obtenus à partir des plasmides ayant été utilisés pour l'étape de recombinaison, pB13, pF1, pGAAP et pN1. Les marqueurs de taille moléculaires sont représentés sur la gauche de la figure en kilo paires de bases.

B.3.3.2.2. Vérification de l'expression des molécules antiapoptotiques de VACV par les virus recombinants

L'expression des gènes insérés dans vv811 a été confirmée par immunoblot. Les anticorps de lapin anti-B13, anti-F1 et anti-N1 ont été décrits précédemment (voir méthode). L'anticorps de lapin anti-A49 de VACV a été utilisé comme contrôle du niveau d'infection et comme contrôle de l'expression précoce des gènes. Les résultats montrent que B13, F1 et N1 sont exprimés précocement puisqu'ils sont détectés après 4 heures, comme A49. Ceci est conforme à ce qui était attendu du fait qu'ils soient sous le contrôle du promoteur précoce P7.5. Aucune de ces protéines n'est exprimée par le virus vv811 parental (Figure 24 a, b, c). La confirmation de l'expression de GAAP a été réalisée par immunofluorescence devant l'absence d'anticorps de qualité pour la réalisation d'immunoblot. Les résultats d'immunofluorescence des cellules U2-OS infectées pendant 8 heures montrent clairement non seulement la présence de GAAP mais confirment également sa colocalisation avec le marqueur de l'appareil de Golgi, GM130 (Figure 24 d).

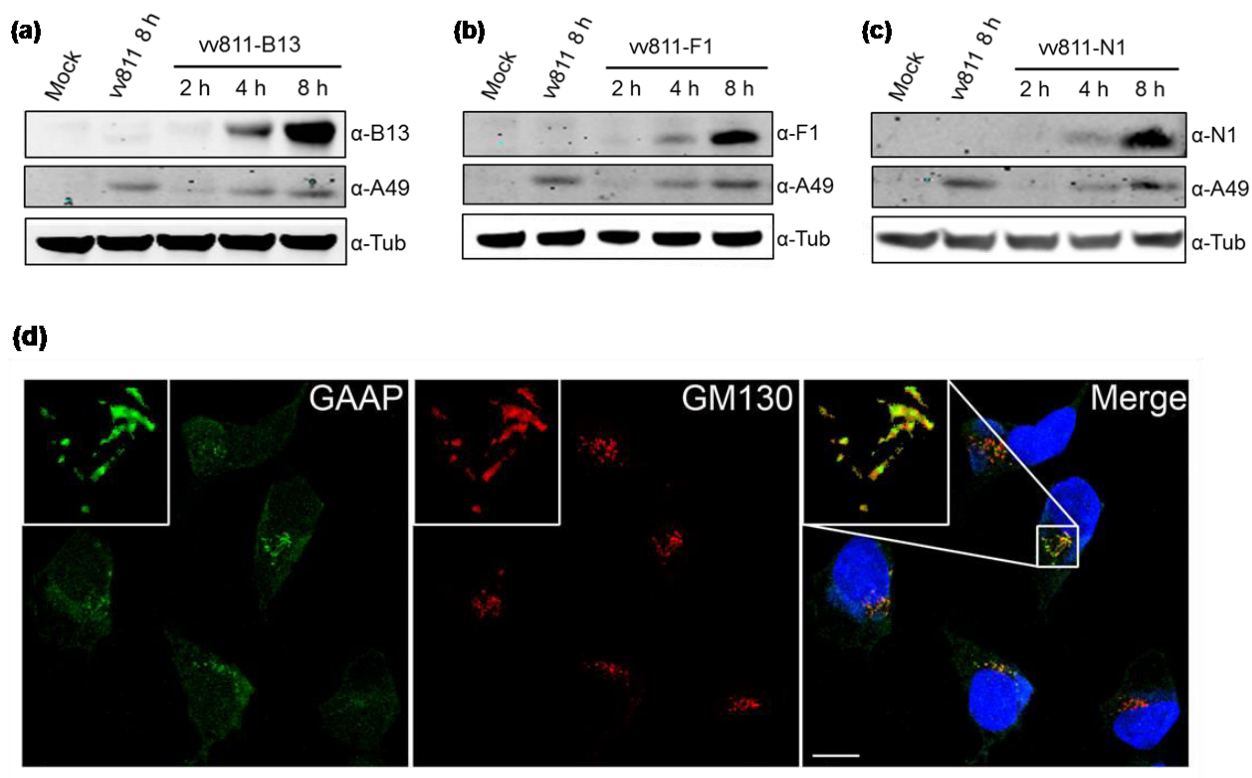


Figure 24 : Expression des protéines antiapoptotiques de VACV à partir des virus recombinants vv811.

(a-c) Des cellules BSC-1 ont été infectées (5 p.f.u./cellule) avec le virus vv811 pendant 8 heures et les virus vv811-B13 (a), vv811-F1 (b), vv811-N1 (c) pendant 2, 4 et 8 heures. Les lysats cellulaires ont été analysés par immunoblot en utilisant les anticorps spécifiques anti-B13, -F1 et -N1 comme indiqué. Des anticorps contre la protéine A49, contrôle de l'infection virale, et contre la tubuline, contrôle cellulaire, ont été utilisés. (d) Les cellules U2-OS ont été infectées avec 2,5 p.f.u./cellule avec le virus vv811-GAAP pendant 8 heures et marquées avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-GAAP ainsi qu'avec un anticorps de souris anti-GM130 spécifique de l'appareil de Golgi. L'ADN a été coloré au DAPI. Barre d'échelle : 20 μ m. La zone présente dans le petit carré blanc de l'image de droite est montrée amplifiée dans chaque image (grand carré dans le coin supérieur gauche).

B.3.3.2.3. L'expression des protéines antiapoptotiques de VACV in cis n'améliore pas la propagation virale ni la réplication

La taille des plaques formées par les virus recombinants a été mesurée sur des cellules U2-OS, 96 heures après infection. Les résultats de ces mesures ne montrent pas de différences significatives entre le virus vv811 parental et les différents virus recombinants. L'expression des protéines antiapoptotiques ne facilite ni ne diminue la propagation du virus au sein de ces cellules (Figure 25).

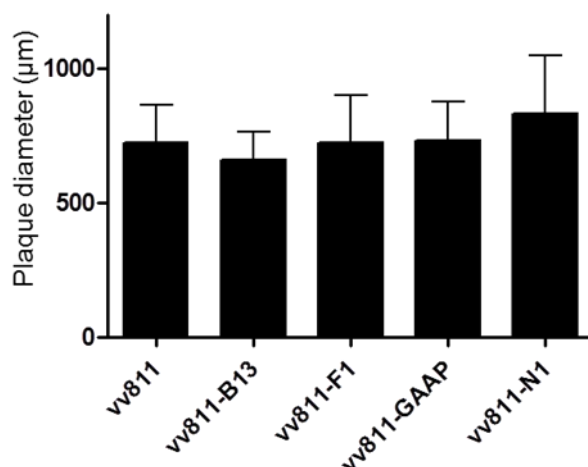


Figure 25 : L'expression des protéines antiapoptotiques de VACV *in cis* n'affecte pas la propagation du virus vv811.

Les cellules U2-OS ont été infectées avec les virus indiqués pendant 96 heures. Les cellules ont été colorées au cristal violet et les diamètres d'au moins 15 plaques ont été mesurés. La moyenne et la déviation standard du diamètre en µm des plaques sont représentées.

La réplication virale a été testée en mesurant les titres viraux obtenus après infection de cellules U2-OS pendant 24 heures avec 2,5 p.f.u./cellule (voir méthode). Aucune différence n'a été observée entre les virus recombinants et le virus vv811 parental (Figure 26).

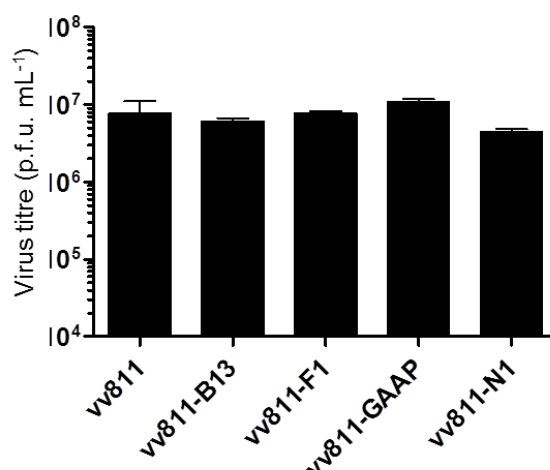


Figure 26 : L'expression des protéines antiapoptotiques de VACV *in cis* n'affecte pas la réplication du virus vv811.

Les cellules U2-OS ont été infectées, en duplicat, avec les virus indiqués (2,5 p.f.u./cellule) pendant 24 heures. Les cellules ont été collectées dans leur milieu de culture et les titres viraux à 24 heures ont été obtenus par la méthode de dilution puis comptage des plaques obtenues. La moyenne et la déviation standard des titres viraux à 24 heures sont représentées.

B.3.3.2.4. Conclusion

A partir du virus parental vv811, les virus recombinants vv811-B13, vv811-F1, vv811-GAAP et vv811-N1 ont été obtenus. Ces virus expriment les protéines précocement sous le contrôle du même promoteur fort P7.5. Dans les conditions testées dans ce travail, l'expression *in cis* des protéines antiapoptotiques de VACV ne confère aucun avantage par rapport au virus parental quant à la réplication ou la propagation virale.

B.3.4. Inhibition *in cis* de l'apoptose induite par les virus recombinants vv811 exprimant les molécules antiapoptotiques de VACV

Comme nous l'avons testé précédemment, VACV, du fait de la présence de plusieurs gènes exprimant des protéines antiapoptotiques au sein de son génome, n'induit pas d'activation des caspases 3/7 dans les conditions testées et il ne peut donc être utilisé comme un inducteur efficace de l'apoptose. Dans le travail qui suit, nous avons tiré profit de l'existence au laboratoire de mutants de VACV pour les protéines antiapoptotiques : WR Δ B13, WR Δ N1 et Evans Δ GAAP et du virus W Δ RF1 que nous avons construit. Rappelons que GAAP est naturellement absent de la souche Western Reserve de VACV mais qu'il est présent dans la souche Evans de VACV. Nous avons également utilisé les virus vv811 mutants décrits dans la section précédente.

B.3.4.1. Comparaison de l'apoptose induite dans les cellules U2-OS par les virus VACV WT parentaux et recombinants et vv811 parental et recombinants

Afin d'étudier l'impact des protéines antiapoptotiques de VACV exprimées *in cis* par le virus vv811 sur l'apoptose induite par ce virus, nous avons infecté les cellules U2-OS (2,5 p.f.u./cellule) pendant 24 heures et mesuré l'activation des caspases 3/7 avec le réactif Caspase 3/7 Glo®. De plus, afin de confirmer la performance de notre approche utilisant des virus vv811 recombinants pour étudier l'apoptose, nous avons, en parallèle, infecté les cellules U2-OS (2,5 p.f.u./mL) avec les virus VACV WT mutants dont les gènes antiapoptotiques ont été individuellement supprimés. Comme attendu, les virus VACV WT, souches WR ou Evans (à partir duquel le virus Evans Δ GAAP a été obtenu), n'ont pas entraîné l'activation des caspases 3/7. Ils en diminuent plutôt l'activité de façon statistiquement significative. A l'exception de WR Δ B13 ($p < 0,01$ par rapport à WR), aucune autre délétion de gène (*FIL*, *NIL*, *GAAP*) ne permet à l'infection virale d'augmenter l'activité des caspases effectrices. Ceci confirme d'ores et déjà le rôle majeur que joue B13

dans l'inhibition de l'apoptose induite par les virus. Comparativement aux souches WR et Evans, l'induction de l'apoptose par vv811 était environ 6 fois plus importante ($p < 0,0001$ par rapport aux cellules non infectées), comme observé précédemment. De manière remarquable, hormis le virus vv811-N1, tous les autres virus vv811 recombinants ont présenté une capacité à réduire l'activation des caspases 3/7. De nouveau B13 apparaît nettement comme étant la plus puissante molécule. Le taux d'activation des caspases en sa présence est très faible, similaire à celui observé après l'infection par WR. Alors que F1 exprimée *in trans* n'inhibait que modérément l'apoptose induite par vv811, lorsque cette protéine est exprimée *in cis*, son pouvoir antiapoptotique s'avère être également très puissant. Enfin la protéine GAAP exprimée *in cis* présente une activité modérée d'inhibition de l'apoptose induite par vv811, ce qui n'était pas observé *in trans* (Figure 27).

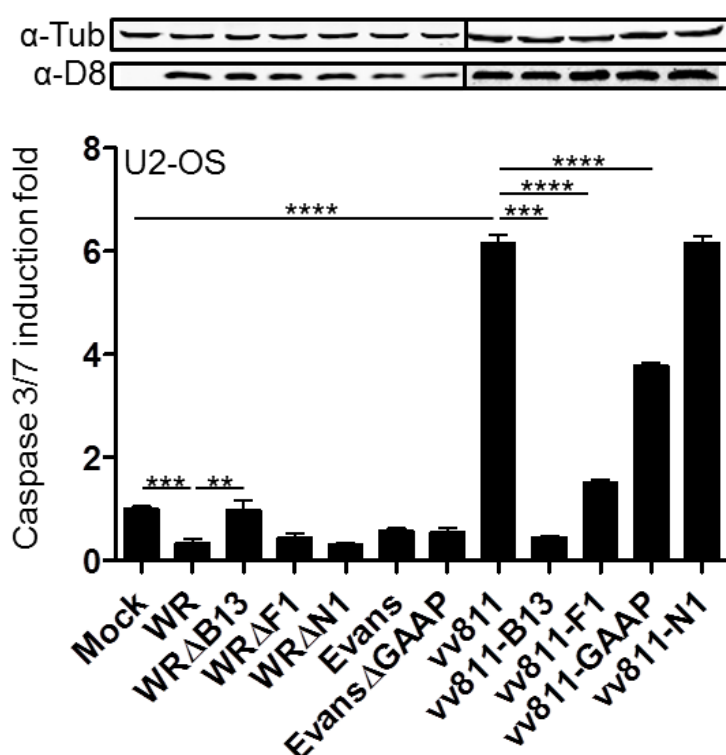


Figure 27 : Induction et inhibition de l'apoptose par les virus VACV WT parentaux et recombinants et vv811 parental et recombinants.

Les cellules U2-OS parentales ont été infectées (2,5 p.f.u./ cellule) pendant 24 heures dans des puits de plaque 96 puits avec les virus WR, WR Δ B13, WR Δ F1, WR Δ N1, Evans, Evans Δ GAAP, vv811, vv811-B13, vv811-F1, vv811-GAAP et vv811-N1. L'activité des caspases effectrices a été mesurée avec le réactif Caspase 3/7 Glo®. Les lysats cellulaires ont été analysés par immunoblot en utilisant les anticorps anti-D8 et anti-tubuline comme contrôle de l'infection virale et comme contrôle cellulaire, respectivement. La moyenne et la déviation standard du rapport entre l'activité observée dans les cellules U2-OS infectées et non infectées sont représentées. Le *t*-test de Student a été utilisé (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$) pour établir la significativité statistique des différences observées.

B.3.4.2. Comparaison de l'apoptose induite dans les cellules Hela par les virus vv811 parental et vv811 recombinants exprimant *in cis* les molécules antiapoptotiques de VACV

Ayant à notre disposition les virus vv811 recombinants, et devant le large spectre d'hôte de VACV, ils se sont révélés être un outil utile pour étudier l'induction de l'apoptose sur d'autres types cellulaires. Les cellules Hela sont régulièrement utilisées dans les études de la mort cellulaire et nous avons décidé de mesurer l'induction de l'apoptose par les virus vv811 recombinants dans ces cellules, dans les mêmes conditions que précédemment dans les cellules U2-OS. De nouveau, le taux d'induction de l'apoptose par vv811 parental est de l'ordre de 7 fois et comme précédemment, 811-B13 annule complètement cet effet. vv811-F1, dans ce contexte, apparaît comme quasiment aussi puissant que vv811-B13. En revanche, alors que la réduction de l'apoptose était modérée après infection des cellules U2-OS par vv811-GAAP, aucun effet n'est observé dans les cellules Hela. vv811-N1 échoue à nouveau, dans ces circonstances, à prévenir l'induction de l'activité des caspases 3/7 (Figure 28).

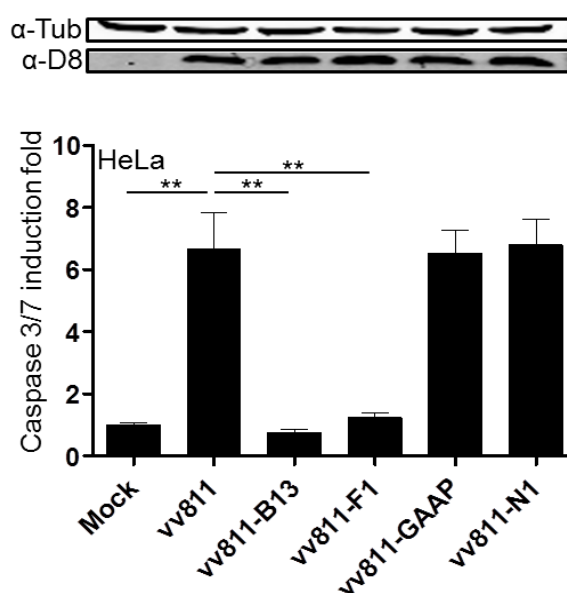


Figure 28 : Induction et inhibition de l'apoptose par les virus vv811 parental et vv811 recombinants.

Les cellules Hela ont été infectées (2,5 p.f.u./ cellule) pendant 24 heures dans des puits de plaque 96 puits avec les virus vv811, vv811-B13, vv811-F1, vv811-GAAP et vv811-N1. L'activité des caspases effectrices a été mesurée avec le réactif Caspase 3/7 Glo®. Les lysats cellulaires ont été analysés par immunoblot en utilisant les anticorps anti-D8, contrôle de l'infection virale, et anti-tubuline, contrôle cellulaire. La moyenne et la déviation standard du rapport entre l'activité observée dans les cellules Hela infectées et non infectées sont représentées. Le *t*-test de Student a été utilisé (** $p < 0,01$) pour établir la significativité statistique des différences observées.

B.3.4.3. Etude de la viabilité cellulaire des cellules infectées par les virus vv811 parental et vv811 recombinants.

Nous avons observé en microscopie (données non montrées) que contrairement aux cellules infectées par VACV WT, un effet cytopathogénique majeur (ballonisation, détachement des cellules) dans les cellules infectées par les virus vv811 recombinants se produisait malgré l'inhibition importante des caspases effectrices par les virus vv811-B13 et vv811-F1. Nous avons décidé de confirmer cette observation en mesurant la viabilité cellulaire des cellules infectées pendant 24 heures dans les mêmes conditions que celles des expériences précédentes. La mesure de la viabilité cellulaire des cellules U2-OS et des cellules Hela a été réalisée (Figure 29 a, b). Pour cela, nous avons utilisé le réactif Cell Titer-Blue® (voir méthode). Tout d'abord, les résultats montrent que les cellules U2-OS sont plus résistantes que les cellules Hela après infection par vv811 (de l'ordre de 50% de viabilité cellulaire pour les cellules U2-OS et de 25% pour les cellules Hela). De plus, hormis vv811-N1 qui n'avait pas démontré de capacité inhibitrice dans l'activation des caspases 3/7, tous les autres vv811 recombinants améliorent la viabilité cellulaire, de façon statistiquement significative, en comparaison avec vv811 parental. Nous avons remarqué ensuite que bien que l'inhibition de l'activation des caspases 3/7 par vv811-B13 soit la plus importante, il apparaît que la protection contre la mort cellulaire fournie par vv811-F1 était plus importante, aussi bien dans les cellules U2-OS que les cellules Hela. Enfin, nous avons été surpris de voir que vv811-GAAP protégeait les cellules de la mort cellulaire, malgré une inhibition modérée de l'activation des caspases effectrices dans les cellules U2-OS et nulle dans les cellules Hela. Dans les cellules U2-OS, cette protection s'est révélée équivalente à celle conférée par vv811-F1 et supérieure à celle observée après infection par vv811-B13. Dans les cellules Hela, la viabilité cellulaire était équivalente après infection par vv811-GAAP ou vv811-B13.

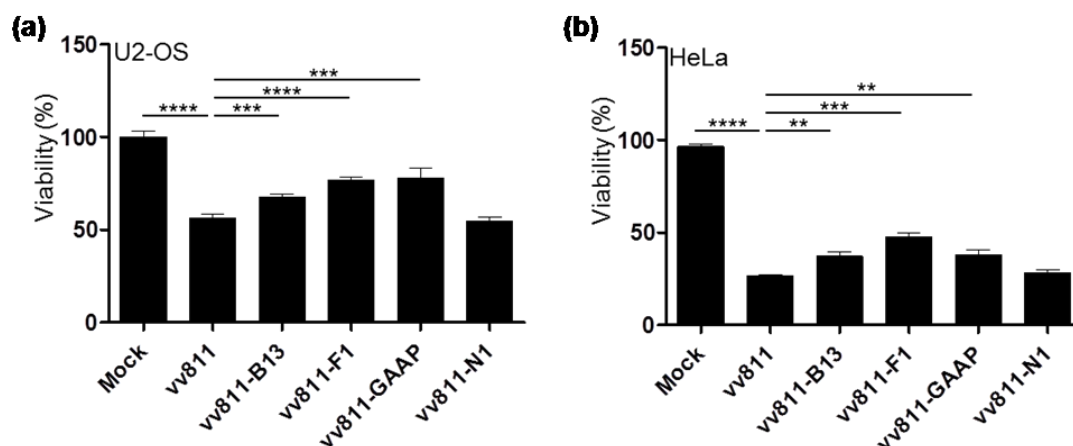


Figure 29 : Viabilité cellulaire des cellules U2-OS et HeLa infectées par les virus vv811 parental et vv811 recombinants.

Les cellules U2-OS (a) et HeLa (b) ont été infectées (2,5 p.f.u./ cellule) pendant 24 heures dans des puits de plaque 96 puits avec les virus vv811, vv811-B13, vv811-F1, vv811-GAAP et vv811-N1. La viabilité cellulaire a été mesurée en utilisant le réactif Cell Titer-Blue®. La moyenne, exprimée en pourcentage, du rapport entre la viabilité observée dans les cellules U2-OS ou HeLa infectées et non infectées et la déviation standard sont représentées. Les immunoblots de contrôle d'infection virale et de contrôle cellulaire ne sont pas montrés car cette expérience, représentative de 3 répétitions, est la même que celle représentée dans la figure précédente, dans laquelle ces contrôles sont montrés. Le *t*-test de Student a été utilisé (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$) pour établir la significativité statistique des différences observées.

B.3.4.4. Conclusion

Tout d'abord, ces résultats ont montré que les virus vv811 recombinants, dans lesquels ont été insérés les gènes des molécules antiapoptotiques de VACV à étudier, étaient un outil puissant pour évaluer leur contribution relative à l'inhibition de l'apoptose dans un contexte d'infection virale. L'utilisation de ces virus recombinants pour infecter plusieurs lignées cellulaires a également été démontrée. La puissance de cette approche a aussi été confirmée par comparaison avec l'approche classique qui utilisait des virus VACV WT desquels une seule molécule antiapoptotique avait été supprimée à la fois. Comme les résultats des expériences des parties précédentes le montraient, B13 apparaît de nouveau comme la plus puissante molécule inhibitrice. Cependant, F1 a également montré une capacité inhibitrice proche de B13 dans ce contexte d'expression *in cis*. Nous avons également remarqué que l'action de GAAP sur l'inhibition de l'apoptose était dépendante de la lignée cellulaire utilisée. N1, quelles que soient les cellules utilisées, n'a montré aucun effet protecteur vis-à-vis de l'activité des caspases 3/7. Enfin, il a été montré que le niveau d'inhibition des caspases effectrices n'était pas complètement corrélé à la maintenance d'une viabilité cellulaire. F1 apparaît comme étant la meilleure protectrice contre la mort cellulaire et GAAP

a montré des propriétés inattendues de protection contre cette mort cellulaire, parfois même en l'absence d'inhibition de l'activité des caspases effectrices comme montré dans les cellules Hela.

C. Discussion

C.1. Expression des molécules anti-apoptotiques en isolation dans les cellules U2-0S et inhibition de l'apoptose

Dans la première partie de notre travail, nous avons construit des lignées cellulaires polyclonales exprimant individuellement les protéines antiapoptotiques à étudier par transduction avec un système lentiviral. Le plasmide d'expression lentiviral bicistronique exprime la EGFP en plus du gène d'intérêt, permettant de trier les cellules positives pour GFP qui seront positives pour la molécule d'intérêt. Cette positivité pour les molécules d'intérêts a été vérifiée à la fois par immunoblot et par immunofluorescence. La molécule GAAP a nécessité un temps d'exposition plus important pour être détectée en immunoblot, alors que sa présence apparaissait comme évidente en immunofluorescence. Ceci est probablement expliqué par les propriétés intrinsèques de GAAP, qui est très hydrophobe et qui nécessite des conditions optimales pour obtenir des immunoblot de qualité. Il a notamment été remarqué par d'autres membres du laboratoire que le buffer CHAPS était préférable pour l'étape de lyse. Ces mêmes personnes ont observé que l'étape d'ébullition qui favorise la dénaturation des protéines avant le gel d'électrophorèse des protéines altérerait grandement la qualité des immunoblots pour GAAP et était, pour cette raison, déconseillée. Néanmoins, dans notre travail, non seulement la bande correspondant à GAAP a été détectée après un temps d'exposition plus long mais, en plus, sa présence et sa localisation correcte ont été confirmées par immunofluorescence. L'expression de N1 s'est avérée très importante, à la fois par immunoblot et par immunofluorescence. N1 a été décrite comme une protéine cytoplasmique alors que l'immunofluorescence montre une présence à la fois dans le cytoplasme et le noyau. Une expression trop importante de N1 dans ce système explique probablement cela. N1 est la seule molécule dans notre étude à avoir une séquence d'acides nucléiques optimisée pour une expression en système eucaryote performante. Ceci est parfois nécessaire car le virus de la vaccine se réplique dans le cytoplasme et contient un GC% de l'ordre de 36%. Ces deux particularités peuvent rendre difficile l'expression des protéines virales dans le noyau de la cellule eucaryote, notamment du fait de phénomènes d'épissage non désirés des gènes viraux. Dans notre étude, N1 est tellement bien exprimée que sa localisation en est modifiée. Ceci souligne les difficultés d'analyse des molécules virales de VACV en isolation et conforte l'approche de mutagenèse virale utilisée dans la suite de notre travail.

Exprimées en isolation, toutes les protéines ont montré des capacités inhibitrices, à des degrés divers, de l'apoptose induite par la staurosporine ou la doxorubicine (apoptose intrinsèque) et seule B13 a été capable d'inhiber l'apoptose extrinsèque induite par le TNF- α . Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature. F1 et N1, molécules de type Bcl-2, ciblent des molécules proapoptotiques impliquées dans le déclenchement de l'apoptose mitochondriale (Cooray *et al.*, 2007; Kvansakul *et al.*, 2008; Maluquer de Motes *et al.*, 2011; Postigo *et al.*, 2006; Wasilenko *et al.*, 2005; Wasilenko *et al.*, 2003). B13 est un inhibiteur à large spectre des caspases et si son action sur l'apoptose extrinsèque peut s'expliquer par son pouvoir inhibiteur de la caspase 8, celle sur l'apoptose intrinsèque peut s'expliquer par son action sur la caspase 9 (Dobbelstein & Shenk, 1996; Kettle *et al.*, 1997). GAAP inhibe l'apoptose intrinsèque (Gubser *et al.*, 2007).

F1 n'est apparue antiapoptotique qu'avec le réactif Caspase 3/7 Glo® quantitatif et non après analyse semi quantitative du clivage de PARP-1. Cela permet de souligner l'importance de disposer de plusieurs méthodes pour évaluer les capacités antiapoptotiques d'une protéine. Avec une approche plus sensible, un effet de cette protéine sur l'apoptose intrinsèque a pu être montré. La dégradation de F1 par le protéasome permet d'expliquer cela. Des quantités très faibles de F1, non détectables, sont certainement présentes dans les cellules et inhibent faiblement l'apoptose. Nous pouvons également supposer, que du fait de cette dégradation, l'activité de F1 étudiée dans les cellules U2-OS transduites était sous-estimée, ce que confirmeront les résultats des expériences suivantes.

Nous n'avons pas pu observer que GAAP pouvait protéger contre l'apoptose extrinsèque comme cela avait été montré auparavant dans notre laboratoire (Gubser *et al.*, 2007). Les conditions expérimentales ont été différentes dans notre étude par rapport à celle de 2007 et doivent expliquer les différences observées vis-à-vis de l'apoptose extrinsèque. Le système de délivrance des gènes ainsi que les essais utilisés pour mesurer l'apoptose ont été différents. Cela souligne une nouvelle fois la difficulté de travailler avec des molécules en isolation et la dépendance forte des conclusions aux conditions expérimentales. Néanmoins, notre travail étant un travail de comparaison de l'activité antiapoptotique des protéines de VACV, nous n'avons pas cherché à tout prix à redémontrer le rôle de GAAP dans l'apoptose extrinsèque. Son absence d'effet dans les conditions testées a été acceptée comme telle.

Enfin, la méthode employée dans cette première partie, à base de cellules U2-OS transduites par lentivirus et triées pour avoir des lignées cellulaires 100% positives pour les gènes d'intérêt pourrait servir à tester d'autres molécules que celles étudiées ici. Une plateforme pourrait ainsi être développée pour envisager des screenings de première intention et

découvrir des capacités antiapoptotiques de nouvelles protéines, aussi bien virales que cellulaires. De plus, les lentivirus grâce à leur glycoprotéine d'enveloppe VSV-G peuvent infecter un grand nombre de cellules et des cellules autres que les cellules U2-OS auraient pu être choisies. Le fait que le laboratoire soit habitué à travailler avec ces cellules, pour étudier l'apoptose, explique ce choix (Gubser *et al.*, 2007; Saraiva *et al.*, 2013b).

C.2. Utilisation du virus déficient vv811 comme inducteur d'apoptose

Les virus VACV possèdent plusieurs protéines antiapoptotiques et leur capacité à inhiber l'activation des caspases effectrices est très importante, ce que nous avons confirmé. Du fait de cette redondance fonctionnelle, l'approche qui consiste à supprimer un seul gène antiapoptotique de ces virus et ensuite infecter les cellules avec ces virus mutants ne permet pas l'induction de l'apoptose. C'est pourquoi, jusqu'alors, il était nécessaire d'ajouter des drogues pouvant induire l'apoptose sur les cellules infectées. Le caractère artificiel de ces drogues nous a amené à essayer d'améliorer cette approche en tirant profit du virus déficient vv811, dans lequel la plupart des protéines antiapoptotiques sont absentes. Nous avons pu montrer que ce virus était capable à lui seul, sans ajout d'aucun autre stimulus, d'activer les caspases 3/7. Ce virus devient un outil d'induction de l'apoptose que nous avons estimé plus pertinent physiologiquement. L'utilisation de ce virus sur les cellules U2-OS exprimant les protéines étudiées a montré que seule B13, et dans une moindre mesure F1 dont la dégradation par le protéasome peut conduire à la sous-estimation de son réel pouvoir inhibiteur, étaient capables de diminuer l'activation des caspases 3/7. Ces résultats montrent que B13 et F1 sont plus puissantes que GAAP et N1 dans ce contexte ou que le mécanisme de déclenchement de l'apoptose par le virus est différent de celui induit par les drogues utilisées auparavant. Cependant, l'infection par vv811 des cellules exprimant B13 ou F1 n'a pas amélioré la réplication de ce virus dans les conditions testées. Beaucoup d'autres protéines étant absentes de ce virus, il apparaît que la seule inhibition de l'apoptose n'est pas suffisante pour obtenir des titres viraux plus importants et que d'autres molécules régulatrices doivent jouer un rôle majeur pour la réplication virale.

Nous avons par la suite décidé d'insérer les protéines antiapoptotiques de VACV dans le génome de vv811, à des loci connus pour ne pas être indispensables à la réplication virale. Cette expression *in cis* a été placée sous le contrôle du promoteur fort et précoce P7.5. Le choix de ce promoteur a été réalisé pour s'affranchir au maximum des variations quant au niveau d'expression d'une part et parce que les promoteurs naturels de ces gènes antiapoptotiques ne sont pas bien définis d'autre part. L'utilisation de ces virus vv811

recombinants a confirmé les capacités majeures de B13 et F1 (qui dans ce contexte n'était pas dégradé par le protéasome) à inhiber l'apoptose dans 2 types cellulaires différents (U2-OS et Hela) par rapport aux protéines GAAP et N1. Un atout majeur de cette approche est que les virus mutants peuvent être utilisés aisément sur un nombre important de cellules. Cet avantage a été mis à profit en infectant les cellules Hela et nous avons pu observer que, dans ce contexte, contrairement à ce qui a été observé dans les cellules U2-OS, GAAP n'inhibait pas l'apoptose. Ceci souligne l'importance d'utiliser plusieurs lignées cellulaires pour étudier la mort cellulaire.

C.3. Perspectives

L'activation des caspases 3/7 conduit à l'apoptose et à la mort cellulaire inévitablement. Seuls de rares papiers montrent une action de la caspase 3 dans le développement cellulaire n'entraînant pas la mort cellulaire (Zermati *et al.*, 2001). En mesurant la viabilité cellulaire de nos cellules infectées par vv811 et ses recombinants nous avons pu confirmer qu'effectivement, les cellules mourraient parallèlement à l'activation des caspases 3/7. Alors qu'un effet positif sur la viabilité cellulaire suite à l'inhibition des caspases 3/7 a clairement été établi, l'inhibition importante de ces caspases par les molécules B13 et F1 n'a pas complètement empêcher la mort cellulaire. De plus, alors que B13 est la plus puissante molécule pour inhiber l'activation des caspases 3/7, F1 confère une protection contre la mort cellulaire plus efficace. A partir de ces résultats, il apparaît que la mort cellulaire entraînée par l'infection virale à VACV n'est pas uniquement dépendante de l'apoptose et que d'autres types de morts cellulaires régulées sont probablement impliqués. Des propriétés inhibitrices de F1 dans l'activation de l'inflammasome ont été montrées (Gerlic *et al.*, 2013) et le fait que vv811-F1 soit le meilleur protecteur contre la mort cellulaire pourrait laisser à penser que la pyroptose pourrait être déclenchée suite à l'infection virale. Cependant, la pyroptose étant dépendante de la caspase 1, elle devrait être également inhibée par la protéine B13, ce que nous n'observons pas. En revanche, B13 en inhibant la caspase 8 peut probablement déclencher la voie de la nécroptose, ce qui expliquerait la mortalité plus importante observée dans les cellules infectées par vv811-B13 que vv811-F1. Dans les cellules infectées par vv811-F1, on ne peut savoir si l'effet bénéfique de cette protéine est dû uniquement à l'inhibition de l'apoptose, à l'absence de déclenchement de la nécroptose ou à l'inhibition de la pyroptose. Nous avons à notre disposition les outils pour mener des recherches complémentaires pour tâcher de répondre à ces questions.

Le résultat le plus surprenant que nous avons obtenu est la protection contre la mort cellulaire conférée par GAAP, en dépit d'une inhibition de l'activation des caspases modérée dans les cellules U2-OS et nulle dans les cellules Hela. Ceci a été confirmé par microscopie en observant un faible effet cytopathogène des cellules infectées par vv811-GAAP comparativement aux autres virus recombinants vv811 (données non montrées). Cette observation surprenante nous a tout d'abord fait douter du taux d'infection de ces cellules mais cette hypothèse a été écartée par l'analyse par immunoblot des protéines virales. Cette observation suggère que les cellules infectées meurent par un mécanisme que GAAP a les moyens de contrôler jusqu'à un certain point. Il serait bon de préciser si cette survie est prolongée ou s'il s'agit d'un délai, si oui de combien de temps, conféré aux cellules par GAAP. Par quel moyen GAAP prévient la mort suivant l'activation des caspases 3/7 est une question à laquelle nous ne pouvons répondre. Découvrir les causes de cette observation participerait à une meilleure compréhension des mécanismes de mort cellulaire.

N1 inhibe la voie NF- κ B et il a été montré que son homodimérisation était importante pour cet effet (Bartlett *et al.*, 2002). Si des mutations dans son sillon, basées sur la structure de cette protéine, se sont révélées importantes pour son activité antiapoptotique (Maluquer de Motes *et al.*, 2011), d'autres auteurs n'ont pas pu montrer d'activité antiapoptotique de N1 (Banadyga *et al.*, 2009; Postigo & Way, 2012). Nos résultats montrent que le contexte dans lequel les propriétés antiapoptotiques de N1 sont étudiées est un facteur déterminant. En effet, en réponse au déclenchement de l'apoptose par les drogues staurosporine et doxorubicine, N1 a clairement fait preuve de ses capacités à inhiber l'apoptose. En revanche, dans un contexte d'infection virale par vv811, que nous estimons plus proche de la réalité physiologique, N1 s'est trouvée incapable d'empêcher l'activation des caspases effectrices, que son expression soit *in trans* ou bien *in cis*. Ces résultats confirment le faible rôle dans la modulation de l'apoptose joué par N1 et sont en accord avec des résultats montrant que son rôle dans l'inhibition de NF- κ B était celui qui contribuait le plus à la virulence du virus *in vivo* (Maluquer de Motes *et al.*, 2011). Il est probable qu'après duplication et convergence, N1, qui est une protéine de type Bcl-2, a gagné ses propriétés de modulateur de la réponse inflammatoire au détriment de ses propriétés antiapoptotiques, conservées malgré tout à un faible niveau comme le montre nos résultats.

Etant donné le peu de données sur les propriétés antiapoptotiques de la protéine B22, il aurait été intéressant de l'inclure dans notre étude. Ceci pourra faire l'objet d'un travail ultérieur, les outils et les protocoles étant bien maîtrisés.

L'apoptose est souvent décrite comme un moyen de limiter la réplication virale. Si le concept est séduisant et accepté, nous n'avons cependant pas pu améliorer la réplication du virus vv811 par réintroduction des molécules antiapoptotiques *in vitro*, que ce soit *in trans* ou *in cis*. Le rôle de l'apoptose dans la réplication virale est peut-être plus important *in vivo*. Des études supplémentaires seraient nécessaires.

La souche VACV Copenhagen de laquelle est dérivé le virus déficient vv811 ne contient pas *GAAP* (Goebel *et al.*, 1990; Gubser & Smith, 2002) et sa protéine B13 est tronquée et non fonctionnelle (Kettle *et al.*, 1995). Cela laisse suggérer que F1 et N1 (dans une moindre mesure), conservées dans la plupart des souches de VACV et autres orthopoxvirus, pourraient être suffisantes pour contrôler l'apoptose déclenchée par le virus et assurer sa réplication. Cependant, la souche Copenhagen est moins virulente *in vivo* que la souche Western Reserve. Le rôle des molécules antiapoptotiques dans la virulence n'est pas élucidé et il a été montré que les propriétés antiapoptotiques de F1 et N1 ne jouaient pas de rôle dans la virulence *in vivo* (Gerlic *et al.*, 2013; Maluquer de Motes *et al.*, 2011). De même, les résultats sur la virulence conférée par B13 sont contradictoires mais il semblerait qu'il ne s'agit pas d'un facteur de virulence. Des recherches complémentaires sur le rôle de l'apoptose dans la virulence présenteraient un intérêt certain. L'utilisation des virus vv811 recombinants pourrait être utile. Néanmoins, l'absence de nombreux autres gènes régulateurs ne permettent pas à vv811 d'infection efficace *in vivo*, limitant clairement l'approche suggérée. Si la présence des molécules antiapoptotiques améliorerait la réponse immune à l'infection est une autre question à laquelle nous ne pouvons apporter de réponses, à l'heure actuelle. Elle représente un intérêt dans le champ de la vaccinologie pour éventuellement améliorer les formulations disponibles.

Conclusion générale

L'apoptose, mort cellulaire régulée, est utilisée par les cellules comme mécanisme de défense antivirale. Les virus, par conséquence, au cours de l'évolution, ont développé des stratégies pour empêcher ou retarder ce phénomène. Le virus de la vaccine représente un modèle d'étude intéressant pour disséquer l'apoptose. Il possède plusieurs gènes dont les capacités d'inhibition de l'apoptose avaient déjà été démontrées individuellement. Néanmoins, leurs activités antiapoptotiques n'avaient jamais été étudiées dans le même système expérimental. Leurs contributions relatives à cette inhibition n'avaient jusqu'alors pas été évaluées. Nos travaux ont permis, en utilisant différentes approches, de comparer la contribution de ces différentes molécules. L'utilisation de cellules U2-OS transduites par des vecteurs lentiviraux afin qu'elles expriment les protéines antiapoptotiques de VACV, l'utilisation du virus vv811 sur ces cellules transduites pour induire directement l'apoptose sans aucun ajout de drogues supplémentaires ainsi que l'utilisation de virus vv811 recombinants constituent des approches résolument innovantes qui ont prouvé leurs performances au cours de ce travail. Il apparaît clairement que B13 et F1 sont deux puissants inhibiteurs de l'apoptose et que B13 est la plus puissante parmi les protéines antiapoptotiques de VACV étudiées.

Bibliographie

- Ablasser, A., Bauernfeind, F., Hartmann, G., Latz, E., Fitzgerald, K. A. & Hornung, V. (2009). RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol* 10, 1065-1072.
- Ablasser, A., Goldeck, M., Cavlar, T., Deimling, T., Witte, G., Rohl, I., Hopfner, K. P., Ludwig, J. & Hornung, V. (2013). cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature* 498, 380-384.
- Adrain, C., Creagh, E. M. & Martin, S. J. (2001). Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *EMBO J* 20, 6627-6636.
- Adrain, C. & Martin, S. J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* 26, 390-397.
- Adrain, C., Murphy, B. M. & Martin, S. J. (2005). Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B. *J Biol Chem* 280, 4663-4673.
- Agut, H. (2013). *Panorama de la virologie*: Belin.
- Albeck, J. G., Burke, J. M., Aldridge, B. B., Zhang, M., Lauffenburger, D. A. & Sorger, P. K. (2008). Quantitative analysis of pathways controlling extrinsic apoptosis in single cells. *Mol Cell* 30, 11-25.
- Alcami, A. & Smith, G. L. (1992). A soluble receptor for interleukin-1 beta encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. *Cell* 71, 153-167.
- Alcami, A. & Smith, G. L. (1995). Vaccinia, cowpox, and camelpox viruses encode soluble gamma interferon receptors with novel broad species specificity. *J Virol* 69, 4633-4639.
- Alcami, A. & Smith, G. L. (1996). A mechanism for the inhibition of fever by a virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11029-11034.
- Alcami, A., Symons, J. A., Collins, P. D., Williams, T. J. & Smith, G. L. (1998). Blockade of chemokine activity by a soluble chemokine binding protein from vaccinia virus. *J Immunol* 160, 624-633.
- Ali, A. N., Turner, P. C., Brooks, M. A. & Moyer, R. W. (1994). The SPI-1 gene of rabbitpox virus determines host range and is required for hemorrhagic pox formation. *Virology* 202, 305-314.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W. & Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171.
- Altmann, M. & Hammerschmidt, W. (2005). Epstein-Barr virus provides a new paradigm: a requirement for the immediate inhibition of apoptosis. *PLoS Biol* 3, e404.
- Andrade, A. A., Silva, P. N., Pereira, A. C., De Sousa, L. P., Ferreira, P. C., Gazzinelli, R. T., Kroon, E. G., Ropert, C. & Bonjardim, C. A. (2004). The vaccinia virus-stimulated mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway is required for virus multiplication. *Biochem J* 381, 437-446.
- Andrejeva, J., Childs, K. S., Young, D. F., Carlos, T. S., Stock, N., Goodbourn, S. & Randall, R. E. (2004). The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17264-17269.
- Ank, N. & Paludan, S. R. (2009). Type III IFNs: new layers of complexity in innate antiviral immunity. *Biofactors* 35, 82-87.

- Aoyagi, M., Zhai, D., Jin, C., Aleshin, A. E., Stec, B., Reed, J. C. & Liddington, R. C. (2007). Vaccinia virus N1L protein resembles a B cell lymphoma-2 (Bcl-2) family protein. *Protein Sci* 16, 118-124.
- Arnoult, D., Bartle, L. M., Skaletskaya, A., Poncet, D., Zamzami, N., Park, P. U., Sharpe, J., Youle, R. J. & Goldmacher, V. S. (2004). Cytomegalovirus cell death suppressor vMIA blocks Bax- but not Bak-mediated apoptosis by binding and sequestering Bax at mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7988-7993.
- Arnoult, D., Skaletskaya, A., Estaquier, J., Dufour, C. & Goldmacher, V. S. (2008). The murine cytomegalovirus cell death suppressor m38.5 binds Bax and blocks Bax-mediated mitochondrial outer membrane permeabilization. *Apoptosis* 13, 1100-1110.
- Ashkenazi, A. & Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.
- Bacon, K., Baggiolini, M., Broxmeyer, H., Horuk, R., Lindley, I., Mantovani, A., Maysushima, K., Murphy, P., Nomiyama, H., Oppenheim, J., Rot, A., Schall, T., Tsang, M., Thorpe, R., Van Damme, J., Wadhwa, M., Yoshie, O., Zlotnik, A. & Zoon, K. (2002). Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Interferon Cytokine Res* 22, 1067-1068.
- Bahar, M. W., Graham, S. C., Chen, R. A., Cooray, S., Smith, G. L., Stuart, D. I. & Grimes, J. M. (2011). How vaccinia virus has evolved to subvert the host immune response. *J Struct Biol* 175, 127-134.
- Bahar, M. W., Kenyon, J. C., Putz, M. M., Abrescia, N. G., Pease, J. E., Wise, E. L., Stuart, D. I., Smith, G. L. & Grimes, J. M. (2008). Structure and function of A41, a vaccinia virus chemokine binding protein. *PLoS Pathog* 4, e5.
- Bajszar, G., Wittek, R., Weir, J. P. & Moss, B. (1983). Vaccinia virus thymidine kinase and neighboring genes: mRNAs and polypeptides of wild-type virus and putative nonsense mutants. *J Virol* 45, 62-72.
- Balachandran, S., Kim, C. N., Yeh, W. C., Mak, T. W., Bhalla, K. & Barber, G. N. (1998). Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling. *EMBO J* 17, 6888-6902.
- Balachandran, S., Roberts, P. C., Brown, L. E., Truong, H., Pattnaik, A. K., Archer, D. R. & Barber, G. N. (2000). Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. *Immunity* 13, 129-141.
- Baltimore, D. (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev* 35, 235-241.
- Banadyga, L., Gerig, J., Stewart, T. & Barry, M. (2007). Fowlpox virus encodes a Bcl-2 homologue that protects cells from apoptotic death through interaction with the proapoptotic protein Bak. *J Virol* 81, 11032-11045.
- Banadyga, L., Veugelers, K., Campbell, S. & Barry, M. (2009). The fowlpox virus BCL-2 homologue, FPV039, interacts with activated Bax and a discrete subset of BH3-only proteins to inhibit apoptosis. *J Virol* 83, 7085-7098.
- Barlan, A. U., Griffin, T. M., McGuire, K. A. & Wiethoff, C. M. (2011). Adenovirus membrane penetration activates the NLRP3 inflammasome. *J Virol* 85, 146-155.
- Baroudy, B. M., Venkatesan, S. & Moss, B. (1982). Incompletely base-paired flip-flop terminal loops link the two DNA strands of the vaccinia virus genome into one uninterrupted polynucleotide chain. *Cell* 28, 315-324.
- Barry, M., Heibin, J. A., Pinkoski, M. J., Lee, S. F., Moyer, R. W., Green, D. R. & Bleackley, R. C. (2000). Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol Cell Biol* 20, 3781-3794.

- Bartlett, N., Symons, J. A., Tschärke, D. C. & Smith, G. L. (2002). The vaccinia virus N1L protein is an intracellular homodimer that promotes virulence. *J Gen Virol* 83, 1965-1976.
- Bartlett, N. W., Buttigieg, K., Kutenko, S. V. & Smith, G. L. (2005). Murine interferon lambdas (type III interferons) exhibit potent antiviral activity in vivo in a poxvirus infection model. *J Gen Virol* 86, 1589-1596.
- Beattie, E., Paoletti, E. & Tartaglia, J. (1995). Distinct patterns of IFN sensitivity observed in cells infected with vaccinia K3L- and E3L- mutant viruses. *Virology* 210, 254-263.
- Bellamy, C. O., Malcomson, R. D., Harrison, D. J. & Wyllie, A. H. (1995). Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Semin Cancer Biol* 6, 3-16.
- Bergsbaken, T. & Cookson, B. T. (2007). Macrophage activation redirects yersinia-infected host cell death from apoptosis to caspase-1-dependent pyroptosis. *PLoS Pathog* 3, e161.
- Bergsbaken, T., Fink, S. L. & Cookson, B. T. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol* 7, 99-109.
- Billings, B., Smith, S. A., Zhang, Z., Lahiri, D. K. & Kotwal, G. J. (2004). Lack of N1L gene expression results in a significant decrease of vaccinia virus replication in mouse brain. *Ann N Y Acad Sci* 1030, 297-302.
- Blake, N. W., Kettle, S., Law, K. M., Gould, K., Bastin, J., Townsend, A. R. & Smith, G. L. (1995). Vaccinia virus serpins B13R and B22R do not inhibit antigen presentation to class I-restricted cytotoxic T lymphocytes. *J Gen Virol* 76 (Pt 9), 2393-2398.
- Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V. & Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-815.
- Bolduc, N., Ouellet, M., Pitre, F. & Brisson, L. F. (2003). Molecular characterization of two plant BI-1 homologues which suppress Bax-induced apoptosis in human 293 cells. *Planta* 216, 377-386.
- Boone, R. F. & Moss, B. (1978). Sequence complexity and relative abundance of vaccinia virus mRNA's synthesized in vivo and in vitro. *J Virol* 26, 554-569.
- Born, T. L., Morrison, L. A., Esteban, D. J., VandenBos, T., Thebeau, L. G., Chen, N., Spriggs, M. K., Sims, J. E. & Buller, R. M. (2000). A poxvirus protein that binds to and inactivates IL-18, and inhibits NK cell response. *J Immunol* 164, 3246-3254.
- Boulter, E. A. & Appleyard, G. (1973). Differences between extracellular and intracellular forms of poxvirus and their implications. *Prog Med Virol* 16, 86-108.
- Boursnell, M. E., Foulds, I. J., Campbell, J. I. & Binns, M. M. (1988). Non-essential genes in the vaccinia virus HindIII K fragment: a gene related to serine protease inhibitors and a gene related to the 37K vaccinia virus major envelope antigen. *J Gen Virol* 69 (Pt 12), 2995-3003.
- Bowie, A. G. & Unterholzner, L. (2008). Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 8, 911-922.
- Brancolini, C., Benedetti, M. & Schneider, C. (1995). Microfilament reorganization during apoptosis: the role of Gas2, a possible substrate for ICE-like proteases. *EMBO J* 14, 5179-5190.
- Brandt, T. A. & Jacobs, B. L. (2001). Both carboxy- and amino-terminal domains of the vaccinia virus interferon resistance gene, E3L, are required for pathogenesis in a mouse model. *J Virol* 75, 850-856.
- Bray, M. & Buller, M. (2004). Looking back at smallpox. *Clin Infect Dis* 38, 882-889.
- Breman, J. G. & Henderson, D. A. (2002). Diagnosis and management of smallpox. *N Engl J Med* 346, 1300-1308.

- Brooks, M. A., Ali, A. N., Turner, P. C. & Moyer, R. W. (1995). A rabbitpox virus serpin gene controls host range by inhibiting apoptosis in restrictive cells. *J Virol* 69, 7688-7698.
- Broyles, S. S. (1993). Vaccinia virus encodes a functional dUTPase. *Virology* 195, 863-865.
- Broyles, S. S. (2003). Vaccinia virus transcription. *J Gen Virol* 84, 2293-2303.
- Bukowski, J. F., Woda, B. A., Habu, S., Okumura, K. & Welsh, R. M. (1983). Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo. *J Immunol* 131, 1531-1538.
- Byun, Y., Chen, F., Chang, R., Trivedi, M., Green, K. J. & Cryns, V. L. (2001). Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death Differ* 8, 443-450.
- Cai, X., Chiu, Y. H. & Chen, Z. J. (2014a). The cGAS-cGAMP-STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling. *Mol Cell* 54, 289-296.
- Cai, Z., Jitkaew, S., Zhao, J., Chiang, H. C., Choksi, S., Liu, J., Ward, Y., Wu, L. G. & Liu, Z. G. (2014b). Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat Cell Biol* 16, 55-65.
- Cain, K., Bratton, S. B., Langlais, C., Walker, G., Brown, D. G., Sun, X. M. & Cohen, G. M. (2000). Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem* 275, 6067-6070.
- Calderara, S., Xiang, Y. & Moss, B. (2001). Orthopoxvirus IL-18 binding proteins: affinities and antagonist activities. *Virology* 279, 22-26.
- Cam, M., Handke, W., Picard-Maureau, M. & Brune, W. (2010). Cytomegaloviruses inhibit Bak- and Bax-mediated apoptosis with two separate viral proteins. *Cell Death Differ* 17, 655-665.
- Campbell, S., Hazes, B., Kvensakul, M., Colman, P. & Barry, M. (2010). Vaccinia virus F1L interacts with Bak using highly divergent Bcl-2 homology domains and replaces the function of Mcl-1. *J Biol Chem* 285, 4695-4708.
- Campbell, S., Thibault, J., Mehta, N., Colman, P. M., Barry, M. & Kvensakul, M. (2014). Structural insight into BH3 domain binding of vaccinia virus antiapoptotic F1L. *J Virol* 88, 8667-8677.
- Carrara, G., Saraiva, N., Gubser, C., Johnson, B. F. & Smith, G. L. (2012). Six-transmembrane topology for Golgi anti-apoptotic protein (GAAP) and Bax inhibitor 1 (BI-1) provides model for the transmembrane Bax inhibitor-containing motif (TMBIM) family. *J Biol Chem* 287, 15896-15905.
- Carrell, R. W., Pemberton, P. A. & Boswell, D. R. (1987). The serpins: evolution and adaptation in a family of protease inhibitors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 52, 527-535.
- Carriere, V., Roussel, L., Ortega, N., Lacorre, D. A., Americh, L., Aguilar, L., Bouche, G. & Girard, J. P. (2007). IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 282-287.
- Carroll, T. P., Greene, C. M., Taggart, C. C., Bowie, A. G., O'Neill, S. J. & McElvaney, N. G. (2005). Viral inhibition of IL-1- and neutrophil elastase-induced inflammatory responses in bronchial epithelial cells. *J Immunol* 175, 7594-7601.
- Carter, G. C., Law, M., Hollinshead, M. & Smith, G. L. (2005). Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. *J Gen Virol* 86, 1279-1290.
- Carter, G. C., Rodger, G., Murphy, B. J., Law, M., Krauss, O., Hollinshead, M. & Smith, G. L. (2003). Vaccinia virus cores are transported on microtubules. *J Gen Virol* 84, 2443-2458.

- Cecconi, F., Alvarez-Bolado, G., Meyer, B. I., Roth, K. A. & Gruss, P. (1998). Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* 94, 727-737.
- Chae, H. J., Ke, N., Kim, H. R., Chen, S., Godzik, A., Dickman, M. & Reed, J. C. (2003). Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax Inhibitor-1 homologs from animals, plants, and yeast. *Gene* 323, 101-113.
- Chang, H. W., Watson, J. C. & Jacobs, B. L. (1992). The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4825-4829.
- Chen, L., Willis, S. N., Wei, A., Smith, B. J., Fletcher, J. I., Hinds, M. G., Colman, P. M., Day, C. L., Adams, J. M. & Huang, D. C. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 17, 393-403.
- Chen, R. A., Ryzhakov, G., Cooray, S., Randow, F. & Smith, G. L. (2008). Inhibition of I κ B kinase by vaccinia virus virulence factor B14. *PLoS Pathog* 4, e22.
- Chen, X., Li, W., Ren, J., Huang, D., He, W. T., Song, Y., Yang, C., Zheng, X., Chen, P. & Han, J. (2014). Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell Res* 24, 105-121.
- Chen, Z., Earl, P., Americo, J., Damon, I., Smith, S. K., Zhou, Y. H., Yu, F., Sebrell, A., Emerson, S., Cohen, G., Eisenberg, R. J., Svitel, J., Schuck, P., Satterfield, W., Moss, B. & Purcell, R. (2006). Chimpanzee/human mAbs to vaccinia virus B5 protein neutralize vaccinia and smallpox viruses and protect mice against vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1882-1887.
- Cheng, E. H., Nicholas, J., Bellows, D. S., Hayward, G. S., Guo, H. G., Reitz, M. S. & Hardwick, J. M. (1997). A Bcl-2 homolog encoded by Kaposi sarcoma-associated virus, human herpesvirus 8, inhibits apoptosis but does not heterodimerize with Bax or Bak. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 690-694.
- Chicheportiche, Y., Bourdon, P. R., Xu, H., Hsu, Y. M., Scott, H., Hession, C., Garcia, I. & Browning, J. L. (1997). TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem* 272, 32401-32410.
- Chin, Y. R. & Horwitz, M. S. (2005). Mechanism for removal of tumor necrosis factor receptor 1 from the cell surface by the adenovirus RIDalpha/beta complex. *J Virol* 79, 13606-13617.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M. & Dixit, V. M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505-512.
- Chinnaiyan, A. M., Tepper, C. G., Seldin, M. F., O'Rourke, K., Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Krammer, P. H., Peter, M. E. & Dixit, V. M. (1996). FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 271, 4961-4965.
- Chiou, S. K., Tseng, C. C., Rao, L. & White, E. (1994). Functional complementation of the adenovirus E1B 19-kilodalton protein with Bcl-2 in the inhibition of apoptosis in infected cells. *J Virol* 68, 6553-6566.
- Chiu, V. K., Walsh, C. M., Liu, C. C., Reed, J. C. & Clark, W. R. (1995). Bcl-2 blocks degranulation but not fas-based cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 154, 2023-2032.
- Chiu, Y. H., Macmillan, J. B. & Chen, Z. J. (2009). RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* 138, 576-591.

- Cho, Y. S., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, T. D., Guildford, M. & Chan, F. K. (2009). Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* 137, 1112-1123.
- Chung, C. S., Hsiao, J. C., Chang, Y. S. & Chang, W. (1998). A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *J Virol* 72, 1577-1585.
- Civril, F., Deimling, T., de Oliveira Mann, C. C., Ablasser, A., Moldt, M., Witte, G., Hornung, V. & Hopfner, K. P. (2013). Structural mechanism of cytosolic DNA sensing by cGAS. *Nature* 498, 332-337.
- Clark, K., Nanda, S. & Cohen, P. (2013). Molecular control of the NEMO family of ubiquitin-binding proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 673-685.
- Clarke, P. G. (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 181, 195-213.
- Colamonici, O. R., Domanski, P., Sweitzer, S. M., Lerner, A. & Buller, R. M. (1995). Vaccinia virus B18R gene encodes a type I interferon-binding protein that blocks interferon alpha transmembrane signaling. *J Biol Chem* 270, 15974-15978.
- Coleman, M. L., Sahai, E. A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A. & Olson, M. F. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* 3, 339-345.
- Cooray, S., Bahar, M. W., Abrescia, N. G., McVey, C. E., Bartlett, N. W., Chen, R. A., Stuart, D. I., Grimes, J. M. & Smith, G. L. (2007). Functional and structural studies of the vaccinia virus virulence factor N1 reveal a Bcl-2-like anti-apoptotic protein. *J Gen Virol* 88, 1656-1666.
- Cory, S. & Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-656.
- Croft, D. R., Coleman, M. L., Li, S., Robertson, D., Sullivan, T., Stewart, C. L. & Olson, M. F. (2005). Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration. *J Cell Biol* 168, 245-255.
- Cuconati, A., Degenhardt, K., Sundararajan, R., Anschel, A. & White, E. (2002). Bak and Bax function to limit adenovirus replication through apoptosis induction. *J Virol* 76, 4547-4558.
- Cuconati, A. & White, E. (2002). Viral homologs of BCL-2: role of apoptosis in the regulation of virus infection. *Genes Dev* 16, 2465-2478.
- Curtis, J. L. & Kaltreider, H. B. (1989). Characterization of bronchoalveolar lymphocytes during a specific antibody-forming cell response in the lungs of mice. *Am Rev Respir Dis* 139, 393-400.
- Dales, S. & Mosbach, E. H. (1968). Vaccinia as a model for membrane biogenesis. *Virology* 35, 564-583.
- Damon, I. (2007). *Poxviruses*: Lippincott Williams & Wilkins.
- Davies, M. V., Chang, H. W., Jacobs, B. L. & Kaufman, R. J. (1993). The E3L and K3L vaccinia virus gene products stimulate translation through inhibition of the double-stranded RNA-dependent protein kinase by different mechanisms. *J Virol* 67, 1688-1692.
- Davis, R. E. & Mathews, C. K. (1993). Acidic C terminus of vaccinia virus DNA-binding protein interacts with ribonucleotide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 745-749.
- de Mattia, F., Gubser, C., van Dommelen, M. M., Visch, H. J., Distelmaier, F., Postigo, A., Luyten, T., Parys, J. B., de Smedt, H., Smith, G. L., Willems, P. H. & van Kuppeveld, F. J. (2009). Human Golgi antiapoptotic protein modulates intracellular calcium fluxes. *Mol Biol Cell* 20, 3638-3645.

- Decker, T., Lew, D. J., Mirkovitch, J. & Darnell, J. E., Jr. (1991). Cytoplasmic activation of GAF, an IFN-gamma-regulated DNA-binding factor. *EMBO J* 10, 927-932.
- Degterev, A., Hitomi, J., Gernsheid, M., Ch'en, I. L., Korkina, O., Teng, X., Abbott, D., Cuny, G. D., Yuan, C., Wagner, G., Hedrick, S. M., Gerber, S. A., Lugovskoy, A. & Yuan, J. (2008). Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol* 4, 313-321.
- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G. D., Mitchison, T. J., Moskowitz, M. A. & Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 1, 112-119.
- Degterev, A., Maki, J. L. & Yuan, J. (2013). Activity and specificity of necrostatin-1, small-molecule inhibitor of RIP1 kinase. *Cell Death Differ* 20, 366.
- Degterev, A. & Yuan, J. (2008). Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 378-390.
- Delbridge, A. R., Valente, L. J. & Strasser, A. (2012). The role of the apoptotic machinery in tumor suppression. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
- Dinarello, C. A. (2006). Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process. *Am J Clin Nutr* 83, 447S-455S.
- Dinarello, C. A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 27, 519-550.
- Diner, E. J., Burdette, D. L., Wilson, S. C., Monroe, K. M., Kellenberger, C. A., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Hammond, M. C. & Vance, R. E. (2013). The innate immune DNA sensor cGAS produces a noncanonical cyclic dinucleotide that activates human STING. *Cell Rep* 3, 1355-1361.
- DiPerna, G., Stack, J., Bowie, A. G., Boyd, A., Kotwal, G., Zhang, Z., Arvikar, S., Latz, E., Fitzgerald, K. A. & Marshall, W. L. (2004). Poxvirus protein N1L targets the I-kappaB kinase complex, inhibits signaling to NF-kappaB by the tumor necrosis factor superfamily of receptors, and inhibits NF-kappaB and IRF3 signaling by toll-like receptors. *J Biol Chem* 279, 36570-36578.
- Dobbelstein, M. & Shenk, T. (1996). Protection against apoptosis by the vaccinia virus SPI-2 (B13R) gene product. *J Virol* 70, 6479-6485.
- Doceul, V., Hollinshead, M., van der Linden, L. & Smith, G. L. (2010). Repulsion of superinfecting virions: a mechanism for rapid virus spread. *Science* 327, 873-876.
- Dorfleutner, A., Bryan, N. B., Talbott, S. J., Funya, K. N., Rellick, S. L., Reed, J. C., Shi, X., Rojanasakul, Y., Flynn, D. C. & Stehlik, C. (2007). Cellular pyrin domain-only protein 2 is a candidate regulator of inflammasome activation. *Infect Immun* 75, 1484-1492.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. & Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.
- Duprez, L., Wirawan, E., Vanden Berghe, T. & Vandenabeele, P. (2009). Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect* 11, 1050-1062.
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M. & Kaufmann, S. H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68, 383-424.
- Edgeworth, J. D., Spencer, J., Phalipon, A., Griffin, G. E. & Sansonetti, P. J. (2002). Cytotoxicity and interleukin-1beta processing following *Shigella flexneri* infection of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 32, 1464-1471.
- Ekert, P. G., Silke, J. & Vaux, D. L. (1999). Caspase inhibitors. *Cell Death Differ* 6, 1081-1086.

- Ellis, H. M. & Horvitz, H. R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44, 817-829.
- Elsing, A. & Burgert, H. G. (1998). The adenovirus E3/10.4K-14.5K proteins down-modulate the apoptosis receptor Fas/Apo-1 by inducing its internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10072-10077.
- Ember, S. W., Ren, H., Ferguson, B. J. & Smith, G. L. (2012). Vaccinia virus protein C4 inhibits NF-kappaB activation and promotes virus virulence. *J Gen Virol* 93, 2098-2108.
- Enari, M., Hug, H. & Nagata, S. (1995). Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature* 375, 78-81.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. & Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.
- Espinosa, E. & Chillet, P. (2010). *Immunologie: Ellipses*.
- Fahy, A. S., Clark, R. H., Glyde, E. F. & Smith, G. L. (2008). Vaccinia virus protein C16 acts intracellularly to modulate the host response and promote virulence. *J Gen Virol* 89, 2377-2387.
- Falkner, F. G. & Moss, B. (1990). Transient dominant selection of recombinant vaccinia viruses. *J Virol* 64, 3108-3111.
- Fan, T. J., Han, L. H., Cong, R. S. & Liang, J. (2005). Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 37, 719-727.
- Farrow, S. N., White, J. H., Martinou, I., Raven, T., Pun, K. T., Grinham, C. J., Martinou, J. C. & Brown, R. (1995). Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* 374, 731-733.
- Fenner, F., Anderson, D. A., Arita, I., Jezek, Z. & Ladnyi, I. D. (1988). Smallpox and its Eradication. *Geneva: World Health Organisation*.
- Fenner, F., Anderson, D. A., Arita, I., Jezek, Z. & Ladnyi, I. D. (1988). *Smallpox and its Eradication*. Geneva: World Health Organisation.
- Ferguson, B. J., Mansur, D. S., Peters, N. E., Ren, H. & Smith, G. L. (2012). DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity. *Elife* 1, e00047.
- Fernandes-Alnemri, T., Yu, J. W., Datta, P., Wu, J. & Alnemri, E. S. (2009). AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 458, 509-513.
- Fernandes-Alnemri, T., Yu, J. W., Juliana, C., Solorzano, L., Kang, S., Wu, J., Datta, P., McCormick, M., Huang, L., McDermott, E., Eisenlohr, L., Landel, C. P. & Alnemri, E. S. (2010). The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to *Francisella tularensis*. *Nat Immunol* 11, 385-393.
- Fink, S. L., Bergsbaken, T. & Cookson, B. T. (2008). Anthrax lethal toxin and *Salmonella* elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis via distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 4312-4317.
- Fink, S. L. & Cookson, B. T. (2006). Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol* 8, 1812-1825.
- Fischer, S. F., Ludwig, H., Holzapfel, J., Kvansakul, M., Chen, L., Huang, D. C., Sutter, G., Knese, M. & Hacker, G. (2006). Modified vaccinia virus Ankara protein F1L is a novel BH3-domain-binding protein and acts together with the early viral protein E3L to block virus-associated apoptosis. *Cell Death Differ* 13, 109-118.
- Fitzgerald, K. A., McWhirter, S. M., Faia, K. L., Rowe, D. C., Latz, E., Golenbock, D. T., Coyle, A. J., Liao, S. M. & Maniatis, T. (2003). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* 4, 491-496.

- Frischknecht, F., Moreau, V., Rottger, S., Gonfloni, S., Reckmann, I., Superti-Furga, G. & Way, M. (1999). Actin-based motility of vaccinia virus mimics receptor tyrosine kinase signalling. *Nature* 401, 926-929.
- Fujita, F., Taniguchi, Y., Kato, T., Narita, Y., Furuya, A., Ogawa, T., Sakurai, H., Joh, T., Itoh, M., Delhase, M., Karin, M. & Nakanishi, M. (2003). Identification of NAP1, a regulatory subunit of IkappaB kinase-related kinases that potentiates NF-kappaB signaling. *Mol Cell Biol* 23, 7780-7793.
- Gagliardini, V., Fernandez, P. A., Lee, R. K., Drexler, H. C., Rotello, R. J., Fishman, M. C. & Yuan, J. (1994). Prevention of vertebrate neuronal death by the crmA gene. *Science* 263, 826-828.
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Alnemri, E. S., Altucci, L., Andrews, D., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Baehrecke, E. H., Bazan, N. G., Bertrand, M. J., Bianchi, K., Blagosklonny, M. V., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D. E., Brenner, C., Campanella, M., Candi, E., Cecconi, F., Chan, F. K., Chandel, N. S., Cheng, E. H., Chipuk, J. E., Cidlowski, J. A., Ciechanover, A., Dawson, T. M., Dawson, V. L., De Laurenzi, V., De Maria, R., Debatin, K. M., Di Daniele, N., Dixit, V. M., Dynlacht, B. D., El-Deiry, W. S., Fimia, G. M., Flavell, R. A., Fulda, S., Garrido, C., Gougeon, M. L., Green, D. R., Gronemeyer, H., Hajnoczky, G., Hardwick, J. M., Hengartner, M. O., Ichijo, H., Joseph, B., Jost, P. J., Kaufmann, T., Kepp, O., Klionsky, D. J., Knight, R. A., Kumar, S., Lemasters, J. J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S. A., Lockshin, R. A., Lopez-Otin, C., Lugli, E., Madeo, F., Malorni, W., Marine, J. C., Martin, S. J., Martinou, J. C., Medema, J. P., Meier, P., Melino, S., Mizushima, N., Moll, U., Munoz-Pinedo, C., Nunez, G., Oberst, A., Panaretakis, T., Penninger, J. M., Peter, M. E., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J. H., Puthalakath, H., Rabinovich, G. A., Ravichandran, K. S., Rizzuto, R., Rodrigues, C. M., Rubinsztein, D. C., Rudel, T., Shi, Y., Simon, H. U., Stockwell, B. R., Szabadkai, G., Tait, S. W., Tang, H. L., Tavernarakis, N., Tsujimoto, Y., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Villunger, A., Wagner, E. F., Walczak, H., White, E., Wood, W. G., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Melino, G. & Kroemer, G. (2014a). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ*.
- Galluzzi, L., Brenner, C., Morselli, E., Touat, Z. & Kroemer, G. (2008). Viral control of mitochondrial apoptosis. *PLoS Pathog* 4, e1000018.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Krautwald, S., Kroemer, G. & Linkermann, A. (2014b). Molecular mechanisms of regulated necrosis. *Semin Cell Dev Biol* 35C, 24-32.
- Gangappa, S., van Dyk, L. F., Jewett, T. J., Speck, S. H. & Virgin, H. W. t. (2002). Identification of the in vivo role of a viral bcl-2. *J Exp Med* 195, 931-940.
- Gao, P., Ascano, M., Wu, Y., Barchet, W., Gaffney, B. L., Zillinger, T., Serganov, A. A., Liu, Y., Jones, R. A., Hartmann, G., Tuschl, T. & Patel, D. J. (2013a). Cyclic [G(2',5')pA(3',5')p] is the metazoan second messenger produced by DNA-activated cyclic GMP-AMP synthase. *Cell* 153, 1094-1107.
- Gao, P., Ascano, M., Zillinger, T., Wang, W. Y., Dai, P. H., Serganov, A. A., Gaffney, B. L., Shuman, S., Jones, R. A., Deng, L., Hartmann, G., Barchet, W., Tuschl, T. & Patel, D. J. (2013b). Structure-Function Analysis of STING Activation by c[G(2 '5 ') pA(3 '5 ')p] and Targeting by Antiviral DMXAA. *Cell* 154, 748-762.
- Garcia-Calvo, M., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Vaillancourt, J. P., Zamboni, R., Nicholson, D. W. & Thornberry, N. A. (1999). Purification and catalytic properties of human caspase family members. *Cell Death Differ* 6, 362-369.

- Garcia, M. A., Gil, J., Ventoso, I., Guerra, S., Domingo, E., Rivas, C. & Esteban, M. (2006). Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 1032-1060.
- Garcia, M. A., Guerra, S., Gil, J., Jimenez, V. & Esteban, M. (2002). Anti-apoptotic and oncogenic properties of the dsRNA-binding protein of vaccinia virus, E3L. *Oncogene* 21, 8379-8387.
- Gedey, R., Jin, X. L., Hinthong, O. & Shisler, J. L. (2006). Poxviral regulation of the host NF-kappaB response: the vaccinia virus M2L protein inhibits induction of NF-kappaB activation via an ERK2 pathway in virus-infected human embryonic kidney cells. *J Virol* 80, 8676-8685.
- Gerlic, M., Faustin, B., Postigo, A., Yu, E. C., Proell, M., Gombosuren, N., Krajewska, M., Flynn, R., Croft, M., Way, M., Satterthwait, A., Liddington, R. C., Salek-Ardakani, S., Matsuzawa, S. & Reed, J. C. (2013). Vaccinia virus F1L protein promotes virulence by inhibiting inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 7808-7813.
- Gil, J., Alcamí, J. & Esteban, M. (1999). Induction of apoptosis by double-stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR) involves the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 and NF-kappaB. *Mol Cell Biol* 19, 4653-4663.
- Gil, J. & Esteban, M. (2000). The interferon-induced protein kinase (PKR), triggers apoptosis through FADD-mediated activation of caspase 8 in a manner independent of Fas and TNF-alpha receptors. *Oncogene* 19, 3665-3674.
- Gil, J., Garcia, M. A. & Esteban, M. (2002). Caspase 9 activation by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR: molecular mechanism and relevance. *FEBS Lett* 529, 249-255.
- Gilliet, M., Cao, W. & Liu, Y. J. (2008). Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 8, 594-606.
- Gitlin, L., Barchet, W., Gilfillan, S., Cella, M., Beutler, B., Flavell, R. A., Diamond, M. S. & Colonna, M. (2006). Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8459-8464.
- Goebel, S. J., Johnson, G. P., Perkus, M. E., Davis, S. W., Winslow, J. P. & Paoletti, E. (1990). The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology* 179, 247-266, 517-263.
- Goldmacher, V. S. (2002). vMIA, a viral inhibitor of apoptosis targeting mitochondria. *Biochimie* 84, 177-185.
- Goldmacher, V. S., Bartle, L. M., Skaletskaya, A., Dionne, C. A., Kedersha, N. L., Vater, C. A., Han, J. W., Lutz, R. J., Watanabe, S., Cahir McFarland, E. D., Kieff, E. D., Mocarski, E. S. & Chittenden, T. (1999). A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12536-12541.
- Gomez, C. E., Najera, J. L., Krupa, M. & Esteban, M. (2008). The poxvirus vectors MVA and NYVAC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer. *Curr Gene Ther* 8, 97-120.
- Gracie, J. A., Robertson, S. E. & McInnes, I. B. (2003). Interleukin-18. *J Leukoc Biol* 73, 213-224.
- Graham, K. A., Lalani, A. S., Macen, J. L., Ness, T. L., Barry, M., Liu, L. Y., Lucas, A., Clark-Lewis, I., Moyer, R. W. & McFadden, G. (1997). The T1/35kDa family of poxvirus-secreted proteins bind chemokines and modulate leukocyte influx into virus-infected tissues. *Virology* 229, 12-24.
- Green, D. R. & Kroemer, G. (2005). Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight? *J Clin Invest* 115, 2610-2617.

- Gregory, S. M., Davis, B. K., West, J. A., Taxman, D. J., Matsuzawa, S., Reed, J. C., Ting, J. P. & Damania, B. (2011). Discovery of a viral NLR homolog that inhibits the inflammasome. *Science* 331, 330-334.
- Grimm, S., Stanger, B. Z. & Leder, P. (1996). RIP and FADD: two "death domain"-containing proteins can induce apoptosis by convergent, but dissociable, pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10923-10927.
- Gubser, C., Bergamaschi, D., Hollinshead, M., Lu, X., van Kuppeveld, F. J. & Smith, G. L. (2007). A new inhibitor of apoptosis from vaccinia virus and eukaryotes. *PLoS Pathog* 3, e17.
- Gubser, C., Hue, S., Kellam, P. & Smith, G. L. (2004). Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J Gen Virol* 85, 105-117.
- Gubser, C. & Smith, G. L. (2002). The sequence of camelpox virus shows it is most closely related to variola virus, the cause of smallpox. *J Gen Virol* 83, 855-872.
- Guo, Y., Srinivasula, S. M., Druilhe, A., Fernandes-Alnemri, T. & Alnemri, E. S. (2002). Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J Biol Chem* 277, 13430-13437.
- Han, J., Modha, D. & White, E. (1998). Interaction of E1B 19K with Bax is required to block Bax-induced loss of mitochondrial membrane potential and apoptosis. *Oncogene* 17, 2993-3005.
- Han, J., Sabbatini, P., Perez, D., Rao, L., Modha, D. & White, E. (1996a). The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. *Genes Dev* 10, 461-477.
- Han, J., Sabbatini, P. & White, E. (1996b). Induction of apoptosis by human Nbk/Bik, a BH3-containing protein that interacts with E1B 19K. *Mol Cell Biol* 16, 5857-5864.
- He, S., Liang, Y., Shao, F. & Wang, X. (2011). Toll-like receptors activate programmed necrosis in macrophages through a receptor-interacting kinase-3-mediated pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 20054-20059.
- He, S., Wang, L., Miao, L., Wang, T., Du, F., Zhao, L. & Wang, X. (2009). Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- α . *Cell* 137, 1100-1111.
- Heinkelein, M., Pilz, S. & Jassoy, C. (1996). Inhibition of CD95 (Fas/Apo1)-mediated apoptosis by vaccinia virus WR. *Clin Exp Immunol* 103, 8-14.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yamamoto, M., Kaisho, T., Sanjo, H., Kawai, T., Hoshino, K., Takeda, K. & Akira, S. (2004). The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J Exp Med* 199, 1641-1650.
- Henderson, S., Huen, D., Rowe, M., Dawson, C., Johnson, G. & Rickinson, A. (1993). Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8479-8483.
- Hersh, D., Monack, D. M., Smith, M. R., Ghorri, N., Falkow, S. & Zychlinsky, A. (1999). The Salmonella invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2396-2401.
- Hickish, T., Robertson, D., Clarke, P., Hill, M., di Stefano, F., Clarke, C. & Cunningham, D. (1994). Ultrastructural localization of BHRF1: an Epstein-Barr virus gene product which has homology with bcl-2. *Cancer Res* 54, 2808-2811.
- Hiller, G. & Weber, K. (1985). Golgi-derived membranes that contain an acylated viral polypeptide are used for vaccinia virus envelopment. *J Virol* 55, 651-659.
- Hornung, V., Ablasser, A., Charrel-Dennis, M., Bauernfeind, F., Horvath, G., Caffrey, D. R., Latz, E. & Fitzgerald, K. A. (2009). AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 458, 514-518.

- Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E. O., Kono, H., Rock, K. L., Fitzgerald, K. A. & Latz, E. (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 9, 847-856.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K. K., Schlee, M., Endres, S. & Hartmann, G. (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314, 994-997.
- Horvath, C. M., Stark, G. R., Kerr, I. M. & Darnell, J. E., Jr. (1996). Interactions between STAT and non-STAT proteins in the interferon-stimulated gene factor 3 transcription complex. *Mol Cell Biol* 16, 6957-6964.
- Hruby, D. E., Maki, R. A., Miller, D. B. & Ball, L. A. (1983). Fine structure analysis and nucleotide sequence of the vaccinia virus thymidine kinase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 3411-3415.
- Hsiao, J. C., Chung, C. S. & Chang, W. (1999). Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells. *J Virol* 73, 8750-8761.
- Hsu, H., Shu, H. B., Pan, M. G. & Goeddel, D. V. (1996). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84, 299-308.
- Hsu, H., Xiong, J. & Goeddel, D. V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81, 495-504.
- Huang, D. C., Cory, S. & Strasser, A. (1997). Bcl-2, Bcl-XL and adenovirus protein E1B19kD are functionally equivalent in their ability to inhibit cell death. *Oncogene* 14, 405-414.
- Huang, Q., Petros, A. M., Virgin, H. W., Fesik, S. W. & Olejniczak, E. T. (2002). Solution structure of a Bcl-2 homolog from Kaposi sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3428-3433.
- Hughes, S. J., Johnston, L. H., de Carlos, A. & Smith, G. L. (1991). Vaccinia virus encodes an active thymidylate kinase that complements a cdc8 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 266, 20103-20109.
- Ichihashi, Y. (1996). Extracellular enveloped vaccinia virus escapes neutralization. *Virology* 217, 478-485.
- Isaacs, A. & Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147, 258-267.
- Isaacs, A., Lindenmann, J. & Valentine, R. C. (1957). Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147, 268-273.
- Isaacs, S. N., Kotwal, G. J. & Moss, B. (1992). Vaccinia virus complement-control protein prevents antibody-dependent complement-enhanced neutralization of infectivity and contributes to virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 628-632.
- Ishii, K. J., Coban, C., Kato, H., Takahashi, K., Torii, Y., Takeshita, F., Ludwig, H., Sutter, G., Suzuki, K., Hemmi, H., Sato, S., Yamamoto, M., Uematsu, S., Kawai, T., Takeuchi, O. & Akira, S. (2006). A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol* 7, 40-48.
- Ishii, K. J., Kawagoe, T., Koyama, S., Matsui, K., Kumar, H., Kawai, T., Uematsu, S., Takeuchi, O., Takeshita, F., Coban, C. & Akira, S. (2008). TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature* 451, 725-729.
- Ishikawa, H. & Barber, G. N. (2008). STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 455, 674-678.
- Ishikawa, H., Ma, Z. & Barber, G. N. (2009). STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 461, 788-792.

- Jacobs, N., Bartlett, N. W., Clark, R. H. & Smith, G. L. (2008). Vaccinia virus lacking the Bcl-2-like protein N1 induces a stronger natural killer cell response to infection. *J Gen Virol* 89, 2877-2881.
- Jacobs, N., Chen, R. A., Gubser, C., Najjarro, P. & Smith, G. L. (2006). Intradermal immune response after infection with Vaccinia virus. *J Gen Virol* 87, 1157-1161.
- Janeway, C. A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1, 1-13.
- Jezek, Z., Grab, B., Szczeniowski, M. V., Paluku, K. M. & Mutombo, M. (1988). Human monkeypox: secondary attack rates. *Bull World Health Organ* 66, 465-470.
- Jezek, Z., Marennikova, S. S., Mutumbo, M., Nakano, J. H., Paluku, K. M. & Szczeniowski, M. (1986). Human monkeypox: a study of 2,510 contacts of 214 patients. *J Infect Dis* 154, 551-555.
- Johnston, J. B., Barrett, J. W., Nazarian, S. H., Goodwin, M., Ricciuto, D., Wang, G. & McFadden, G. (2005). A poxvirus-encoded pyrin domain protein interacts with ASC-1 to inhibit host inflammatory and apoptotic responses to infection. *Immunity* 23, 587-598.
- Joklik, W. K. & Becker, Y. (1964). The Replication and Coating of Vaccinia DNA. *J Mol Biol* 10, 452-474.
- Jost, P. J., Grabow, S., Gray, D., McKenzie, M. D., Nachbur, U., Huang, D. C., Bouillet, P., Thomas, H. E., Borner, C., Silke, J., Strasser, A. & Kaufmann, T. (2009). XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature* 460, 1035-1039.
- Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y., Sasaki, T., Elia, A. J., Cheng, H. Y., Ravagnan, L., Ferri, K. F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y. Y., Mak, T. W., Zuniga-Pflucker, J. C., Kroemer, G. & Penninger, J. M. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410, 549-554.
- Kaiser, W. J., Upton, J. W. & Mocarski, E. S. (2008). Receptor-interacting protein homotypic interaction motif-dependent control of NF-kappa B activation via the DNA-dependent activator of IFN regulatory factors. *J Immunol* 181, 6427-6434.
- Kanayama, A., Seth, R. B., Sun, L., Ea, C. K., Hong, M., Shaito, A., Chiu, Y. H., Deng, L. & Chen, Z. J. (2004). TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell* 15, 535-548.
- Karupiah, G., Fredrickson, T. N., Holmes, K. L., Khairallah, L. H. & Buller, R. M. (1993). Importance of interferons in recovery from mousepox. *J Virol* 67, 4214-4226.
- Kates, J. & Beeson, J. (1970). Ribonucleic acid synthesis in vaccinia virus. II. Synthesis of polyriboadenylic acid. *J Mol Biol* 50, 19-33.
- Kates, J. R. & McAuslan, B. R. (1967). Poxvirus DNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58, 134-141.
- Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T. S., Fujita, T. & Akira, S. (2008). Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* 205, 1601-1610.
- Kawai, T. & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11, 373-384.
- Kawanishi, M. (1997). Epstein-Barr virus BHRF1 protein protects intestine 407 epithelial cells from apoptosis induced by tumor necrosis factor alpha and anti-Fas antibody. *J Virol* 71, 3319-3322.

- Keating, S. E., Maloney, G. M., Moran, E. M. & Bowie, A. G. (2007). IRAK-2 participates in multiple toll-like receptor signaling pathways to NFkappaB via activation of TRAF6 ubiquitination. *J Biol Chem* 282, 33435-33443.
- Keck, J. G., Baldick, C. J., Jr. & Moss, B. (1990). Role of DNA replication in vaccinia virus gene expression: a naked template is required for transcription of three late trans-activator genes. *Cell* 61, 801-809.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Kerur, N., Veettil, M. V., Sharma-Walia, N., Bottero, V., Sadagopan, S., Otageri, P. & Chandran, B. (2011). IFI16 acts as a nuclear pathogen sensor to induce the inflammasome in response to Kaposi Sarcoma-associated herpesvirus infection. *Cell Host Microbe* 9, 363-375.
- Kettle, S., Alcamí, A., Khanna, A., Ehret, R., Jassoy, C. & Smith, G. L. (1997). Vaccinia virus serpin B13R (SPI-2) inhibits interleukin-1beta-converting enzyme and protects virus-infected cells from TNF- and Fas-mediated apoptosis, but does not prevent IL-1beta-induced fever. *J Gen Virol* 78 (Pt 3), 677-685.
- Kettle, S., Blake, N. W., Law, K. M. & Smith, G. L. (1995). Vaccinia virus serpins B13R (SPI-2) and B22R (SPI-1) encode M(r) 38.5 and 40K, intracellular polypeptides that do not affect virus virulence in a murine intranasal model. *Virology* 206, 136-147.
- Khan, N., Lawlor, K. E., Murphy, J. M. & Vince, J. E. (2014). More to life than death: molecular determinants of necroptotic and non-necroptotic RIP3 kinase signaling. *Curr Opin Immunol* 26, 76-89.
- Kibler, K. V., Shors, T., Perkins, K. B., Zeman, C. C., Banaszak, M. P., Biesterfeldt, J., Langland, J. O. & Jacobs, B. L. (1997). Double-stranded RNA is a trigger for apoptosis in vaccinia virus-infected cells. *J Virol* 71, 1992-2003.
- Kim, R. (2005). Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 333, 336-343.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H. & Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14, 5579-5588.
- Kotwal, G. J., Hugin, A. W. & Moss, B. (1989). Mapping and insertional mutagenesis of a vaccinia virus gene encoding a 13,800-Da secreted protein. *Virology* 171, 579-587.
- Kotwal, G. J., Isaacs, S. N., McKenzie, R., Frank, M. M. & Moss, B. (1990). Inhibition of the complement cascade by the major secretory protein of vaccinia virus. *Science* 250, 827-830.
- Kotwal, G. J. & Moss, B. (1988). Vaccinia virus encodes a secretory polypeptide structurally related to complement control proteins. *Nature* 335, 176-178.
- Kotwal, G. J. & Moss, B. (1989). Vaccinia virus encodes two proteins that are structurally related to members of the plasma serine protease inhibitor superfamily. *J Virol* 63, 600-606.
- Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 30, 16-34.
- Kumar, H., Kawai, T., Kato, H., Sato, S., Takahashi, K., Coban, C., Yamamoto, M., Uematsu, S., Ishii, K. J., Takeuchi, O. & Akira, S. (2006). Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses. *J Exp Med* 203, 1795-1803.
- Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J. E., Bonzon, C., Sullivan, B. A., Green, D. R. & Newmeyer, D. D. (2005). BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* 17, 525-535.

- Kuwana, T., Mackey, M. R., Perkins, G., Ellisman, M. H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D. R. & Newmeyer, D. D. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111, 331-342.
- Kvansakul, M., Yang, H., Fairlie, W. D., Czabotar, P. E., Fischer, S. F., Perugini, M. A., Huang, D. C. & Colman, P. M. (2008). Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell Death Differ* 15, 1564-1571.
- Lalani, A. S. & McFadden, G. (1997). Secreted poxvirus chemokine binding proteins. *J Leukoc Biol* 62, 570-576.
- Laster, S. M., Wood, J. G. & Gooding, L. R. (1988). Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis. *J Immunol* 141, 2629-2634.
- Law, M., Carter, G. C., Roberts, K. L., Hollinshead, M. & Smith, G. L. (2006). Ligand-induced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5989-5994.
- Leddy, J. P., Simons, R. L. & Douglas, R. G. (1977). Effect of selective complement deficiency on the rate of neutralization of enveloped viruses by human sera. *J Immunol* 118, 28-34.
- Lee, S. B. & Esteban, M. (1994). The interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase induces apoptosis. *Virology* 199, 491-496.
- Lefkowitz, E. J., Wang, C. & Upton, C. (2006). Poxviruses: past, present and future. *Virus Res* 117, 105-118.
- Lew, D. J., Decker, T., Strehlow, I. & Darnell, J. E. (1991). Overlapping elements in the guanylate-binding protein gene promoter mediate transcriptional induction by alpha and gamma interferons. *Mol Cell Biol* 11, 182-191.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J. & Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.
- Li, L. Y., Luo, X. & Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99.
- Li, X., Shu, C., Yi, G., Chaton, C. T., Shelton, C. L., Diao, J., Zuo, X., Kao, C. C., Herr, A. B. & Li, P. (2013a). Cyclic GMP-AMP synthase is activated by double-stranded DNA-induced oligomerization. *Immunity* 39, 1019-1031.
- Li, X. D., Wu, J., Gao, D., Wang, H., Sun, L. & Chen, Z. J. (2013b). Pivotal roles of cGAS-cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects. *Science* 341, 1390-1394.
- Lin, C. L., Chung, C. S., Heine, H. G. & Chang, W. (2000). Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo. *J Virol* 74, 3353-3365.
- Lin, R., Mamane, Y. & Hiscott, J. (1999). Structural and functional analysis of interferon regulatory factor 3: localization of the transactivation and autoinhibitory domains. *Mol Cell Biol* 19, 2465-2474.
- Liu, L., Chavan, R. & Feinberg, M. B. (2008). Dendritic cells are preferentially targeted among hematolymphocytes by Modified Vaccinia Virus Ankara and play a key role in the induction of virus-specific T cell responses in vivo. *BMC Immunol* 9, 15.
- Liu, Y. & Levine, B. (2014). Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death Differ*.
- Lockshin, R. A. & Williams, C. M. (1965). Programmed Cell Death--I. Cytology of Degeneration in the Intersegmental Muscles of the Pernyi Silkworm. *J Insect Physiol* 11, 123-133.
- Locksley, R. M., Killeen, N. & Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.

- Logue, S. E. & Martin, S. J. (2008). Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem Soc Trans* 36, 1-9.
- Loh, J., Huang, Q., Petros, A. M., Nettesheim, D., van Dyk, L. F., Labrada, L., Speck, S. H., Levine, B., Olejniczak, E. T. & Virgin, H. W. t. (2005). A surface groove essential for viral Bcl-2 function during chronic infection in vivo. *PLoS Pathog* 1, e10.
- Los, M., Van de Craen, M., Penning, L. C., Schenk, H., Westendorp, M., Baeuerle, P. A., Droge, W., Krammer, P. H., Fiers, W. & Schulze-Osthoff, K. (1995). Requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/APO-1-mediated apoptosis. *Nature* 375, 81-83.
- Lu, G., Reinert, J. T., Pitha-Rowe, I., Okumura, A., Kellum, M., Knobloch, K. P., Hassel, B. & Pitha, P. M. (2006). ISG15 enhances the innate antiviral response by inhibition of IRF-3 degradation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 52, 29-41.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.
- Luthi, A. U. & Martin, S. J. (2007). The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ* 14, 641-650.
- Macen, J. L., Garner, R. S., Musy, P. Y., Brooks, M. A., Turner, P. C., Moyer, R. W., McFadden, G. & Bleackley, R. C. (1996). Differential inhibition of the Fas- and granule-mediated cytolysis pathways by the orthopoxvirus cytokine response modifier A/SPI-2 and SPI-1 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9108-9113.
- Mack, C., Sickmann, A., Lembo, D. & Brune, W. (2008). Inhibition of proinflammatory and innate immune signaling pathways by a cytomegalovirus RIP1-interacting protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3094-3099.
- Mahy, B. W. (2003). An overview on the use of a viral pathogen as a bioterrorism agent: why smallpox? *Antiviral Res* 57, 1-5.
- Maluquer de Motes, C., Cooray, S., Ren, H., Almeida, G. M., McGourty, K., Bahar, M. W., Stuart, D. I., Grimes, J. M., Graham, S. C. & Smith, G. L. (2011). Inhibition of apoptosis and NF-kappaB activation by vaccinia protein N1 occur via distinct binding surfaces and make different contributions to virulence. *PLoS Pathog* 7, e1002430.
- Maluquer de Motes, C., Schiffner, T., Sumner, R. P. & Smith, G. L. (2014). Vaccinia virus virulence factor N1 can be ubiquitylated on multiple lysine residues. *J Gen Virol* 95, 2038-2049.
- Mann, B. A., Huang, J. H., Li, P., Chang, H. C., Slee, R. B., O'Sullivan, A., Anita, M., Yeh, N., Klemsz, M. J., Brutkiewicz, R. R., Blum, J. S. & Kaplan, M. H. (2008). Vaccinia virus blocks Stat1-dependent and Stat1-independent gene expression induced by type I and type II interferons. *J Interferon Cytokine Res* 28, 367-380.
- Mansur, D. S., Maluquer de Motes, C., Unterholzner, L., Sumner, R. P., Ferguson, B. J., Ren, H., Strnadova, P., Bowie, A. G. & Smith, G. L. (2013). Poxvirus targeting of E3 ligase beta-TrCP by molecular mimicry: a mechanism to inhibit NF-kappaB activation and promote immune evasion and virulence. *PLoS Pathog* 9, e1003183.
- Marchal, J. A., Lopez, G. J., Peran, M., Comino, A., Delgado, J. R., Garcia-Garcia, J. A., Conde, V., Aranda, F. M., Rivas, C., Esteban, M. & Garcia, M. A. (2014). The impact of PKR activation: from neurodegeneration to cancer. *FASEB J* 28, 1965-1974.
- Marshall, W. L., Yim, C., Gustafson, E., Graf, T., Sage, D. R., Hanify, K., Williams, L., Fingerroth, J. & Finberg, R. W. (1999). Epstein-Barr virus encodes a novel homolog of the bcl-2 oncogene that inhibits apoptosis and associates with Bax and Bak. *J Virol* 73, 5181-5185.
- Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M. & Green, D. R. (1995). Early redistribution of plasma membrane

- phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 182, 1545-1556.
- Martinez-Moczygemba, M., Gutch, M. J., French, D. L. & Reich, N. C. (1997). Distinct STAT structure promotes interaction of STAT2 with the p48 subunit of the interferon-alpha-stimulated transcription factor ISGF3. *J Biol Chem* 272, 20070-20076.
- Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 10, 417-426.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S. A., Beutner, G., Brdiczka, D., Remy, R., Xie, Z. H., Reed, J. C. & Kroemer, G. (1998). The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 187, 1261-1271.
- Massung, R. F., Esposito, J. J., Liu, L. I., Qi, J., Utterback, T. R., Knight, J. C., Aubin, L., Yuran, T. E., Parsons, J. M., Loparev, V. N. & et al. (1993). Potential virulence determinants in terminal regions of variola smallpox virus genome. *Nature* 366, 748-751.
- Matsui, K., Kumagai, Y., Kato, H., Sato, S., Kawagoe, T., Uematsu, S., Takeuchi, O. & Akira, S. (2006). Cutting edge: Role of TANK-binding kinase 1 and inducible IkappaB kinase in IFN responses against viruses in innate immune cells. *J Immunol* 177, 5785-5789.
- Mazzarello, P. (1999). A unifying concept: the history of cell theory. *Nat Cell Biol* 1, E13-15.
- McCarthy, N. J., Hazlewood, S. A., Huen, D. S., Rickinson, A. B. & Williams, G. T. (1996). The Epstein-Barr virus gene BHRF1, a homologue of the cellular oncogene Bcl-2, inhibits apoptosis induced by gamma radiation and chemotherapeutic drugs. *Adv Exp Med Biol* 406, 83-97.
- McCormick, A. L., Skaletskaya, A., Barry, P. A., Mocarski, E. S. & Goldmacher, V. S. (2003). Differential function and expression of the viral inhibitor of caspase 8-induced apoptosis (vICA) and the viral mitochondria-localized inhibitor of apoptosis (vMIA) cell death suppressors conserved in primate and rodent cytomegaloviruses. *Virology* 316, 221-233.
- McDonald, C., Inohara, N. & Nunez, G. (2005). Peptidoglycan signaling in innate immunity and inflammatory disease. *J Biol Chem* 280, 20177-20180.
- McGeachy, M. J. & Cua, D. J. (2008). Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity* 28, 445-453.
- McWhirter, S. M., Fitzgerald, K. A., Rosains, J., Rowe, D. C., Golenbock, D. T. & Maniatis, T. (2004). IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 233-238.
- Meager, A., Visvalingam, K., Dilger, P., Bryan, D. & Wadhwa, M. (2005). Biological activity of interleukins-28 and -29: comparison with type I interferons. *Cytokine* 31, 109-118.
- Medzhitov, R. (2009). Approaching the asymptote: 20 years later. *Immunity* 30, 766-775.
- Mercer, J. & Helenius, A. (2008). Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* 320, 531-535.
- Meylan, E., Burns, K., Hofmann, K., Blancheteau, V., Martinon, F., Kelliher, M. & Tschopp, J. (2004). RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* 5, 503-507.
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R. & Tschopp, J. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437, 1167-1172.

- Miura, M., Friedlander, R. M. & Yuan, J. (1995). Tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by a CrmA-sensitive cell death pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8318-8322.
- Modjtahedi, N., Giordanetto, F., Madeo, F. & Kroemer, G. (2006). Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *Trends Cell Biol* 16, 264-272.
- Mori, M., Yoneyama, M., Ito, T., Takahashi, K., Inagaki, F. & Fujita, T. (2004). Identification of Ser-386 of interferon regulatory factor 3 as critical target for inducible phosphorylation that determines activation. *J Biol Chem* 279, 9698-9702.
- Moss, B. (1994). Vaccinia virus transcription. In *Transcription Mechanisms and Regulation*, pp. 185-205. Edited by R. C. C. Conaway, J.W. New York: Raven Press.
- Moss, B. (2007). *Poxviruses*: Lippincott, Williams & Wilkins.
- Moyer, R. W. & Graves, R. L. (1981). The mechanism of cytoplasmic orthopoxvirus DNA replication. *Cell* 27, 391-401.
- Munoz-Pinedo, C. & Martin, S. J. (2014). Autosis: a new addition to the cell death tower of babel. *Cell Death Dis* 5, e1319.
- Munyon, W., Paoletti, E. & Grace, J. T., Jr. (1967). RNA polymerase activity in purified infectious vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58, 2280-2287.
- Murcia-Nicolas, A., Bolbach, G., Blais, J. C. & Beaud, G. (1999). Identification by mass spectroscopy of three major early proteins associated with virosomes in vaccinia virus-infected cells. *Virus Res* 59, 1-12.
- Murphy, J. M., Czabotar, P. E., Hildebrand, J. M., Lucet, I. S., Zhang, J. G., Alvarez-Diaz, S., Lewis, R., Lalaoui, N., Metcalf, D., Webb, A. I., Young, S. N., Varghese, L. N., Tannahill, G. M., Hatchell, E. C., Majewski, I. J., Okamoto, T., Dobson, R. C., Hilton, D. J., Babon, J. J., Nicola, N. A., Strasser, A., Silke, J. & Alexander, W. S. (2013). The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity* 39, 443-453.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M., Janeway, C (2008). *Janeway's immunobiology*: Garland Science.
- Muruve, D. A., Petrilli, V., Zaiss, A. K., White, L. R., Clark, S. A., Ross, P. J., Parks, R. J. & Tschopp, J. (2008). The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* 452, 103-107.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, M. E. & Dixit, V. M. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* 85, 817-827.
- Najarro, P., Traktman, P. & Lewis, J. A. (2001). Vaccinia virus blocks gamma interferon signal transduction: viral VH1 phosphatase reverses Stat1 activation. *J Virol* 75, 3185-3196.
- Nakanishi, K., Maruyama, M., Shibata, T. & Morishima, N. (2001). Identification of a caspase-9 substrate and detection of its cleavage in programmed cell death during mouse development. *J Biol Chem* 276, 41237-41244.
- Ng, A., Tschärke, D. C., Reading, P. C. & Smith, G. L. (2001). The vaccinia virus A41L protein is a soluble 30 kDa glycoprotein that affects virus virulence. *J Gen Virol* 82, 2095-2105.
- Nicholson, D. W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6, 1028-1042.
- Norenberg, M. D. & Rao, K. V. (2007). The mitochondrial permeability transition in neurologic disease. *Neurochem Int* 50, 983-997.

- Novick, D., Kim, S. H., Fantuzzi, G., Reznikov, L. L., Dinarello, C. A. & Rubinstein, M. (1999). Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity* 10, 127-136.
- O'Brien, V. (1998). Viruses and apoptosis. *J Gen Virol* 79 (Pt 8), 1833-1845.
- Oda, S., Schroder, M. & Khan, A. R. (2009). Structural basis for targeting of human RNA helicase DDX3 by poxvirus protein K7. *Structure* 17, 1528-1537.
- Odake, S., Kam, C. M., Narasimhan, L., Poe, M., Blake, J. T., Krahenbuhl, O., Tschopp, J. & Powers, J. C. (1991). Human and murine cytotoxic T lymphocyte serine proteases: subsite mapping with peptide thioester substrates and inhibition of enzyme activity and cytolysis by isocoumarins. *Biochemistry* 30, 2217-2227.
- Oganesyan, G., Saha, S. K., Guo, B., He, J. Q., Shahangian, A., Zarnegar, B., Perry, A. & Cheng, G. (2006). Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 439, 208-211.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B. & Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 552-565.
- Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T. & Seya, T. (2003a). TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 4, 161-167.
- Oshiumi, H., Sasai, M., Shida, K., Fujita, T., Matsumoto, M. & Seya, T. (2003b). TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem* 278, 49751-49762.
- Panicali, D., Davis, S. W., Weinberg, R. L. & Paoletti, E. (1983). Construction of live vaccines by using genetically engineered poxviruses: biological activity of recombinant vaccinia virus expressing influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 5364-5368.
- Panne, D., McWhirter, S. M., Maniatis, T. & Harrison, S. C. (2007). Interferon regulatory factor 3 is regulated by a dual phosphorylation-dependent switch. *J Biol Chem* 282, 22816-22822.
- Paoletti, E. & Grady, L. J. (1977). Transcriptional complexity of vaccinia virus in vivo and in vitro. *J Virol* 23, 608-615.
- Paoletti, E., Lipinskas, B. R., Samsonoff, C., Mercer, S. & Panicali, D. (1984). Construction of live vaccines using genetically engineered poxviruses: biological activity of vaccinia virus recombinants expressing the hepatitis B virus surface antigen and the herpes simplex virus glycoprotein D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 193-197.
- Park, H. H., Logette, E., Raunser, S., Cuenin, S., Walz, T., Tschopp, J. & Wu, H. (2007a). Death domain assembly mechanism revealed by crystal structure of the oligomeric PIDDosome core complex. *Cell* 128, 533-546.
- Park, J. H., Kim, Y. G., McDonald, C., Kanneganti, T. D., Hasegawa, M., Body-Malapel, M., Inohara, N. & Nunez, G. (2007b). RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *J Immunol* 178, 2380-2386.
- Parkinson, J. E. & Smith, G. L. (1994). Vaccinia virus gene A36R encodes a M(r) 43-50 K protein on the surface of extracellular enveloped virus. *Virology* 204, 376-390.
- Pauleau, A. L., Larochette, N., Giordanetto, F., Scholz, S. R., Poncet, D., Zamzami, N., Goldmacher, V. S. & Kroemer, G. (2007). Structure-function analysis of the interaction between Bax and the cytomegalovirus-encoded protein vMIA. *Oncogene* 26, 7067-7080.
- Pennington, T. H. & Follett, E. A. (1974). Vaccinia virus replication in enucleate BSC-1 cells: particle production and synthesis of viral DNA and proteins. *J Virol* 13, 488-493.

- Perez, D. & White, E. (1998). E1B 19K inhibits Fas-mediated apoptosis through FADD-dependent sequestration of FLICE. *J Cell Biol* 141, 1255-1266.
- Perkus, M. E., Goebel, S. J., Davis, S. W., Johnson, G. P., Norton, E. K. & Paoletti, E. (1991). Deletion of 55 open reading frames from the termini of vaccinia virus. *Virology* 180, 406-410.
- Perry, A. K., Chow, E. K., Goodnough, J. B., Yeh, W. C. & Cheng, G. (2004). Differential requirement for TANK-binding kinase-1 in type I interferon responses to toll-like receptor activation and viral infection. *J Exp Med* 199, 1651-1658.
- Peter, M. E. & Krammer, P. H. (1998). Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol* 10, 545-551.
- Peters, N. E., Ferguson, B. J., Mazzon, M., Fahy, A. S., Krysztofinska, E., Arribas-Bosacoma, R., Pearl, L. H., Ren, H. & Smith, G. L. (2013). A mechanism for the inhibition of DNA-PK-mediated DNA sensing by a virus. *PLoS Pathog* 9, e1003649.
- Petros, A. M., Olejniczak, E. T. & Fesik, S. W. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta* 1644, 83-94.
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C. P., Naslund, T. I., Liljestrom, P., Weber, F. & Reis e Sousa, C. (2006). RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 314, 997-1001.
- Pickup, D. J., Ink, B. S., Hu, W., Ray, C. A. & Joklik, W. K. (1986). Hemorrhage in lesions caused by cowpox virus is induced by a viral protein that is related to plasma protein inhibitors of serine proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 7698-7702.
- Platanias, L. C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5, 375-386.
- Poe, M., Blake, J. T., Boulton, D. A., Gammon, M., Sigal, N. H., Wu, J. K. & Zweerink, H. J. (1991). Human cytotoxic lymphocyte granzyme B. Its purification from granules and the characterization of substrate and inhibitor specificity. *J Biol Chem* 266, 98-103.
- Polykratis, A., Hermance, N., Zelic, M., Roderick, J., Kim, C., Van, T. M., Lee, T. H., Chan, F. K., Pasparakis, M. & Kelliher, M. A. (2014). Cutting edge: RIPK1 Kinase inactive mice are viable and protected from TNF-induced necroptosis in vivo. *J Immunol* 193, 1539-1543.
- Pomerantz, J. L. & Baltimore, D. (1999). NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. *EMBO J* 18, 6694-6704.
- Postigo, A., Cross, J. R., Downward, J. & Way, M. (2006). Interaction of F1L with the BH3 domain of Bak is responsible for inhibiting vaccinia-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 13, 1651-1662.
- Postigo, A. & Way, M. (2012). The vaccinia virus-encoded Bcl-2 homologues do not act as direct Bax inhibitors. *J Virol* 86, 203-213.
- Prescott, D. M., Kates, J. & Kirkpatrick, J. B. (1971). Replication of vaccinia virus DNA in enucleated L-cells. *J Mol Biol* 59, 505-508.
- Puthalakath, H., O'Reilly, L. A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P. N., Huntington, N. D., Hughes, P. D., Michalak, E. M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., Gotoh, T., Akira, S., Bouillet, P. & Strasser, A. (2007). ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 129, 1337-1349.
- Puthalakath, H. & Strasser, A. (2002). Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ* 9, 505-512.
- Putz, M. M., Midgley, C. M., Law, M. & Smith, G. L. (2006). Quantification of antibody responses against multiple antigens of the two infectious forms of Vaccinia virus provides a benchmark for smallpox vaccination. *Nat Med* 12, 1310-1315.

- Rahman, M. M., Mohamed, M. R., Kim, M., Smallwood, S. & McFadden, G. (2009). Co-regulation of NF-kappaB and inflammasome-mediated inflammatory responses by myxoma virus pyrin domain-containing protein M013. *PLoS Pathog* 5, e1000635.
- Ramirez, M. C. & Sigal, L. J. (2002). Macrophages and dendritic cells use the cytosolic pathway to rapidly cross-present antigen from live, vaccinia-infected cells. *J Immunol* 169, 6733-6742.
- Randall, R. E. & Goodbourn, S. (2008). Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* 89, 1-47.
- Rao, A. R., Jacob, E. S., Kamalakshi, S., Appaswamy, S. & Bradbury (1968). Epidemiological studies in smallpox. A study of intrafamilial transmission in a series of 254 infected families. *Indian J Med Res* 56, 1826-1854.
- Rao, A. R., Prahlad, I., Swaminathan, M. & Lakshmi, A. (1963). Pregnancy and smallpox. *J Indian Med Assoc* 40, 353-363.
- Rathinam, V. A., Jiang, Z., Waggoner, S. N., Sharma, S., Cole, L. E., Waggoner, L., Vanaja, S. K., Monks, B. G., Ganesan, S., Latz, E., Hornung, V., Vogel, S. N., Szomolanyi-Tsuda, E. & Fitzgerald, K. A. (2010). The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat Immunol* 11, 395-402.
- Rathinam, V. A., Vanaja, S. K. & Fitzgerald, K. A. (2012). Regulation of inflammasome signaling. *Nat Immunol* 13, 333-342.
- Ray, C. A., Black, R. A., Kronheim, S. R., Greenstreet, T. A., Sleath, P. R., Salvesen, G. S. & Pickup, D. J. (1992). Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* 69, 597-604.
- Read, S. H., Baliga, B. C., Ekert, P. G., Vaux, D. L. & Kumar, S. (2002). A novel Apaf-1-independent putative caspase-2 activation complex. *J Cell Biol* 159, 739-745.
- Rebsamen, M., Heinz, L. X., Meylan, E., Michallet, M. C., Schroder, K., Hofmann, K., Vazquez, J., Benedict, C. A. & Tschopp, J. (2009). DAI/ZBP1 recruits RIP1 and RIP3 through RIP homotypic interaction motifs to activate NF-kappaB. *EMBO Rep* 10, 916-922.
- Reeves, M. B., Davies, A. A., McSharry, B. P., Wilkinson, G. W. & Sinclair, J. H. (2007). Complex I binding by a virally encoded RNA regulates mitochondria-induced cell death. *Science* 316, 1345-1348.
- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K. & Lambris, J. D. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 11, 785-797.
- Rivas, C., Gil, J., Melkova, Z., Esteban, M. & Diaz-Guerra, M. (1998). Vaccinia virus E3L protein is an inhibitor of the interferon (i.f.n.)-induced 2-5A synthetase enzyme. *Virology* 243, 406-414.
- Rivera, R., Hutchens, M., Luker, K. E., Sonstein, J., Curtis, J. L. & Luker, G. D. (2007). Murine alveolar macrophages limit replication of vaccinia virus. *Virology* 363, 48-58.
- Roberts, K. L. & Smith, G. L. (2008). Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Trends Microbiol* 16, 472-479.
- Roberts, T. L., Idris, A., Dunn, J. A., Kelly, G. M., Burnton, C. M., Hodgson, S., Hardy, L. L., Garceau, V., Sweet, M. J., Ross, I. L., Hume, D. A. & Stacey, K. J. (2009). HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science* 323, 1057-1060.
- Rodriguez, J. R., Rodriguez, D. & Esteban, M. (1991). Interferon treatment inhibits early events in vaccinia virus gene expression in infected mice. *Virology* 185, 929-933.
- Romano, P. R., Zhang, F., Tan, S. L., Garcia-Barrio, M. T., Katze, M. G., Dever, T. E. & Hinnebusch, A. G. (1998). Inhibition of double-stranded RNA-dependent protein

- kinase PKR by vaccinia virus E3: role of complex formation and the E3 N-terminal domain. *Mol Cell Biol* 18, 7304-7316.
- Rothenfusser, S., Goutagny, N., DiPerna, G., Gong, M., Monks, B. G., Schoenemeyer, A., Yamamoto, M., Akira, S. & Fitzgerald, K. A. (2005). The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol* 175, 5260-5268.
- Roy, D. J., Ebrahimi, B. C., Dutia, B. M., Nash, A. A. & Stewart, J. P. (2000). Murine gammaherpesvirus M11 gene product inhibits apoptosis and is expressed during virus persistence. *Arch Virol* 145, 2411-2420.
- Rubio-Moscardo, F., Blesa, D., Mestre, C., Siebert, R., Balasas, T., Benito, A., Rosenwald, A., Climent, J., Martinez, J. I., Schilhabel, M., Karran, E. L., Gesk, S., Esteller, M., deLeeuw, R., Staudt, L. M., Fernandez-Luna, J. L., Pinkel, D., Dyer, M. J. & Martinez-Climent, J. A. (2005). Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood* 106, 3214-3222.
- Rudensky, A. Y. (2011). Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol Rev* 241, 260-268.
- Ruiz-Vela, A., Opferman, J. T., Cheng, E. H. & Korsmeyer, S. J. (2005). Proapoptotic BAX and BAK control multiple initiator caspases. *EMBO Rep* 6, 379-385.
- Ryzhakov, G. & Randow, F. (2007). SINTBAD, a novel component of innate antiviral immunity, shares a TBK1-binding domain with NAP1 and TANK. *EMBO J* 26, 3180-3190.
- Saha, S. K., Pietras, E. M., He, J. Q., Kang, J. R., Liu, S. Y., Oganessian, G., Shahangian, A., Zarnegar, B., Shiba, T. L., Wang, Y. & Cheng, G. (2006). Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *EMBO J* 25, 3257-3263.
- Salvesen, G. S. & Dixit, V. M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10964-10967.
- Salzman, N. P. (1960). The rate of formation of vaccinia deoxyribonucleic acid and vaccinia virus. *Virology* 10, 150-152.
- Santos, C. R., Blanco, S., Sevilla, A. & Lazo, P. A. (2006). Vaccinia virus B1R kinase interacts with JIP1 and modulates c-Jun-dependent signaling. *J Virol* 80, 7667-7675.
- Saraiva, N., Prole, D. L., Carrara, G., Johnson, B. F., Taylor, C. W., Parsons, M. & Smith, G. L. (2013a). hGAAP promotes cell adhesion and migration via the stimulation of store-operated Ca²⁺ entry and calpain 2. *J Cell Biol* 202, 699-713.
- Saraiva, N., Prole, D. L., Carrara, G., Maluquer de Motes, C., Johnson, B. F., Byrne, B., Taylor, C. W. & Smith, G. L. (2013b). Human and viral Golgi anti-apoptotic proteins (GAAPs) oligomerize via different mechanisms and monomeric GAAP inhibits apoptosis and modulates calcium. *J Biol Chem* 288, 13057-13067.
- Sarkar, A., Hall, M. W., Exline, M., Hart, J., Knatz, N., Gatson, N. T. & Wewers, M. D. (2006). Caspase-1 regulates Escherichia coli sepsis and splenic B cell apoptosis independently of interleukin-1beta and interleukin-18. *Am J Respir Crit Care Med* 174, 1003-1010.
- Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N. & Taniguchi, T. (2000). Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* 13, 539-548.
- Satoh, T., Kato, H., Kumagai, Y., Yoneyama, M., Sato, S., Matsushita, K., Tsujimura, T., Fujita, T., Akira, S. & Takeuchi, O. (2010). LGP2 is a positive regulator of RIG-I and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 1512-1517.

- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H. & Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 17, 1675-1687.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P. H. & Peter, M. E. (1999). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274, 1541-1548.
- Schindler, C. & Darnell, J. E., Jr. (1995). Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* 64, 621-651.
- Schlee, M., Roth, A., Hornung, V., Hagmann, C. A., Wimmenauer, V., Barchet, W., Coch, C., Janke, M., Mihailovic, A., Wardle, G., Juranek, S., Kato, H., Kawai, T., Poeck, H., Fitzgerald, K. A., Takeuchi, O., Akira, S., Tuschl, T., Latz, E., Ludwig, J. & Hartmann, G. (2009). Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity* 31, 25-34.
- Schmidt, A., Schwerd, T., Hamm, W., Hellmuth, J. C., Cui, S., Wenzel, M., Hoffmann, F. S., Michallet, M. C., Besch, R., Hopfner, K. P., Endres, S. & Rothenfusser, S. (2009). 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12067-12072.
- Schmidt, F. I., Bleck, C. K., Helenius, A. & Mercer, J. (2011). Vaccinia extracellular virions enter cells by macropinocytosis and acid-activated membrane rupture. *EMBO J* 30, 3647-3661.
- Schroder, M., Baran, M. & Bowie, A. G. (2008). Viral targeting of DEAD box protein 3 reveals its role in TBK1/IKKepsilon-mediated IRF activation. *EMBO J* 27, 2147-2157.
- Schroter, M., Lowin, B., Borner, C. & Tschopp, J. (1995). Regulation of Fas(Apo-1/CD95)- and perforin-mediated lytic pathways of primary cytotoxic T lymphocytes by the protooncogene bcl-2. *Eur J Immunol* 25, 3509-3513.
- Schultz, U., Kaspers, B. & Staeheli, P. (2004). The interferon system of non-mammalian vertebrates. *Dev Comp Immunol* 28, 499-508.
- Schweichel, J. U. & Merker, H. J. (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7, 253-266.
- Schweneker, M., Lukassen, S., Spath, M., Wolferstatter, M., Babel, E., Brinkmann, K., Wielert, U., Chaplin, P., Suter, M. & Hausmann, J. (2012). The vaccinia virus O1 protein is required for sustained activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and promotes viral virulence. *J Virol* 86, 2323-2336.
- Seet, B. T., Singh, R., Paavola, C., Lau, E. K., Handel, T. M. & McFadden, G. (2001). Molecular determinants for CC-chemokine recognition by a poxvirus CC-chemokine inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9008-9013.
- Segal, A. W. (2005). How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 23, 197-223.
- Segawa, K., Kurata, S., Yanagihashi, Y., Brummelkamp, T. R., Matsuda, F. & Nagata, S. (2014). Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. *Science* 344, 1164-1168.
- Sen, R. & Baltimore, D. (1986a). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47, 921-928.
- Sen, R. & Baltimore, D. (1986b). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46, 705-716.
- Senkevich, T. G., Muravnik, G. L., Pozdnyakov, S. G., Chizhikov, V. E., Ryazankina, O. I., Shchelkunov, S. N., Koonin, E. V. & Chernos, V. I. (1993). Nucleotide sequence of XhoI O fragment of ectromelia virus DNA reveals significant differences from vaccinia virus. *Virus Res* 30, 73-88.

- Senkevich, T. G., Ojeda, S., Townsley, A., Nelson, G. E. & Moss, B. (2005). Poxvirus multiprotein entry-fusion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18572-18577.
- Servant, M. J., Grandvaux, N., tenOever, B. R., Duguay, D., Lin, R. & Hiscott, J. (2003). Identification of the minimal phosphoacceptor site required for in vivo activation of interferon regulatory factor 3 in response to virus and double-stranded RNA. *J Biol Chem* 278, 9441-9447.
- Seth, R. B., Sun, L., Ea, C. K. & Chen, Z. J. (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 122, 669-682.
- Sharma, S., tenOever, B. R., Grandvaux, N., Zhou, G. P., Lin, R. & Hiscott, J. (2003). Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 300, 1148-1151.
- Sharp, T. V., Moonan, F., Romashko, A., Joshi, B., Barber, G. N. & Jagus, R. (1998). The vaccinia virus E3L gene product interacts with both the regulatory and the substrate binding regions of PKR: implications for PKR autoregulation. *Virology* 250, 302-315.
- Shaw, M. H., Reimer, T., Sanchez-Valdepenas, C., Warner, N., Kim, Y. G., Fresno, M. & Nunez, G. (2009). T cell-intrinsic role of Nod2 in promoting type 1 immunity to *Toxoplasma gondii*. *Nat Immunol* 10, 1267-1274.
- Shchelkunov, S. N., Blinov, V. M. & Sandakhchiev, L. S. (1993). Genes of variola and vaccinia viruses necessary to overcome the host protective mechanisms. *FEBS Lett* 319, 80-83.
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C. B. & Tsujimoto, Y. (2004). Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 6, 1221-1228.
- Shimizu, S., Narita, M. & Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, 483-487.
- Shisler, J. L. & Jin, X. L. (2004). The vaccinia virus K1L gene product inhibits host NF-kappaB activation by preventing IkappaBalpha degradation. *J Virol* 78, 3553-3560.
- Shuman, S. (1992). Vaccinia virus RNA helicase: an essential enzyme related to the DE-H family of RNA-dependent NTPases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10935-10939.
- Silke, J. & Meier, P. (2013). Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins-modulators of cell death and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.
- Silverman, R. H. (2007). Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *J Virol* 81, 12720-12729.
- Skaletskaya, A., Bartle, L. M., Chittenden, T., McCormick, A. L., Mocarski, E. S. & Goldmacher, V. S. (2001). A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7829-7834.
- Slabaugh, M., Roseman, N., Davis, R. & Mathews, C. (1988). Vaccinia virus-encoded ribonucleotide reductase: sequence conservation of the gene for the small subunit and its amplification in hydroxyurea-resistant mutants. *J Virol* 62, 519-527.
- Slee, E. A., Adrain, C. & Martin, S. J. (1999a). Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ* 6, 1067-1074.
- Slee, E. A., Adrain, C. & Martin, S. J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 276, 7320-7326.
- Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., Wang, H. G., Reed, J. C., Nicholson, D. W., Alnemri, E. S., Green, D. R. & Martin, S. J. (1999b). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical

- activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 144, 281-292.
- Smith, C. A., Davis, T., Wignall, J. M., Din, W. S., Farrah, T., Upton, C., McFadden, G. & Goodwin, R. G. (1991a). T2 open reading frame from the Shope fibroma virus encodes a soluble form of the TNF receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 176, 335-342.
- Smith, C. A., Smith, T. D., Smolak, P. J., Friend, D., Hagen, H., Gerhart, M., Park, L., Pickup, D. J., Torrance, D., Mohler, K., Schooley, K. & Goodwin, R. G. (1997). Poxvirus genomes encode a secreted, soluble protein that preferentially inhibits beta chemokine activity yet lacks sequence homology to known chemokine receptors. *Virology* 236, 316-327.
- Smith, G. L., Mackett, M. & Moss, B. (1983a). Infectious vaccinia virus recombinants that express hepatitis B virus surface antigen. *Nature* 302, 490-495.
- Smith, G. L. & Moss, B. (1983). Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25 000 base pairs of foreign DNA. *Gene* 25, 21-28.
- Smith, G. L., Murphy, B. R. & Moss, B. (1983b). Construction and characterization of an infectious vaccinia virus recombinant that expresses the influenza hemagglutinin gene and induces resistance to influenza virus infection in hamsters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 7155-7159.
- Smith, G. L. (1994). Virus strategies for evasion of the host response to infection. *Trends Microbiol* 2, 81-88.
- Smith, G. L., Benfield, C. T., Maluquer de Motes, C., Mazzon, M., Ember, S. W., Ferguson, B. J. & Sumner, R. P. (2013). Vaccinia virus immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity. *J Gen Virol* 94, 2367-2392.
- Smith, G. L. & Chan, Y. S. (1991). Two vaccinia virus proteins structurally related to the interleukin-1 receptor and the immunoglobulin superfamily. *J Gen Virol* 72 (Pt 3), 511-518.
- Smith, G. L., Chan, Y. S. & Howard, S. T. (1991b). Nucleotide sequence of 42 kbp of vaccinia virus strain WR from near the right inverted terminal repeat. *J Gen Virol* 72 (Pt 6), 1349-1376.
- Smith, G. L., de Carlos, A. & Chan, Y. S. (1989a). Vaccinia virus encodes a thymidylate kinase gene: sequence and transcriptional mapping. *Nucleic Acids Res* 17, 7581-7590.
- Smith, G. L., Howard, S. T. & Chan, Y. S. (1989b). Vaccinia virus encodes a family of genes with homology to serine proteinase inhibitors. *J Gen Virol* 70 (Pt 9), 2333-2343.
- Smith, G. L., Vanderplasschen, A. & Law, M. (2002). The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *J Gen Virol* 83, 2915-2931.
- Smith, V. P., Bryant, N. A. & Alcamí, A. (2000). Ectromelia, vaccinia and cowpox viruses encode secreted interleukin-18-binding proteins. *J Gen Virol* 81, 1223-1230.
- Soulat, D., Burckstummer, T., Westermayer, S., Goncalves, A., Bauch, A., Stefanovic, A., Hantschel, O., Bennett, K. L., Decker, T. & Superti-Furga, G. (2008). The DEAD-box helicase DDX3X is a critical component of the TANK-binding kinase 1-dependent innate immune response. *EMBO J* 27, 2135-2146.
- Sprick, M. R., Rieser, E., Stahl, H., Grosse-Wilde, A., Weigand, M. A. & Walczak, H. (2002). Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J* 21, 4520-4530.
- Spriggs, M. K., Hruby, D. E., Maliszewski, C. R., Pickup, D. J., Sims, J. E., Buller, R. M. & VanSlyke, J. (1992). Vaccinia and cowpox viruses encode a novel secreted interleukin-1-binding protein. *Cell* 71, 145-152.

- Sridharan, H. & Upton, J. W. (2014). Programmed necrosis in microbial pathogenesis. *Trends Microbiol* 22, 199-207.
- Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G. & Alnemri, E. S. (1996). Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14486-14491.
- Stack, J., Haga, I. R., Schroder, M., Bartlett, N. W., Maloney, G., Reading, P. C., Fitzgerald, K. A., Smith, G. L. & Bowie, A. G. (2005). Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence. *J Exp Med* 201, 1007-1018.
- Stack, J., Hurst, T. P., Flannery, S. M., Brennan, K., Rupp, S., Oda, S., Khan, A. R. & Bowie, A. G. (2013). Poxviral protein A52 stimulates p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation by causing tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) self-association leading to transforming growth factor beta-activated kinase 1 (TAK1) recruitment. *J Biol Chem* 288, 33642-33653.
- Stegh, A. H., Herrmann, H., Lampel, S., Weisenberger, D., Andra, K., Seper, M., Wiche, G., Krammer, P. H. & Peter, M. E. (2000). Identification of the cytolinker plectin as a major early in vivo substrate for caspase 8 during CD95- and tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 20, 5665-5679.
- Stetson, D. B. & Medzhitov, R. (2006). Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* 24, 93-103.
- Stewart, T. L., Wasilenko, S. T. & Barry, M. (2005). Vaccinia virus F1L protein is a tail-anchored protein that functions at the mitochondria to inhibit apoptosis. *J Virol* 79, 1084-1098.
- Su, J., Wang, G., Barrett, J. W., Irvine, T. S., Gao, X. & McFadden, G. (2006). Myxoma virus M11L blocks apoptosis through inhibition of conformational activation of Bax at the mitochondria. *J Virol* 80, 1140-1151.
- Suliman, A., Lam, A., Datta, R. & Srivastava, R. K. (2001). Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene* 20, 2122-2133.
- Sumner, R. P., Maluquer de Motes, C., Veyer, D. L. & Smith, G. L. (2014). Vaccinia virus inhibits NF-kappaB-dependent gene expression downstream of p65 translocation. *J Virol* 88, 3092-3102.
- Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D., Wang, L., Yan, J., Liu, W., Lei, X. & Wang, X. (2012). Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell* 148, 213-227.
- Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X. & Chen, Z. J. (2013). Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* 339, 786-791.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebbersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M. & Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.
- Sutter, G. & Moss, B. (1992). Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10847-10851.
- Sutton, V. R., Davis, J. E., Cancilla, M., Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., Sedelies, K., Browne, K. A. & Trapani, J. A. (2000). Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *J Exp Med* 192, 1403-1414.

- Sutton, V. R., Vaux, D. L. & Trapani, J. A. (1997). Bcl-2 prevents apoptosis induced by perforin and granzyme B, but not that mediated by whole cytotoxic lymphocytes. *J Immunol* 158, 5783-5790.
- Symons, J. A., Adams, E., Tschärke, D. C., Reading, P. C., Waldmann, H. & Smith, G. L. (2002). The vaccinia virus C12L protein inhibits mouse IL-18 and promotes virus virulence in the murine intranasal model. *J Gen Virol* 83, 2833-2844.
- Symons, J. A., Alcami, A. & Smith, G. L. (1995). Vaccinia virus encodes a soluble type I interferon receptor of novel structure and broad species specificity. *Cell* 81, 551-560.
- Tait, S. W., Oberst, A., Quarato, G., Milasta, S., Haller, M., Wang, R., Karvela, M., Ichim, G., Yatim, N., Albert, M. L., Kidd, G., Wakefield, R., Frase, S., Krautwald, S., Linkermann, A. & Green, D. R. (2013). Widespread mitochondrial depletion via mitophagy does not compromise necroptosis. *Cell Rep* 5, 878-885.
- Takahashi, N., Duprez, L., Grootjans, S., Cauwels, A., Nerinckx, W., DuHadaway, J. B., Goossens, V., Roelandt, R., Van Hauwermeiren, F., Libert, C., Declercq, W., Callewaert, N., Prendergast, G. C., Degterev, A., Yuan, J. & Vandenabeele, P. (2012). Necrostatin-1 analogues: critical issues on the specificity, activity and in vivo use in experimental disease models. *Cell Death Dis* 3, e437.
- Takaoka, A., Wang, Z., Choi, M. K., Yanai, H., Negishi, H., Ban, T., Lu, Y., Miyagishi, M., Kodama, T., Honda, K., Ohba, Y. & Taniguchi, T. (2007). DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448, 501-505.
- Takeuchi, O. & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805-820.
- Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A. & Tanaka, N. (2001). IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol* 19, 623-655.
- Taniguchi, T. & Takaoka, A. (2002). The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr Opin Immunol* 14, 111-116.
- Tarodi, B., Subramanian, T. & Chinnadurai, G. (1994). Epstein-Barr virus BHRF1 protein protects against cell death induced by DNA-damaging agents and heterologous viral infection. *Virology* 201, 404-407.
- Tartaglia, J., Perkus, M. E., Taylor, J., Norton, E. K., Audonnet, J. C., Cox, W. I., Davis, S. W., van der Hoeven, J., Meignier, B., Riviere, M. & et al. (1992). NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology* 188, 217-232.
- Tattersall, P. & Ward, D. C. (1976). Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA. *Nature* 263, 106-109.
- Taylor, J. M., Quilty, D., Banadyga, L. & Barry, M. (2006). The vaccinia virus protein F1L interacts with Bim and inhibits activation of the pro-apoptotic protein Bax. *J Biol Chem* 281, 39728-39739.
- Taylor, R. C., Cullen, S. P. & Martin, S. J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 231-241.
- Tengelsen, L. A., Slabaugh, M. B., Bibler, J. K. & Hruby, D. E. (1988). Nucleotide sequence and molecular genetic analysis of the large subunit of ribonucleotide reductase encoded by vaccinia virus. *Virology* 164, 121-131.
- Tewari, M. & Dixit, V. M. (1995). Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J Biol Chem* 270, 3255-3260.
- Tinel, A. & Tschoop, J. (2004). The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* 304, 843-846.
- Tollefson, A. E., Toth, K., Doronin, K., Kuppuswamy, M., Doronina, O. A., Lichtenstein, D. L., Hermiston, T. W., Smith, C. A. & Wold, W. S. (2001). Inhibition of TRAIL-

- induced apoptosis and forced internalization of TRAIL receptor 1 by adenovirus proteins. *J Virol* 75, 8875-8887.
- Tooze, J., Hollinshead, M., Reis, B., Radsak, K. & Kern, H. (1993). Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur J Cell Biol* 60, 163-178.
- Townsley, A. C., Weisberg, A. S., Wagenaar, T. R. & Moss, B. (2006). Vaccinia virus entry into cells via a low-pH-dependent endosomal pathway. *J Virol* 80, 8899-8908.
- Trapani, J. A. & Smyth, M. J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2, 735-747.
- Tscharke, D. C. & Smith, G. L. (1999). A model for vaccinia virus pathogenesis and immunity based on intradermal injection of mouse ear pinnae. *J Gen Virol* 80 (Pt 10), 2751-2755.
- Tschopp, J., Thome, M., Hofmann, K. & Meink, E. (1998). The fight of viruses against apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 8, 82-87.
- Tseng, M., Palaniyar, N., Zhang, W. & Evans, D. H. (1999). DNA binding and aggregation properties of the vaccinia virus I3L gene product. *J Biol Chem* 274, 21637-21644.
- Turner, S. J., Silke, J., Kenshole, B. & Ruby, J. (2000). Characterization of the ectromelia virus serpin, SPI-2. *J Gen Virol* 81, 2425-2430.
- Ullman, E., Fan, Y., Stawowczyk, M., Chen, H. M., Yue, Z. & Zong, W. X. (2008). Autophagy promotes necrosis in apoptosis-deficient cells in response to ER stress. *Cell Death Differ* 15, 422-425.
- Unterholzner, L., Keating, S. E., Baran, M., Horan, K. A., Jensen, S. B., Sharma, S., Sirois, C. M., Jin, T., Latz, E., Xiao, T. S., Fitzgerald, K. A., Paludan, S. R. & Bowie, A. G. (2010). IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat Immunol* 11, 997-1004.
- Unterholzner, L., Sumner, R. P., Baran, M., Ren, H., Mansur, D. S., Bourke, N. M., Randow, F., Smith, G. L. & Bowie, A. G. (2011). Vaccinia virus protein C6 is a virulence factor that binds TBK-1 adaptor proteins and inhibits activation of IRF3 and IRF7. *PLoS Pathog* 7, e1002247.
- Upton, C., Slack, S., Hunter, A. L., Ehlers, A. & Roper, R. L. (2003). Poxvirus orthologous clusters: toward defining the minimum essential poxvirus genome. *J Virol* 77, 7590-7600.
- Upton, J. W., Kaiser, W. J. & Mocarski, E. S. (2008). Cytomegalovirus M45 cell death suppression requires receptor-interacting protein (RIP) homotypic interaction motif (RHIM)-dependent interaction with RIP1. *J Biol Chem* 283, 16966-16970.
- Upton, J. W., Kaiser, W. J. & Mocarski, E. S. (2010). Virus Inhibition of RIP3-Dependent Necrosis. *Cell Host & Microbe* 7, 302-313.
- Upton, J. W., Kaiser, W. J. & Mocarski, E. S. (2012). DAI/ZBP1/DLM-1 complexes with RIP3 to mediate virus-induced programmed necrosis that is targeted by murine cytomegalovirus vIRA. *Cell Host Microbe* 11, 290-297.
- Vallabhapurapu, S. & Karin, M. (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 27, 693-733.
- van Delft, M. F. & Huang, D. C. (2006). How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Res* 16, 203-213.
- van den Broek, M. F., Muller, U., Huang, S., Aguet, M. & Zinkernagel, R. M. (1995). Antiviral defense in mice lacking both alpha/beta and gamma interferon receptors. *J Virol* 69, 4792-4796.
- Vandenabeele, P., Declercq, W., Van Herreweghe, F. & Vanden Berghe, T. (2010). The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis. *Sci Signal* 3, re4.

- Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H. & Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 135-147.
- Vanderplasschen, A., Mathew, E., Hollinshead, M., Sim, R. B. & Smith, G. L. (1998). Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement because of incorporation of host complement control proteins into its envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7544-7549.
- Varfolomeev, E., Wayson, S. M., Dixit, V. M., Fairbrother, W. J. & Vucic, D. (2006). The inhibitor of apoptosis protein fusion c-IAP2.MALT1 stimulates NF-kappaB activation independently of TRAF1 AND TRAF2. *J Biol Chem* 281, 29022-29029.
- Veyer, D. L., Maluquer de Motes, C., Sumner, R. P., Ludwig, L., Johnson, B. F. & Smith, G. L. (2014). Analysis of the anti-apoptotic activity of four vaccinia virus proteins demonstrates that B13 is the most potent inhibitor in isolation and during viral infection. *J Gen Virol*.
- Vince, J. E., Pantaki, D., Feltham, R., Mace, P. D., Cordier, S. M., Schmukle, A. C., Davidson, A. J., Callus, B. A., Wong, W. W., Gentle, I. E., Carter, H., Lee, E. F., Walczak, H., Day, C. L., Vaux, D. L. & Silke, J. (2009). TRAF2 must bind to cellular inhibitors of apoptosis for tumor necrosis factor (tnf) to efficiently activate nf- $\{\kappa\}$ b and to prevent tnf-induced apoptosis. *J Biol Chem* 284, 35906-35915.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9, 503-510.
- Vos, J. C. & Stunnenberg, H. G. (1988). Derepression of a novel class of vaccinia virus genes upon DNA replication. *EMBO J* 7, 3487-3492.
- Wajant, H. (2002). The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296, 1635-1636.
- Walsh, S. R. & Dolin, R. (2011). Vaccinia viruses: vaccines against smallpox and vectors against infectious diseases and tumors. *Expert Rev Vaccines* 10, 1221-1240.
- Wang, G. H., Garvey, T. L. & Cohen, J. I. (1999). The murine gammaherpesvirus-68 M11 protein inhibits Fas- and TNF-induced apoptosis. *J Gen Virol* 80 (Pt 10), 2737-2740.
- Wang, H. W., Sharp, T. V., Koumi, A., Koentges, G. & Boshoff, C. (2002). Characterization of an anti-apoptotic glycoprotein encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus which resembles a spliced variant of human survivin. *EMBO J* 21, 2602-2615.
- Wang, L., Du, F. & Wang, X. (2008a). TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 133, 693-703.
- Wang, X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15, 2922-2933.
- Wang, Z., Choi, M. K., Ban, T., Yanai, H., Negishi, H., Lu, Y., Tamura, T., Takaoka, A., Nishikura, K. & Taniguchi, T. (2008b). Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5477-5482.
- Wang, Z., Jiang, H., Chen, S., Du, F. & Wang, X. (2012). The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. *Cell* 148, 228-243.
- Ward, B. M. & Moss, B. (2001). Vaccinia virus intracellular movement is associated with microtubules and independent of actin tails. *J Virol* 75, 11651-11663.
- Wasilenko, S. T., Banadyga, L., Bond, D. & Barry, M. (2005). The vaccinia virus F1L protein interacts with the proapoptotic protein Bak and inhibits Bak activation. *J Virol* 79, 14031-14043.

- Wasilenko, S. T., Meyers, A. F., Vander Helm, K. & Barry, M. (2001). Vaccinia virus infection disarms the mitochondrion-mediated pathway of the apoptotic cascade by modulating the permeability transition pore. *J Virol* 75, 11437-11448.
- Wasilenko, S. T., Stewart, T. L., Meyers, A. F. & Barry, M. (2003). Vaccinia virus encodes a previously uncharacterized mitochondrial-associated inhibitor of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14345-14350.
- Waterhouse, N. J. & Trapani, J. A. (2002). CTL: Caspases Terminate Life, but that's not the whole story. *Tissue Antigens* 59, 175-183.
- Watson, J. C., Chang, H. W. & Jacobs, B. L. (1991). Characterization of a vaccinia virus-encoded double-stranded RNA-binding protein that may be involved in inhibition of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Virology* 185, 206-216.
- Watson, P. R., Gautier, A. V., Paulin, S. M., Bland, A. P., Jones, P. W. & Wallis, T. S. (2000). Salmonella enterica serovars Typhimurium and Dublin can lyse macrophages by a mechanism distinct from apoptosis. *Infect Immun* 68, 3744-3747.
- Weber, F., Wagner, V., Rasmussen, S. B., Hartmann, R. & Paludan, S. R. (2006). Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *J Virol* 80, 5059-5064.
- Wei, C. M. & Moss, B. (1975). Methylated nucleotides block 5'-terminus of vaccinia virus messenger RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 318-322.
- Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B. & Korsmeyer, S. J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727-730.
- West, B. C., Eschete, M. L., Cox, M. E. & King, J. W. (1987). Neutrophil uptake of vaccinia virus in vitro. *J Infect Dis* 156, 597-606.
- Whilding, L. M., Archibald, K. M., Kulbe, H., Balkwill, F. R., Oberg, D. & McNeish, I. A. (2013). Vaccinia virus induces programmed necrosis in ovarian cancer cells. *Mol Ther* 21, 2074-2086.
- White, E., Cipriani, R., Sabbatini, P. & Denton, A. (1991). Adenovirus E1B 19-kilodalton protein overcomes the cytotoxicity of E1A proteins. *J Virol* 65, 2968-2978.
- Wickliffe, K. E., Leppla, S. H. & Moayeri, M. (2008). Killing of macrophages by anthrax lethal toxin: involvement of the N-end rule pathway. *Cell Microbiol* 10, 1352-1362.
- Wu, J., Sun, L., Chen, X., Du, F., Shi, H., Chen, C. & Chen, Z. J. (2013). Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* 339, 826-830.
- Wyatt, L. S., Earl, P. L., Eller, L. A. & Moss, B. (2004). Highly attenuated smallpox vaccine protects mice with and without immune deficiencies against pathogenic vaccinia virus challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4590-4595.
- Xu, L. G., Wang, Y. Y., Han, K. J., Li, L. Y., Zhai, Z. & Shu, H. B. (2005). VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* 19, 727-740.
- Xu, Q. & Reed, J. C. (1998). Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol Cell* 1, 337-346.
- Yang, P., An, H., Liu, X., Wen, M., Zheng, Y., Rui, Y. & Cao, X. (2010). The cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a beta-catenin-dependent pathway. *Nat Immunol* 11, 487-494.
- Yao, Y., Li, P., Singh, P., Thiele, A. T., Wilkes, D. S., Renukaradhya, G. J., Brutkiewicz, R. R., Travers, J. B., Luker, G. D., Hong, S. C., Blum, J. S. & Chang, C. H. (2007). Vaccinia virus infection induces dendritic cell maturation but inhibits antigen presentation by MHC class II. *Cell Immunol* 246, 92-102.

- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S. & Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5, 730-737.
- Yu, E., Zhai, D., Jin, C., Gerlic, M., Reed, J. C. & Liddington, R. (2011). Structural determinants of caspase-9 inhibition by the vaccinia virus protein, F1L. *J Biol Chem* 286, 30748-30758.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. & Horvitz, H. R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641-652.
- Yuan, J. Y. & Horvitz, H. R. (1990). The *Caenorhabditis elegans* genes *ced-3* and *ced-4* act cell autonomously to cause programmed cell death. *Dev Biol* 138, 33-41.
- Yuwen, H., Cox, J. H., Yewdell, J. W., Bennink, J. R. & Moss, B. (1993). Nuclear localization of a double-stranded RNA-binding protein encoded by the vaccinia virus E3L gene. *Virology* 195, 732-744.
- Zamzami, N., Larochette, N. & Kroemer, G. (2005). Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2, 1478-1480.
- Zermati, Y., Garrido, C., Amsellem, S., Fishelson, S., Bouscary, D., Valensi, F., Varet, B., Solary, E. & Hermine, O. (2001). Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med* 193, 247-254.
- Zhai, D., Yu, E., Jin, C., Welsh, K., Shiau, C. W., Chen, L., Salvesen, G. S., Liddington, R. & Reed, J. C. (2010). Vaccinia virus protein F1L is a caspase-9 inhibitor. *J Biol Chem* 285, 5569-5580.
- Zhang, D. W., Shao, J., Lin, J., Zhang, N., Lu, B. J., Lin, S. C., Dong, M. Q. & Han, J. (2009). RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* 325, 332-336.
- Zhang, W. H., Wilcock, D. & Smith, G. L. (2000). Vaccinia virus F12L protein is required for actin tail formation, normal plaque size, and virulence. *J Virol* 74, 11654-11662.
- Zhang, X., Shi, H., Wu, J., Sun, L., Chen, C. & Chen, Z. J. (2013). Cyclic GMP-AMP containing mixed phosphodiester linkages is an endogenous high-affinity ligand for STING. *Mol Cell* 51, 226-235.
- Zhang, X., Wu, J., Du, F., Xu, H., Sun, L., Chen, Z., Brautigam, C. A. & Chen, Z. J. (2014). The cytosolic DNA sensor cGAS forms an oligomeric complex with DNA and undergoes switch-like conformational changes in the activation loop. *Cell Rep* 6, 421-430.
- Zhao, C., Denison, C., Huibregtse, J. M., Gygi, S. & Krug, R. M. (2005). Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10200-10205.
- Zhong, B., Yang, Y., Li, S., Wang, Y. Y., Li, Y., Diao, F., Lei, C., He, X., Zhang, L., Tien, P. & Shu, H. B. (2008). The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity* 29, 538-550.
- Zhou, Q., Snipas, S., Orth, K., Muzio, M., Dixit, V. M. & Salvesen, G. S. (1997). Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J Biol Chem* 272, 7797-7800.
- Zhou, Z., Hamming, O. J., Ank, N., Paludan, S. R., Nielsen, A. L. & Hartmann, R. (2007). Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases. *J Virol* 81, 7749-7758.

ANNEXE 1.

JGV Papers in Press. Published August 4, 2014 as doi:10.1099/vir.0.068833-0

Analysis of the anti-apoptotic activity of four vaccinia virus proteins demonstrates that

B13 is the most potent inhibitor in isolation and during viral infection

1 Analysis of the anti-apoptotic activity of four vaccinia virus proteins demonstrates that B13 is
2 the most potent inhibitor in isolation and during viral infection

3
4 Running title: comparison of vaccinia virus anti-apoptotic proteins.

5
6 David L. Veyer^{1,3,4}, Carlos Malquer de Motes^{1,2}, Rebecca P. Sumner^{1,2}, Louisa Ludwig¹, Benjamin
7 F. Johnson² and Geoffrey L. Smith^{1,2}

8
9 ¹Department of Pathology, University of Cambridge, CB2 1QP Cambridge, United Kingdom

10 ²Department of Virology, Imperial College London, W2 1PG London, United Kingdom

11 ³Equipe Microbiologie, EA 1254, SFR BIOSIT, Université Européenne de Bretagne, Rennes, France

12 ⁴Virology Laboratory, Pontchaillou University Hospital, Rennes 35033, France

13
14 ⁵Present address: Department of Microbial & Cellular Sciences, University of Surrey, GU2 7XH, UK

15 ⁶Present address: University College London, Medical Research Council Centre for Medical
16 Molecular Virology, Division of Infection and Immunity, University College London, 90 Gower
17 Street, London WC1E 6BT, UK.

18 ⁷Present Address: BioMed Central, 236 Gray's Inn Rd, London WC1X 8HB, UK.

19
20 Corresponding Author: Geoffrey L. Smith, gl337@cam.ac.uk,

21 Telephone: +44 (0) 1223 333692, Fax: +44 (0) 1223 333346

22
23 Journal of General Virology; contents category: large DNA viruses

24 Manuscript details: Summary 242 words; Introduction, Results, Discussion, Materials and Methods
25 and Figure legends 5498 words; Figures 6.

SUMMARY

28 Vaccinia virus (VACV) is a large dsDNA virus encoding about 200 proteins, several of which inhibit
29 apoptosis. Here a comparative study of anti-apoptotic proteins N1, F1, B13 and Golgi anti-apoptotic
30 protein (GAAP) within and outwith virus infection is presented. VACVs strains engineered to lack
31 each gene separately still block apoptosis to some degree because of functional redundancy provided
32 by the other anti-apoptotic proteins. To overcome this redundancy we inserted each gene separately
33 into a VACV strain (vv811) that lacks all these anti-apoptotic proteins and that induces apoptosis
34 efficiently during infection. Each protein was also expressed in cells using lentivirus vectors. In
35 isolation, each VACV protein showed anti-apoptotic activity in response to specific stimuli, as
36 measured by immunoblotting for cleaved PARP-1 and caspase-3 activation. Of the proteins tested,
37 B13 was the most potent inhibitor, blocking both intrinsic and extrinsic stimuli, whilst the activity of
38 the other proteins was largely restricted to inhibition of intrinsic stimuli. In addition, B13 and F1 were
39 effective blockers of apoptosis induced by vv811 infection. Finally, whilst differences in induction of
40 apoptosis were barely detectable during infection with VACV strain WR compared to derivative
41 viruses lacking individual anti-apoptotic genes, several of these proteins reduced activation of caspase
42 3 during infection by vv811 strains expressing these proteins. These results illustrate that vv811 is a
43 useful tool to determine the role of VACV proteins during infection and that whilst all of these
44 proteins have some anti-apoptotic activity, B13 is most potent.

46 INTRODUCTION

47 Cell death is an essential biological process for development, cellular homeostasis and immune
48 regulation and can also restrict virus replication. Cell death occurs most commonly by apoptosis, an
49 irreversible cascade of proteolytic events induced by the extrinsic or intrinsic activation of caspase
50 proteases, particularly caspase 3 (Tait & Green, 2010). Extrinsic, or death receptor-mediated
51 apoptosis, is initiated by Fas-ligand or tumour necrosis factor (TNF), and induces the dimerisation and
52 activation of pro-caspase 8, which activates the effector caspases. Intrinsic, or mitochondrial
53 apoptosis, is triggered by stimuli such as cell-cycle dysregulation, DNA damage or pathogen sensing,
54 and causes mitochondrial outer membrane permeabilisation (MOMP) and cytochrome c release,
55 which, together with the apoptotic protease activating factor 1 (APAF-1) and caspase 9, forms the
56 apoptosome complex (Tait & Green, 2010). A tight regulation preceding MOMP occurs through a
57 complex protein-protein interaction network involving the B-cell lymphoma (Bcl) family of proteins,
58 which contains anti-apoptotic members such as Bcl-2 and Bcl-x_L, and pro-apoptotic members such as
59 Bax and Bak, and the BH3-only proteins Bid, Bad and Bim. The homo-oligomerisation of the former
60 is a pivotal step that triggers MOMP.

61

62 Apoptosis leads to morphological changes to cells and production of immunosuppressive cytokines
63 (Griffith & Ferguson, 2011). In contrast, cell death deriving from caspase 1 activation and interleukin-
64 1 (IL-1 β) production, termed pyroptosis, triggers inflammation. A third form of cell death called
65 necroptosis occurs without caspase activity but via the association of receptor interacting protein
66 (RIP)-1 and RIP-3 (Holler *et al.*, 2000), and is the default route of cell death when the apoptotic signal
67 cannot proceed canonically due to inhibition of caspase activity (Han *et al.*, 2011). All forms of
68 programmed cell death may be induced upon pathogen infection as part of innate immunity, and
69 consequently pathogens have evolved strategies to prevent their activation.

74 2001; Taylor & Barry, 2006). Infection by VACV strain Western Reserve (WR) does not trigger
75 apoptosis in many cultured cells and apoptotic pathways remained blocked (Lee & Esteban, 1994;
76 Dobbelstein & Shenk, 1996; Kettle *et al.*, 1997; Wasilenko *et al.*, 2001). However, VACV strain
77 Copenhagen infection induced apoptosis more readily (Heinkelein *et al.*, 1996). In addition, mice
78 infected with VACV activate necroptotic signalling to control infection in response to viral inhibition
79 of caspase 3 (Cho *et al.*, 2009). This indicates that VACV counteracts apoptosis efficiently during
80 infection both *in vitro* and in animals.

81

82 At least 6 different VACV proteins prevent apoptosis. The first described was B13, the orthologue of
83 cowpox virus cytokine response modifier (Crm)A, and also called serine protease inhibitor (SPI)-2
84 (Kotwal & Moss, 1989; Smith *et al.*, 1989b). B13 and CrmA (Enari *et al.*, 1995; Los *et al.*, 1995;
85 Miura *et al.*, 1995; Tewari & Dixit, 1995) act as a pan-caspase inhibitor and inhibit caspase 8-
86 mediated extrinsic apoptosis and caspase 1-induced inflammasome activation (Dobbelstein & Shenk,
87 1996; Heinkelein *et al.*, 1996; Kettle *et al.*, 1997). A related serpin called SPI-1 encoded by gene
88 *B22R* VACV WR (equivalent to gene *C12L* in VACV strain Copenhagen (Goebel *et al.*, 1990; Smith
89 *et al.*, 1991)) also has anti-apoptotic activity (Ali *et al.*, 1994; Brooks *et al.*, 1995) and is more
90 conserved among different VACV strains (Kettle *et al.*, 1995). Another VACV protein with anti-
91 apoptotic activity in some cell types, including HeLa cells, is the dsRNA-binding protein E3 (Lee &
92 Esteban, 1994; Kibler *et al.*, 1997; Garcia *et al.*, 2002). More recently, the structures of VACV
93 proteins F1 (Kvansakul *et al.*, 2008) and N1 (Aoyagi *et al.*, 2007; Cooray *et al.*, 2007) were solved
94 and revealed a Bcl-2 fold containing a surface groove similar to cellular anti-apoptotic Bcl-2 proteins.
95 Protein F1 binds Bak and blocks mitochondrial apoptosis (Wasilenko *et al.*, 2003; Wasilenko *et al.*,
96 2005; Postigo *et al.*, 2006; Kvansakul *et al.*, 2008) whereas N1 binds the upstream BH3-only proteins
97 Bad and Bid and also has some anti-apoptotic activity (Cooray *et al.*, 2007; Maluquer de Motes *et al.*,
98 2011). Both F1 and N1 also have other functions. F1 binds the nucleotide-binding domain, leucine-
99 rich repeat and pyrin domain containing protein (NLRP) 1 reducing inflammasome activation and
100 pyroptosis (Gerlic *et al.*, 2013). N1 inhibits activation of nuclear factor κ B (NF- κ B) (DiPerna *et al.*,
101 2004; Cooray *et al.*, 2007; Maluquer de Motes *et al.*, 2011) and IRF-3 (DiPerna *et al.*, 2004; Dai *et*

102 *et al.*, 2014). Structure based mutagenesis of N1 showed that the surface groove was important for Bcl-2
103 and Bcl-XL binding and for inhibition of apoptosis, whereas the interface of the N1 homodimer (Bartlett
104 *et al.*, 2002) is important for NF- κ B inhibition (Maluquer de Motes *et al.*, 2011). Others reported N1
105 did not block apoptosis (Banadyga *et al.*, 2009; Postigo & Way, 2012). Lastly, a few VACV strains,
106 and camelpox virus (Gubser & Smith, 2002), encode a Golgi anti-apoptotic protein (vGAAP) that
107 protect cells from apoptosis and has a highly conserved human orthologue (hGAAP) with anti-
108 apoptotic activity (Gubser *et al.*, 2007). vGAAP and hGAAP are members of the transmembrane Bax
109 inhibitor-containing motif (TBMIM) family and are hydrophobic proteins with 6 transmembrane
110 domains (Carrara *et al.*, 2012) that oligomerise (Saraiva *et al.*, 2013b), alter the calcium storage in
111 intracellular organelles (de Mattia *et al.*, 2009) and affect cell adhesion and migration (Saraiva *et al.*,
112 2013a).
113
114 Identification of additional VACV anti-apoptotic proteins by knocking out candidate genes from
115 VACV strains such as WR is difficult because the effects are masked by the other anti-apoptotic
116 proteins. An alternative approach is ectopic expression of proteins outwith viral infection and addition
117 of pro-apoptotic stimuli to trigger cell death. However, whether these conditions mimic those in
118 which viral proteins have evolved is unlikely. VACV strain vv811 lacks 55 genes from the parental
119 strain Copenhagen, has a small plaque phenotype and replicates poorly in cell culture (Perkus *et al.*,
120 1991). Genes missing include *B13R*, *FIL* and *NIL*, as well as *vGAAP* (which is not present in
121 Copenhagen) and consequently vv811 is unable to protect cells from apoptosis induced by pro-
122 apoptotic stimulus (Wasilenko *et al.*, 2003). Here the potency of 4 different VACV anti-apoptotic
123 proteins in isolation and in the context of viral infection is assessed using recombinant vv811 viruses
124 expressing B13, F1, N1 and vGAAP. Apoptosis was induced using extrinsic and intrinsic stimuli, and
125 also by vv811 infection that alone caused caspase 3 activation. Results show that although all proteins
126 prevented apoptosis to some extent in different environments, B13 provided the greatest protection
127 both in isolation and during viral infection.

128 129 RESULTS

130 **Generation of U2-OS cells constitutively expressing VACV anti-apoptotic proteins**
131 To study the anti-apoptotic capacity of individual VACV proteins, bi-cistronic lentivirus vectors were
132 used to generate polyclonal U2-OS cell lines expressing GFP and FLAG-tagged B13, F1, GAAP and
133 N1 (Methods). An empty vector (EV) cell line expressing GFP only and a cell line expressing Bcl-XL
134 were also generated as controls. Expression of B13, GAAP, F1 and Bcl-XL was verified by FLAG
135 immunoblotting (IB) (Fig. 1a). Given its previously described degradation by the proteasome when
136 expressed in isolation (Postigo *et al.*, 2006), F1 was only detected after pharmacological inhibition of
137 the proteasome with MG132 (Fig. 1b). Analysis of these cells by immunofluorescence (IF) using an
138 anti-FLAG antibody demonstrated the expression and cellular localisation of these proteins (Fig. 1c).
139 The location of each protein was as described previously, except that N1 showed a greater nuclear
140 localisation than noted earlier (Bartlett *et al.*, 2002; Maluquer de Motes *et al.*, 2011), possibly due to
141 higher expression.
142
143 **Inhibition of extrinsic apoptosis in U2-OS cells expressing VACV anti-apoptotic proteins**
144 To assess anti-apoptotic activity, extrinsic apoptosis was induced using cycloheximide (CHX) and
145 TNF- α . This induced cell death in EV-transduced cells, as seen by morphological changes and fewer
146 adherent cells remaining, and this was prevented in cells expressing B13 or Bcl-XL (Fig. 2a and S1).
147 Immunoblotting for cleaved PARP-1 confirmed induction of apoptosis in cells expressing F1, N1 and
148 vGAAP, and its inhibition by B13 or Bcl-XL (Fig. 2b upper) and this was quantified in 3 independent
149 experiments (Methods) (Fig. 2b lower). A second analysis was obtained using the quantitative
150 Caspase-Glo® 3/7 assay. TNF- α treatment caused an ~8-fold increase in caspase 3 activity in EV-
151 transduced cells and this was reduced significantly only in cells expressing B13 and Bcl-XL (Fig. 2c).
152 These results indicated that out of these 4 VACV proteins only B13 blocked TNF- α -induced apoptosis
153 in U2-OS cells, consistent with its inhibition of caspase 8 cleavage.

154 155 Inhibition of intrinsic apoptosis in U2-OS cells expressing VACV anti-apoptotic proteins

156 Next, the resistance of these cell lines to intrinsic apoptosis induced by staurosporine (STS) was
157 investigated. This showed that B13 caused substantial reduction in cleavage of PARP-1 compared to

EV-transduced cells, whereas cells expressing vGAAP and NI showed a milder effect (Fig. 3a). Quantitative analysis demonstrated significant reduction by all these VACV proteins except F1 (Fig. 3a). Using the Caspase-Glo® 3/7 assay, STS treatment induced ~5-fold increase in caspase 3/7 activity in EV-transduced cells and this was reduced by each VACV protein, particularly B13 (Fig. 3b). Likewise, a ~5-fold increase in active caspase 3 was observed in EV-transduced cell lines upon treatment with doxorubicin, a DNA damaging agent causing mitochondrial apoptosis, and this was reduced to different degrees by B13, F1, NI or vGAAP (Fig. 3c). Taken together, each VACV anti-apoptotic protein was sufficient to reduce or inhibit drug-induced intrinsic apoptosis in U2-OS cells.

Induction of apoptosis using vv811

VACV strain vv811 lacks 55 genes, including all known VACV anti-apoptotic proteins except E3 (Fig. 4a), and so we hypothesised that vv811 infection might trigger apoptosis without additional stimuli. To examine this, the level of caspase 3/7 activation in U2-OS cells infected with vv811 or VACV WR was measured. vv811 infection induced caspase 3/7 activation from 2 h p.i., and this increased over 24 h (Fig. 4b), whereas apoptosis was not induced by VACV strains WR (Fig. 4b) or Copenhagen (COP) (data not shown). The use of vv811 as an inducer of apoptosis provided a more physiological context to assess apoptosis without the need for exogenous drug treatments.

Next, the ability of the individual VACV anti-apoptotic proteins to inhibit apoptosis induced by vv811 and to enhance the poor growth of vv811 was examined. First, U2-OS cell lines expressing VACV proteins were infected for 24 h and the levels of apoptosis was assessed by measuring caspase 3/7 activity using Caspase-Glo® (Fig. 4c). F1 and B13 reduced vv811-induced apoptosis, whereas vGAAP and NI did not. Secondly, we performed multi-step growth curves of vv811 in the different U2-OS cell lines. Expression *in trans* of VACV anti-apoptotic proteins did not enhance viral growth (Fig. 4d). Taken together, these data indicate growth of vv811 was not enhanced in U2-OS cell lines expressing VACV proteins irrespective of their ability to prevent vv811-induced apoptosis.

Generation of recombinant vv811 expressing VACV anti-apoptotic proteins

To address whether expression of VACV anti-apoptotic proteins *in cis* could provide stronger effects, we generated recombinant vv811 expressing B13, F1, NI or vGAAP. To allow us to compare the efficiency of each protein independently of their expression level, each gene was cloned downstream of the VACV early / late promoter P7.5 (Mackett *et al.*, 1984) and inserted by transient dominant selection into vv811 within non-essential genes encoding either the ribonucleotide reductase large subunit (gene *l4L*) (Tengelsen *et al.*, 1988) or the thymidylate kinase (gene *448R*) (Smith *et al.*, 1989a) as described in Methods. The genomes of the derivative vv811 viruses were shown by PCR using primers annealed to the flanking regions to contain the inserted genes as expected (Fig. 5a). Expression of the inserted genes was confirmed by immunoblotting with specific antibody for B13 (Fig. 5b), F1 (Fig. 5c) and NI (Fig. 5d), and by IF for GAAP (Fig. 5e). For B13, F1 and NI expression was detected as early as 2-4 h post-infection in agreement with the expression from the 7.5K promoter (Mackett *et al.*, 1984), and was not detected in the vv811 parental strain. Equal infection of cells was confirmed by blotting for the VACV early protein A49 (Mansur *et al.*, 2013). The localisation of vGAAP in the Golgi was shown by co-staining with GM130, a marker of the Golgi complex (Fig. 5e). The recombinant viruses were characterised further by measuring plaque sizes in U2-OS cells after 96 h of infection (Fig. 5f) and by assessing viral replication in U2-OS cells infected for 24 h at 2.5 p.f.u. per cell (Fig. 5g). No statistically significant differences amongst the four recombinant viruses and between these and the parental vv811 were observed in either of the assays. Taken together, these data indicated that the expression of these proteins *in cis* did not enhance viral replication or spread in the conditions tested.

Induction of apoptosis by the recombinant vv811 viruses

The ability of these anti-apoptotic proteins to inhibit apoptosis during VACV infection was investigated using either VACV strains that lack each gene individually, or vv811 viruses engineered to express each gene individually. Viruses lacking *B13R* (Kettle *et al.*, 1995) and *NI/L* (Bartlett *et al.*, 2002) from the WR strain had been constructed previously, whereas a virus lacking *vGAAP* was engineered in the Evans strain, one of the few VACV strains to express GAAP (Gubser *et al.*, 2007), and a *F1/L* deletion virus was produced in the same WR strain background as we had used previously

(see Methods). Deletion of the *FIL* gene from WR was confirmed by PCR using primers that annealed to the flanking regions of *FIL* and by immunoblotting with anti-F1 antiserum (Fig. S2).

To determine the role of VACV anti-apoptotic proteins in both WT VACV strains and vv811, U2-OS cells were infected at 2.5 p.f.u. per cell and the cell viability was measured using the Cell Titer-Blue® assay at 24 h p.i.. Infection with vv811 reduced viability by 50% and this was ameliorated by infection with vv811-B13, vv811-F1 and vv811-vGAAP, but not vv811-N1 (Fig. 6a). Similar results were obtained in HeLa cells where viability after vv811 infection reached only 25% and could only be increased by B13, F1 or vGAAP expression (Fig. 6b).

Next, caspase activity was measured. U2-OS cells were infected for 24 h with parental WR and its individual deletion derivatives WRΔB13, WRΔF1 and WRΔN1, with parental Evans and its derivative EvansΔvGAAP, and with the recombinant vv811 viruses (Fig. 6c). The level of infection was confirmed by immunoblotting for VACV protein D8. As expected neither VACV strain WR nor Evans induced apoptosis in this system. With the exception of WRΔB13, which induced significantly more caspase 3/7 activation than WR, deletion of each individual protein in each parental VACV strain did not change the level of caspase activity, presumably due to the presence of the other anti-apoptotic proteins. Conversely, after vv811 infection the anti-apoptotic effects of B13, F1 and vGAAP were readily detectable, with each virus inducing significantly less apoptosis than parental vv811. As observed in assays where the proteins were expressed *in trans*, B13 was the most potent inhibitor. vv811-N1 did not, however, show any ability to block viral induction of caspase activation during infection. Furthermore, caspase activation after vv811 infection was also measured in HeLa cells (Fig. 6d), a cell line commonly used for apoptosis studies. Results were similar to those in U2-OS cells with the exception of vv811-vGAAP, which did not show any protection in this cell type. Collectively, these data showed that inserting anti-apoptotic proteins individually in vv811 provides a powerful tool to assess their potency and relative contribution to preventing apoptosis in the context of viral infection, and that this system can be used in multiple cell types.

DISCUSSION

The ability of cells to undergo apoptosis is an important host anti-viral mechanism that limits the replication and spread of many viruses and, consequently, viruses have evolved countermeasures. VACV encodes several anti-apoptotic proteins (Introduction), but their anti-apoptotic activity has not been compared in the same experimental system and not in a context where apoptosis is induced by viral infection alone. In this study, we show that infection by VACV strain vv811, which unlike wild type VACV strains lacks B13, B22, F1, N1 and vGAAP proteins, induces apoptosis in cells without additional stimuli and so can be used to study the inhibitory activity of individual anti-apoptotic proteins in the context of viral infection. Of the four anti-apoptotic proteins studied (B13, F1, N1 and vGAAP), B13 was found to be the most potent inhibitor.

When expressed in isolation, all four proteins were able to block apoptosis mediated by STS or doxorubicin to some degree, whereas only B13 blocked apoptosis mediated by TNF-α (Figs. 2 and 3). This is consistent with F1 and N1 targeting cellular Bcl-2 proteins involved in mitochondrial apoptotic pathways (Wasilenko *et al.*, 2003; Wasilenko *et al.*, 2005; Postigo *et al.*, 2006; Cooray *et al.*, 2007; Kvanakul *et al.*, 2008; Maluquer de Motes *et al.*, 2011), B13 being a pan-inhibitor of caspases (Ray *et al.*, 1992; Döbelstein & Shenk, 1996; Kettle *et al.*, 1997; García-Calvo *et al.*, 1998), and vGAAP inhibiting intrinsic apoptosis (Gubser *et al.*, 2007). Although vGAAP was reported to have some activity against extrinsic apoptosis (Gubser *et al.*, 2007), under the conditions tested here, such activity was not found and this discrepancy might, in part, be explained by the efficiency of the method used to deliver vGAAP into cells, which differed in these studies.

Since vv811 infection is sufficient to induce apoptosis the ability of the VACV proteins to block this was tested by infecting cell lines expressing these proteins and by constructing recombinant vv811 viruses expressing these proteins. After vv811 infection of the transduced cell lines, only B13 and F1 showed an anti-apoptotic effect (Fig. 4), indicating that B13 and F1 are more potent inhibitors than vGAAP and N1 in this experimental system, and/or that vv811 infection triggered apoptotic responses in a manner that was not mimicked by the drugs employed in Fig. 3. Use of the recombinant vv811

viruses demonstrated that B13 and F1 had greatest anti-apoptotic activity in both U2-OS and HeLa cells, highlighting their more potent inhibitory effects compared to vGAAP and N1 (Fig. 6). Interestingly, infection of U2-OS cells with vv811-GAAP increased cell viability like vv811-B13 or vv811-F1, despite being unable to reduce caspase 3/7 activation like those viruses. Notably, in HeLa cells viability data was recapitulated despite no reduction of caspase 3/7 activity. In fact, vv811-GAAP conferred a viability phenotype similar to vv811-F1 in U2-OS and similar to vv811-B13 in HeLa cells despite intermediate or null inhibition of caspase activity. This was confirmed by a very weak cytopathogenic effect after infection compared to other vv811 viruses (data not shown). Taken together, these data suggest that vGAAP may contribute to cell viability by multiple mechanisms besides inhibition of caspase activity, and this may be more prominent in specific cell types. Indeed the very closely related human GAAP has also been linked to cell adhesion and migration (Saraiva *et al.*, 2013a). In contrast, B13 proved to be the most potent anti-apoptotic protein in all the conditions tested. However, despite this drastic inhibition of apoptosis, vv811-B13 infection only increased cell viability mildly. Taken together this indicates that caspase 3/7 inhibition is not sufficient to determine cell viability during infection and other factors are required.

Although the anti-apoptotic effect of N1 was observed in isolation upon drug treatment (Fig. 3), this was not mirrored in the context of viral infection (Fig. 6). N1 is a Bcl-2-like protein that in addition to modulating apoptosis, inhibits activation of the pro-inflammatory transcription factor NF- κ B (DiPerna *et al.*, 2004; Cooray *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Graham *et al.*, 2008; Maluquer de Motes *et al.*, 2011). Recently, a structurally-informed mutagenesis study demonstrated that it is the anti-NF- κ B activity of N1 and not its anti-apoptotic ability that contributes to virulence *in vivo* (Maluquer de Motes *et al.*, 2011). Therefore, although N1 has a relatively weak anti-apoptotic activity, its main function following infection is the inhibition of inflammatory signalling. Interestingly, a similar situation exists for F1 that contributes to virulence by targeting NLRP1 and thereby blocking inflammasome activation (Gerlic *et al.*, 2013). Although F1 has greater anti-apoptotic activity than N1, in both cases virulence is driven by inhibition of innate immune signalling rather than apoptosis.

VACV is a large virus that alters the cellular environment by multiple mechanisms. Here we demonstrate that unlike its parental full-length strain COP, infection with vv811 causes caspase 3/7 activation in cells. Thus, VACV infection induces apoptosis and this is prevented by anti-apoptotic proteins. Exactly how VACV infection is sensed to trigger apoptosis requires clarification. VACV strain COP lacks vGAAP (Goebel *et al.*, 1990; Gubser & Smith, 2002) and has a non-functional *B13R* gene (Kettle *et al.*, 1995), indicating that these genes are non-essential for blocking apoptosis during COP infection. In contrast, proteins F1 and N1 are highly conserved amongst VACV strains and other orthopoxviruses and each interfere with mitochondrial apoptosis, suggesting that this apoptotic route may be prominent during viral infection. Data presented here show, however, that only B13 reduced caspase 3/7 activation during vv811 infection to levels observed with strains WR or COP. Given that the anti-apoptotic activity of N1 and F1 do not contribute to virulence, it is likely that caspase activation occurs *in vivo* primarily via non-mitochondrial pathways including Fas-ligand or TNF signalling and this is blocked by B13. Although a few VACV strains express soluble TNF receptors (Alcami *et al.*, 1999), intracellular inhibitors of such extrinsic apoptosis other than B13 have not been described in VACV, but are present in other large DNA viruses such as human cytomegalovirus (Skalaskaya *et al.*, 2001).

In summary, this study shows that vv811 infection induces apoptosis and so is a useful tool to identify the cellular factors that trigger recognition and apoptosis upon VACV infection. Such information will be useful in understanding VACV-host interactions, but also for developing VACV as vaccine vector and oncolytic agent.

METHODS

Plasmids cells and viruses

Genes *F1L* and *B13R* were amplified by PCR from VACV strain WR and cloned into pcDNA4/TO fused with an N-terminal tandem affinity purification (TAP) tag consisting of a streptavidin-binding sequence and FLAG epitope (Gloeckner *et al.*, 2007). vGAAP was amplified by PCR from VACV

strain Evans and cloned as C-terminal TAP fusion. NI-TAP was described (Maluquer de Motes *et al.*, 2011). All plasmids were verified by DNA sequencing. Finally, tagged alleles, as well as Bcl-X_L, were subcloned into the first cistron of a lentivirus vector also expressing GFP (Saraiva *et al.*, 2013b).

BSC-1 and U2-OS cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10 % foetal bovine serum (FBS; Biosera), 100 U mL⁻¹ penicillin (Invitrogen) and 100 mg mL⁻¹ streptomycin (Invitrogen). HeLa cells were grown in minimum essential medium (Gibco) supplemented as above plus non-essential amino acids (Sigma). U2-OS cells expressing proteins B13, F1, GAAP, N1, or Bcl-X_L, or empty vector (EV) control were obtained after transduction with lentiviruses expressing GFP and the protein of interest, and sorting in a MoFlo MLS high-speed cell sorter (Beckman Coulter) to obtain >95 % GFP-positive cells. Lentivirus particles were generated after transient transfection of HEK 293T cells with the bicistronic genomic vector together with entry and packaging vectors using the calcium chloride method. Parental vv811 was provided by Michelle Barry (University of Alberta, Canada). VACV WR lacking either *B13R* or *N1L* and VACV Evans lacking GAAP have been described (Kettle *et al.*, 1995; Bartlett *et al.*, 2002; Gubser *et al.*, 2007).

Construction of mutant viruses

For the construction of vv811-B13, vv811-F1 and vv811-N1, plasmids containing the *B13R*, *F1L* or *N1L* gene flanked by approximately 250-bp regions of gene *A48R* encoding thymidylate kinase (Smith *et al.*, 1989a; Hughes *et al.*, 1991) and containing the *E. coli* guanylylphosphoribosyl transferase (*Ecogpt*) gene fused in-frame with the *enhanced green fluorescent protein (EGFP)* gene were used (Ember *et al.*, 2012). For the construction of vv811-GAAP, a similar plasmid was used containing the *GAAP* gene inserted between the flanking regions of gene *I4L* encoding the ribonucleotide reductase large subunit (Tengelsen *et al.*, 1988). VACV WR lacking gene *F1L* (WRΔF1) was constructed using a similar plasmid containing the 250 bp flanking region of gene *F1L*. The mutant viruses were constructed using the transient dominant selection method (Falkner & Moss, 1990) by selection of EGFP-positive plaques in the presence of mycophenolic acid, hypoxanthine, and xanthine, as described previously (Unterholzner *et al.*, 2011). The genotype of the resolved viruses was analysed

by PCR following proteinase K treatment of infected BSC-1 cells using primers that annealed within the flanking regions of each gene.

Immunofluorescence

Transduced U2-OS cells were seeded into 6-well plates containing sterile glass coverslips. After 2 washes with ice-cold PBS, cells were fixed in 4 % (v/v) paraformaldehyde, quenched in 150 mM ammonium chloride, permeabilized with 0.1 % (v/v) Triton X-100 in PBS and blocked for 30 min in 5 % (w/v) FBS in PBS. The cells were stained with rabbit anti-flag antibody (Sigma) for 1 h, followed by incubation with goat anti-rabbit Alexa Fluor 546 secondary antibody (Invitrogen). Coverslips were mounted in MOWIOL 4-88 (Calbiochem) containing DAPI. Images were taken on a Zeiss LSM780 confocal microscope using Zen2011 acquisition software. Following vv811-GAAP infection, U2-OS cells were stained using rabbit anti-GAAP polyclonal antiserum (Gubser *et al.*, 2007) and mouse anti-GM130 antibody (BD Biosciences) to check GAAP expression and localisation.

Plaque assays and growth curves

U2-OS cells were infected with vv811 and derivative viruses at 50 p.f.u. per well of a 6-well plate for 5 days. The cells were washed once with PBS and stained for 1 h with crystal violet (5% (v/v) crystal violet solution (Sigma), 25% (v/v) ethanol). The sizes of 20 plaques per well were measured using Axiovision acquisition software and a Zeiss AxioVert.A1 inverted microscope as described (Doceul *et al.*, 2010; Ferguson *et al.*, 2013). To measure virus growth, U2-OS cell lines were infected with vv811 at 0.1 p.f.u. per cell and samples harvested at 0, 24 and 48 h. U2-OS cells were infected with recombinant viruses at 2.5 p.f.u. per cell for 24 h. Virus titres were determined as described (Chen *et al.*, 2006) but using U2-OS cells.

Apoptosis and viability assay

Apoptosis was induced with staurosporine (0.5 μ M, 8 h), doxorubicin (3 μ M, 30 h) or human TNF- α (10 μ g mL⁻¹, Peptrotech) together with cycloheximide (30 μ g mL⁻¹) for 16 h. Virus induced apoptosis was analysed after infection with 2.5 p.f.u. per cell for 24 h. Cleaved PARP-1 was analysed by immunoblotting from 6-well plates. Caspase 3 activity was measured in 96-well plates using Caspase-Glo® 3/7 (Promega). Cell viability was measured in 96-well plates using Celltiter-Blue® (Promega) according to manufacturer recommendations.

SDS-PAGE and immunoblotting

Cells were lysed with ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 100 mM NaCl, 1% CHAPS (w/v) and protease inhibitor [Roche]). The samples were resolved by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Primary antibodies were mouse anti- α -tubulin (Upstate Biotech), mouse anti-FLAG (Sigma) and mouse anti-PARP-1 (Cell Signalling). Antibody against VACV proteins D8 (Parkinson and Smith, 1991), A49 (Mansur et al., 2013), B13 (Kettle et al., 1995), F1 (Postigo et al., 2006), N1 (Bartlett et al., 2002) were described. Primary antibodies were detected using IRDye-conjugated secondary antibodies and an Odyssey Infrared Imager (LI-COR Biosciences). Quantitative analysis was obtained by integration of the band intensity using Odyssey software.

Statistical analysis

Data were analysed using an un-paired Student's *t*-test, with Welch's correction where appropriate.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Michael Way, Antonio Postigo, Michelle Barry and Heike Laman for providing reagents and Nigel Miller for assistance with cell sorting. This work was supported by grants from the Medical Research Council and the Wellcome Trust. G. L. S. is a Wellcome Trust Principal Research Fellow.

REFERENCES

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

Ali, A. N., Turner, P. C., Brooks, M. A. & Moyer, R. W. (1994). The SPI-1 gene of rabbitpox virus determines host range and is required for hemorrhagic pox formation. *Virology* 202, 305-314.

Aoyagi, M., Zhai, D., Jin, C., Aleshin, A. E., Stec, B., Reed, J. C. & Liddington, R. C. (2007). Vaccinia virus N1L protein resembles a B cell lymphoma-2 (Bcl-2) family protein. *Protein Sci* 16, 118-124.

Banadaga, L., Veugeler, K., Campbell, S. & Barry, M. (2009). The fowlpox virus BCL-2 homologue, FPV039, interacts with activated Bax and a discrete subset of BH3-only proteins to inhibit apoptosis. *J Virol* 83, 7085-7098.

Bartlett, N., Symons, J. A., Tschärke, D. C. & Smith, G. L. (2002). The vaccinia virus N1L protein is an intracellular homodimer that promotes virulence. *J Gen Virol* 83, 1965-1976.

Brooks, M. A., Ali, A. N., Turner, P. C. & Moyer, R. W. (1995). A rabbitpox virus serpin gene controls host range by inhibiting apoptosis in restrictive cells. *J Virol* 69, 7688-7698.

Carrara, G., Saraiva, N., Gubser, C., Johnson, B. F. & Smith, G. L. (2012). Six-transmembrane topology for Golgi anti-apoptotic protein (GAAP) and Bax inhibitor 1 (BI-1) provides model for the transmembrane Bax inhibitor-containing motif (TMBIM) family. *J Biol Chem* 287, 15896-15905.

Chen, R. A., Jacobs, N. & Smith, G. L. (2006). Vaccinia virus strain Western Reserve protein B14 is an intracellular virulence factor. *J Gen Virol* 87, 1451-1458.

Chen, R. A., Ryzhakov, G., Cooray, S., Randow, F. & Smith, G. L. (2008). Inhibition of IkkappaB kinase by vaccinia virus virulence factor B14. *PLoS pathogens* 4, e22.

Cho, Y. S., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, T. D., Guildford, M. & Chan, F. K. (2009). Phosphorylation-driven assembly of the R1P1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* 137, 1112-1123.

Cooray, S., Bahar, M. W., Abrescia, N. G., McVey, C. E., Bartlett, N. W., Chen, R. A., Stuart, D. I., Grimes, J. M. & Smith, G. L. (2007). Functional and structural studies of the vaccinia virus virulence factor N1 reveal a Bcl-2-like anti-apoptotic protein. *J Gen Virol* 88, 1656-1666.

Dai, P., Wang, W., Cao, H., Avogadri, F., Dai, L., Drexler, I., Joyce, J. A., Li, X. D., Chen, Z., Merghoub, T., Shuman, S. & Deng, L. (2014). Modified vaccinia virus Ankara triggers type I IFN production in murine conventional dendritic cells via a cGAS/STING-mediated cytosolic DNA-sensing pathway. *PLoS pathogens* 10, e1003989.

de Mattia, F., Gubser, C., van Dommelen, M. M., Visch, H. J., Distelmaier, F., Postigo, A., Luyten, T., Parys, J. B., de Smedt, H., Smith, G. L., Willems, P. H. & van Kuppeveld, F. J. (2009). Human Golgi antiapoptotic protein modulates intracellular calcium fluxes. *Mol Biol Cell* 20, 3638-3645.

DiPerna, G., Stack, J., Bowie, A. G., Boyd, A., Kotwal, G., Zhang, Z., Arvikar, S., Latz, E., Fitzgerald, K. A. & Marshall, W. L. (2004). Poxvirus protein N1L targets the I-kappaB kinase complex, inhibits signaling to NF-kappaB by the tumor necrosis factor superfamily of receptors, and inhibits NF-kappaB and IRF3 signaling by toll-like receptors. *J Biol Chem* 279, 36570-36578.

Dobbelstein, M. & Shenk, T. (1996). Protection against apoptosis by the vaccinia virus SPI-2 (B13R) gene product. *J Virol* 70, 6479-6485.

Doceul, V., Hollinshead, M., van der Linden, L. & Smith, G. L. (2010). Repulsion of superinfecting virions: a mechanism for rapid virus spread. *Science* 327, 873-876.

Ember, S. W., Ren, H., Ferguson, B. J. & Smith, G. L. (2012). Vaccinia virus protein C4 inhibits NF-kappaB activation and promotes virus virulence. *J Gen Virol* 93, 2098-2108.

Enari, M., Hug, H. & Nagata, S. (1995). Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature* 375, 78-81.

Falkner, F. G. & Moss, B. (1990). Transient dominant selection of recombinant vaccinia viruses. *J Virol* 64, 3108-3111.

Kvansakul, M., Yang, H., Fairlie, W. D., Czabotar, P. E., Fischer, S. F., Perugini, M. A., Huang, D. C. & Colman, P. M. (2008). Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell Death Differ* 15, 1564-1571.

Lee, S. B. & Esteban, M. (1994). The interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase induces apoptosis. *Virology* 199, 491-496.

Los, M., Van de Craen, M., Penning, L. C., Schenk, H., Westendorp, M., Baeuerle, P. A., Droge, W., Krammer, P. H., Fiers, W. & Schulze-Osthoff, K. (1995). Requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/APO-1-mediated apoptosis. *Nature* 375, 81-83.

Mackett, M., Smith, G. L. & Moss, B. (1984). General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes. *J Virol* 49, 857-864.

Maluquer de Motes, C., Cooray, S., Ren, H., Almeida, G. M. F., McGourty, K., Bahar, M. W., Stuart, D. I., Grimes, J. M., Graham, S. C. & Smith, G. L. (2011). Inhibition of apoptosis and NF- κ B activation by vaccinia protein M1 occur via distinct binding surfaces and make different contributions to virulence. *PLoS pathogens* 7, e1002430.

Mansur, D. S., Maluquer de Motes, C., Unterholzner, L., Sumner, R. P., Ferguson, B. J., Ren, H., Strnadova, P., Bowie, A. G. & Smith, G. L. (2013). Poxvirus targeting of E3 ligase beta-TrCP by molecular mimicry: a mechanism to inhibit NF-kappaB activation and promote immune evasion and virulence. *PLoS pathogens* 9, e1003183.

Miura, M., Friedlander, R. M. & Yuan, J. (1995). Tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by a CrmA-sensitive cell death pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8318-8322.

Perkus, M. E., Goebel, S. J., Davis, S. W., Johnson, G. P., Norton, E. K. & Paoletti, E. (1991). Deletion of 55 open reading frames from the termini of vaccinia virus. *Virology* 180, 406-410.

Postigo, A., Cross, J. R., Downward, J. & Way, M. (2006). Interaction of F1L with the BH3 domain of Bak is responsible for inhibiting vaccinia-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 13, 1651-1662.

Postigo, A. & Way, M. (2012). The vaccinia virus-encoded Bcl-2 homologues do not act as direct Bax inhibitors. *J Virol* 86, 203-213.

Ray, C. A., Black, R. A., Kronheim, S. R., Greenstreet, T. A., Sleath, P. R., Salvesen, G. S. & Pickup, D. J. (1992). Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* 69, 597-604.

Saraiva, N., Prole, D. L., Carrara, G., Johnson, B. F., Taylor, C. W., Parsons, M. & Smith, G. L. (2013a). hGAAP promotes cell adhesion and migration via the stimulation of store-operated Ca²⁺ entry and calpain 2. *J Cell Biol* 202, 699-713.

Saraiva, N., Prole, D. L., Carrara, G., Maluquer de Motes, C., Johnson, B. F., Byrne, B., Taylor, C. W. & Smith, G. L. (2013b). Human and viral Golgi anti-apoptotic proteins (GAAPs) oligomerize via different mechanisms and monomeric GAAP inhibits apoptosis and modulates calcium. *J Biol Chem* 288, 13057-13067.

Shisler, J. L. & Moss, B. (2001). Immunology 102 at poxvirus U: avoiding apoptosis. *Semin Immunol* 13, 67-72.

Skaletskaya, A., Bartle, L. M., Chittenden, T., McCormick, A. L., Mocarski, E. S. & Goldmacher, V. S. (2001). A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7829-7834.

Smith, G. L., Benfield, C. T., Maluquer de Motes, C., Mazzon, M., Ember, S. W., Ferguson, B. J. & Sumner, R. P. (2013). Vaccinia virus immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity. *J Gen Virol* 94, 2367-2392.

Smith, G. L., Chan, Y. S. & Howard, S. T. (1991). Nucleotide sequence of 42 kbp of vaccinia virus strain WR from near the right inverted terminal repeat. *J Gen Virol* 72, 1349-1376.

Smith, G. L., de Carlos, A. & Chan, Y. S. (1989a). Vaccinia virus encodes a thymidylate kinase gene: sequence and transcriptional mapping. *Nucleic Acids Res* 17, 7581-7590.

Smith, G. L., Howard, S. T. & Chan, Y. S. (1989b). Vaccinia virus encodes a family of genes with homology to serine proteinase inhibitors. *J Gen Virol* 70, 2333-2343.

Ferguson, B. J., Benfield, C. T., Ren, H., Lee, V. H., Frazer, G. L., Strnadova, P., Sumner, R. P. & Smith, G. L. (2013). Vaccinia virus protein N2 is a nuclear IRE3 inhibitor that promotes virulence. *J Gen Virol* 94, 2070-2081.

Garcia-Calvo, M., Peterson, E. P., Leiting, B., Ruel, R., Nicholson, D. W. & Thornberry, N. A. (1998). Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem* 273, 32608-32613.

Garcia, M. A., Guerra, S., Gil, J., Jimenez, V. & Esteban, M. (2002). Anti-apoptotic and oncogenic properties of the dsRNA-binding protein of vaccinia virus, E3L. *Oncogene* 21, 8379-8387.

Gerlic, M., Faustini, B., Postigo, A., Yu, E. C., Proell, M., Gombosuren, N., Krajewska, M., Flynn, R., Croft, M., Way, M., Satterthwait, A., Liddington, R. C., Salek-Ardakani, S., Matsuzawa, S. & Reed, J. C. (2013). Vaccinia virus F1L protein promotes virulence by inhibiting inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 7808-7813.

Gloeckner, C. J., Boldt, K., Schumacher, A., Roepman, R. & Ueffing, M. (2007). A novel tandem affinity purification strategy for the efficient isolation and characterisation of native protein complexes. *Proteomics* 7, 4228-4234.

Goebel, S. J., Johnson, G. P., Perkus, M. E., Davis, S. W., Winslow, J. P. & Paoletti, E. (1990). The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology* 179, 247-266, 517-263.

Graham, S. C., Bahar, M. W., Cooray, S., Chen, R. A., Whalen, D. M., Abrescia, N. G., Alderton, D., Owens, R. J., Stuart, D. I., Smith, G. L. & Grimes, J. M. (2008). Vaccinia virus proteins A52 and B14 share a Bcl-2-like fold but have evolved to inhibit NF-kappaB rather than apoptosis. *PLoS pathogens* 4, e1000128.

Griffith, T. S. & Ferguson, T. A. (2011). Cell death in the maintenance and abrogation of tolerance: the five Ws of dying cells. *Immunity* 35, 456-466.

Gubser, C., Bergamaschi, D., Hollinshead, M., Lu, X., van Kuppeveld, F. J. & Smith, G. L. (2007). A new inhibitor of apoptosis from vaccinia virus and eukaryotes. *PLoS pathogens* 3, e17.

Gubser, C., Hue, S., Kellam, P. & Smith, G. L. (2004). Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J Gen Virol* 85, 105-117.

Gubser, C. & Smith, G. L. (2002). The sequence of camelpox virus shows it is most closely related to variola virus, the cause of smallpox. *J Gen Virol* 83, 855-872.

Han, J., Zhong, C. Q. & Zhang, D. W. (2011). Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. *Nat Immunol* 12, 1143-1149.

Heinkelein, M., Pliz, S. & Jassoy, C. (1996). Inhibition of CD95 (Fas/Apo1)-mediated apoptosis by vaccinia virus WR. *Clin Exp Immunol* 103, 8-14.

Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J. L., Schneider, P., Seed, B. & Tschopp, J. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 1, 489-495.

Hughes, S. J., Johnston, L. H., de Carlos, A. & Smith, G. L. (1991). Vaccinia virus encodes an active thymidylate kinase that complements a cdc8 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 266, 20103-20109.

Kettle, S., Alcamí, A., Khanna, A., Ehret, R., Jassoy, C. & Smith, G. L. (1997). Vaccinia virus serpin B22R (SPI-1) encodes M(r) 38.5 and 40K, intracellular polypeptides that do not affect virus virulence in a murine intranasal model. *Virology* 206, 136-147.

Kibler, K. V., Shors, T., Perkins, K. B., Zeman, C. C., Banaszak, M. P., Biesterfeldt, J., Langland, J. O. & Jacobs, B. L. (1997). Double-stranded RNA is a trigger for apoptosis in vaccinia virus-infected cells. *J Virol* 71, 1992-2003.

Kotwal, G. J. & Moss, B. (1989). Vaccinia virus encodes two proteins that are structurally related to members of the plasma serine protease inhibitor superfamily. *J Virol* 63, 600-606.

557 Tait, S. W. & Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization
558 and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 621-632.
559 Taylor, J. M. & Barry, M. (2006). Near death experiences: poxvirus regulation of apoptotic death.
560 *Virology* 344, 139-150.
561 Tengelsen, L. A., Slabaugh, M. B., Bibler, J. K. & Hruby, D. E. (1988). Nucleotide sequence and
562 molecular genetic analysis of the large subunit of ribonucleotide reductase encoded by
563 vaccinia virus. *Virology* 164, 121-131.
564 Tewari, M. & Dixit, V. M. (1995). Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by
565 the poxvirus crmA gene product. *J Biol Chem* 270, 3255-3260.
566 Unterholzner, L., Sumner, R. P., Baran, M., Ren, H., Mansur, D. S., Bourke, N. M., Randow, F.,
567 Smith, G. L. & Bowie, A. G. (2011). Vaccinia virus protein C6 is a virulence factor that binds
568 TBK-1 adaptor proteins and inhibits activation of IRF3 and IRF7. *PLoS pathogens* 7,
569 e1002247.
570 Wasilenko, S. T., Banadnya, L., Bond, D. & Barry, M. (2005). The vaccinia virus F1L protein interacts
571 with the proapoptotic protein Bak and inhibits Bak activation. *J Virol* 79, 14031-14043.
572 Wasilenko, S. T., Meyers, A. F., Vander Helm, K. & Barry, M. (2001). Vaccinia virus infection disarms
573 the mitochondrion-mediated pathway of the apoptotic cascade by modulating the
574 permeability transition pore. *J Virol* 75, 11437-11448.
575 Wasilenko, S. T., Stewart, T. L., Meyers, A. F. & Barry, M. (2003). Vaccinia virus encodes a previously
576 uncharacterized mitochondrial-associated inhibitor of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*
577 100, 14345-14350.

FIGURE LEGENDS

581 Fig. 1. Expression of VACV anti-apoptotic proteins by lentivirus-transduced U2-OS cells. (a) Lysates
582 of lentivirus-transduced U2-OS cells were analysed by SDS-PAGE and immunoblotting with
583 indicated antibodies. Molecular size markers are indicated on the left (kDa). A long exposure is
584 indicated with an asterisk. (b) For FI detection the cells were treated with MG-132 for the indicated
585 time prior to immunoblotting. (c) Immunofluorescence. Cells were fixed and stained for
586 immunofluorescence analysis using rabbit anti-FLAG antibody. The expression of GFP, FLAG-
587 tagged proteins and merged images with DNA stained with DAPI are shown. Scale bars, 20 µm.

589 Fig. 2. Induction of extrinsic apoptosis in the transduced U2-OS cells. (a) Cells were incubated
590 overnight with either cycloheximide (CHX, 30 µg mL⁻¹) or CHX and TNF-α (10 µg mL⁻¹) for 16 h
591 and then photographed. Scale bar, 200 µm. (b) Cells were treated as in (a) and lysates were analysed
592 by SDS-PAGE and immunoblotting against cleaved PARP-1 or α-tubulin. A representative blot of 3
593 repeats is shown. Quantitative data were obtained by integrating the intensity of the bands from the

594 three repeats using a LI-COR system. Data were normalised to α-tubulin and are shown as the mean ±
595 SD. (c) Cells were treated as in (a) and apoptosis was assessed quantitatively using Caspase-Glo®.
596 Data are shown as the mean ± SD fold induction relative to the EV and are representative of at least 3
597 experiments each performed in triplicate. Statistical differences between EV and anti-apoptotic
598 protein transduced-cells were determined using an un-paired Student's t-test (* p<0.05, ** p<0.01).

600 Fig. 3. Induction of intrinsic apoptosis in the transduced U2-OS cells. (a) Cells were incubated with
601 staurosporine (STS, 0.5 µM) for 8 h. Cell lysates were resolved by SDS-PAGE and analysed by
602 immunoblotting against cleaved PARP-1. A representative blot of 3 repeats is shown. Quantitative
603 data were obtained by integrating the intensity of the bands from the three repeats using a LI-COR
604 system. (b, c) Cells were treated with STS for 8 h (b) or doxorubicin (3 µM) for 30 h (c) and
605 apoptosis was assessed quantitatively using Caspase-Glo®. Data are plotted as fold induction relative
606 to the EV and shown as the mean ± SD, and are representative of at least 3 experiments performed in
607 triplicate. Statistical differences between EV and anti-apoptotic protein transduced-cells were
608 determined using an un-paired Student's t-test (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001).

610 Fig. 4. vv811 infection of U2-OS cell lines expressing VACV anti-apoptotic proteins. (a) Schematic
611 of the genome structure of VACV strains vv811 and Copenhagen (Cop), with the position of the anti-
612 apoptotic proteins indicated. ITR, inverted terminal repeat; B13R-t, truncated-B13R gene; RRLs,
613 ribonucleotide reductase large subunit; TmpK, thymidylate kinase. Note gene Cop C12L is equivalent
614 to gene B22R of VACV WR. (b) U2-OS parental cells were infected at 2.5 p.f.u./cell with vv811 or
615 WR and caspase 3/7 activity was assessed when indicated using Caspase-Glo®. Data are normalised
616 to mock-infected cells to obtain a fold induction. (c) U2-OS cell lines were infected with vv811 at 2.5
617 p.f.u./cell for 24 h and apoptosis was assessed quantitatively using Caspase-Glo®. Data are shown as
618 the mean ± SD and are representative of at least 3 experiments performed in triplicate. Statistical
619 differences were determined using an un-paired Student's t-test (* p<0.05, ** p<0.01, ****

647 in triplicate. Statistical differences were determined using an un-paired Student's *t*-test (* $p<0.05$, **

648 $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$).

649

650

620 $p<0.0001$). (d) Cells were infected with vv811 at 0.1 p.f.u./cell, harvested at the indicated time and
621 intracellular virus titre was determined by plaque assay on BSC-1 cells.

622

623 Fig. 5. Construction of recombinant vv811 viruses. (a) The genotypes of the resolved viruses were
624 analysed by PCR from proteinase K-treated, infected BSC-1 cell lysates using primers annealing to
625 the flanking regions of *RR* or *TmpK* genes. The resulting PCR products were compared to those
626 obtained from plasmid templates (pB13, pF1, pGAAP, pN1). Molecular size markers are indicated on
627 the left in kbp. (b-d) BSC-1 cells were infected with 5 p.f.u./cell of the indicated recombinant or
628 parental vv811 viruses and cell lysates were analysed by immunoblotting using specific polyclonal
629 antiserum for B13 (b), F1 (c), NI (d), as well as A49 and tubulin. (e) U2-OS cells were infected for 8
630 h with 2.5 p.f.u./cell of vv811-GAAP and stained using a polyclonal antiserum for GAAP and
631 antibody to GM130. DNA was stained with DAPI. Scale bar, 20 μ m. A magnified image of the small
632 square from the merged image is shown on the top left of each panel. (f) U2-OS cells were infected
633 with the indicated viruses for 96 h. Cells were stained with crystal violet and the radius of >15
634 plaques/virus was measured. Data are expressed as the mean $\pm$ SD plaque radius (μ m). (g) U2-OS
635 cells were infected with the indicated viruses at 2.5 p.f.u./cell. Cells were harvested into the medium
636 at 24 h and virus titre was determined by plaque assay on U2-OS cells. Data are shown as the mean $\pm$
637 SD.

638

639 Fig. 6. Induction of apoptosis by the recombinant vv811 viruses. (a, b) Cells were seeded in 96-well
640 plates and infected at 2.5 p.f.u./cell with recombinant vv811 viruses for 24 h. Cell viability was
641 measured in U2-OS (a) and in HeLa (b) cells using the Celltiter-Blue® cell viability assay according
642 to manufacturer's recommendations. (c, d) U2-OS (c) and HeLa (d) cells were infected with
643 recombinant vv811 viruses and recombinant VACV generated in either strain WR (Δ B13, Δ F1, Δ NI)
644 or Evans (Δ GAAP) as in (a, b) and apoptosis was assessed quantitatively using Caspase-Glo®. Cell
645 lysates were analysed by SDS-PAGE and immunoblotting with antibodies against the indicated
646 proteins. Data are shown as the mean $\pm$ SD and are representative of at least 3 experiments performed

Fig. 1.

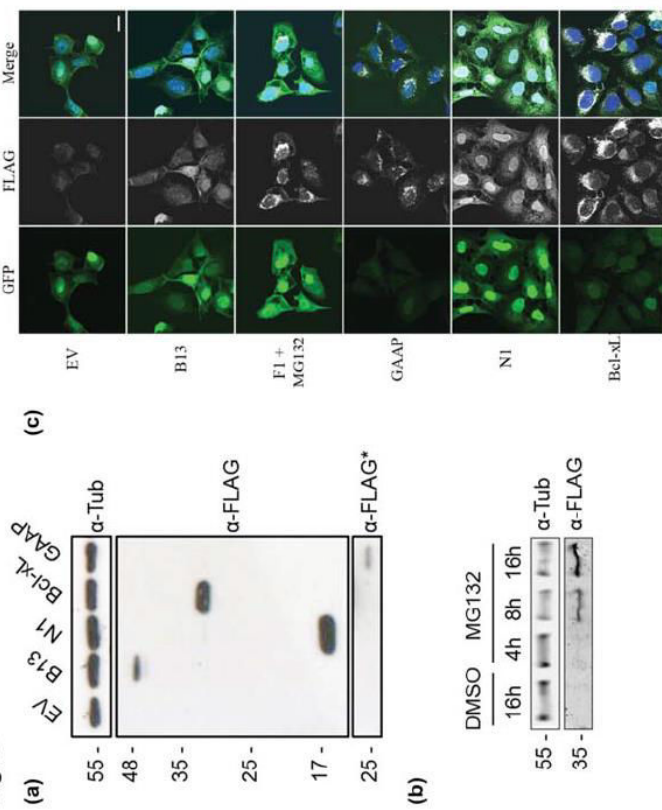


Fig. 2.

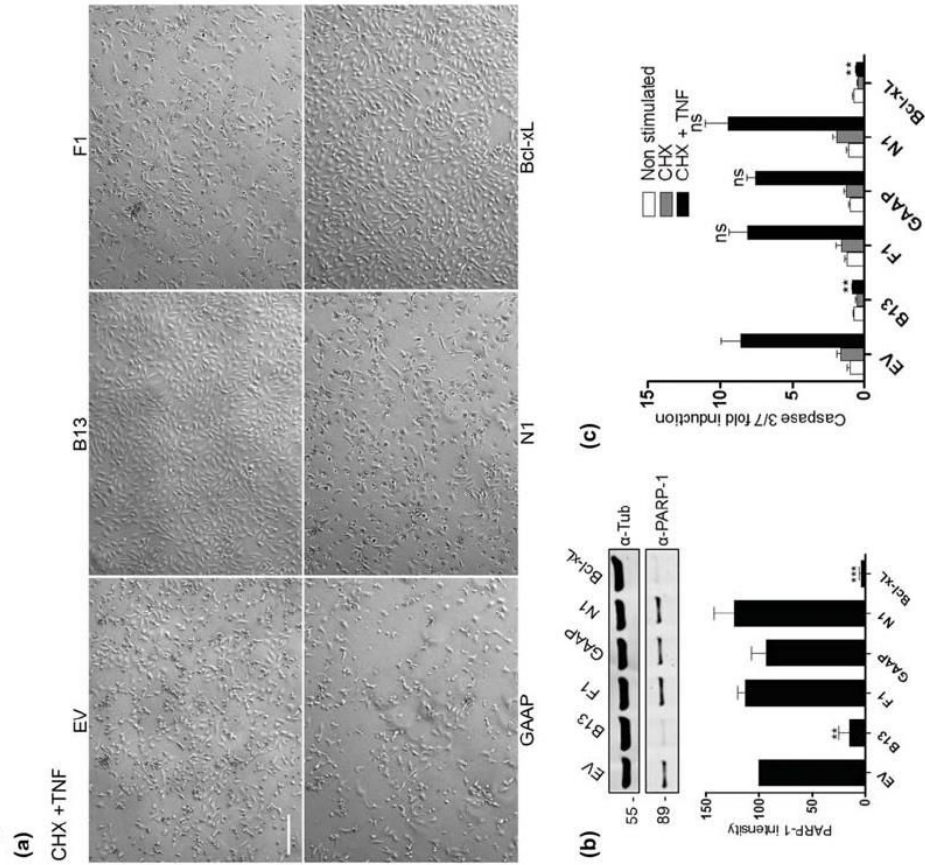


Fig. 4.

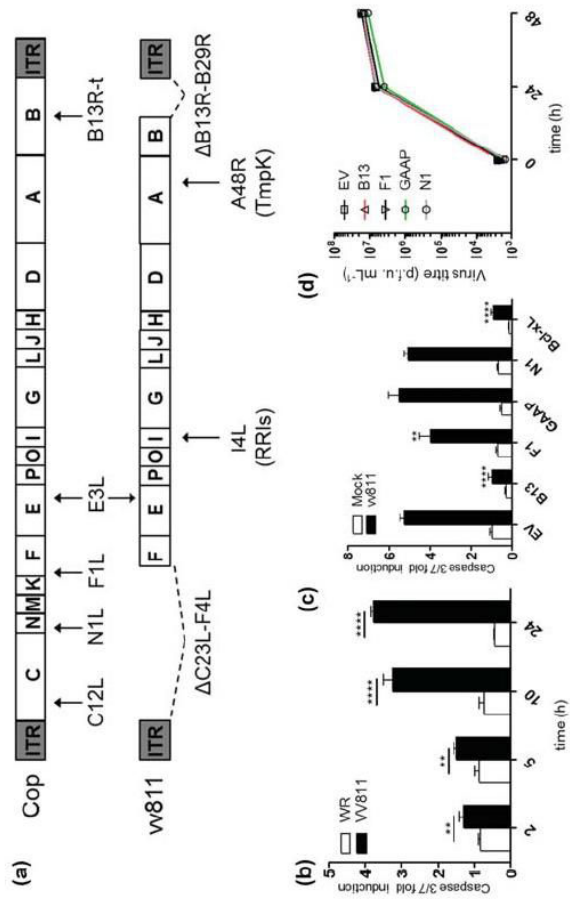
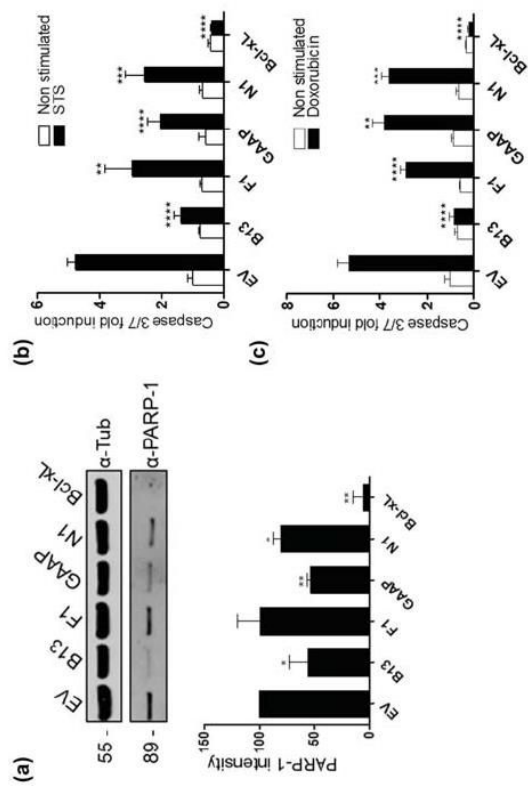


Fig. 3.



ANNEXE 2.

VU :

VU :

**Le Directeur de Thèse
l'École Doctorale**

Le Responsable de

Professeur Ronald COLIMON

Le 1^{er} novembre 2014,



VU pour autorisation de soutenance

Rennes, le

Le Président de l'Université de Rennes 1

Guy CATHELINEAU

VU après soutenance pour autorisation de publication :

☐ Avec modifications

☐ Sans modifications

Le Président de Jury,

(Nom et Prénom)

Si modifications à faire, validation par le directeur de thèse du manuscrit corrigé avec attestation

Résumé

L'apoptose, mort cellulaire observée suite à l'activation des caspases effectrices, est un moyen de défense contre les pathogènes, en particulier les virus. Le virus de la vaccine (VACV) est un virus contenant un grand génome à ADN codant pour environ 200 protéines, dont plusieurs inhibent l'apoptose. Cette apparente redondance fonctionnelle complique l'étude des protéines antiapoptotiques du virus dans un contexte d'infection virale. Dans ce travail, nous comparerons les propriétés antiapoptotiques des protéines B13, F1, GAAP et N1 de VACV. Cette comparaison sera établie dans un premier temps en dehors de toute infection virale. En utilisant des vecteurs lentiviraux, nous avons obtenu des lignées cellulaires stables (U2-OS) exprimant ces protéines en isolation. Nous avons alors pu tester les capacités antiapoptotiques de ces protéines en réponse à des stimuli provoquant l'apoptose extrinsèque et intrinsèque. Les résultats ont montré que B13 était la plus puissante molécule inhibitrice de l'apoptose intrinsèque et qu'elle était la seule à inhiber l'apoptose extrinsèque. Ensuite nous avons tiré avantage d'un virus de la vaccine déficient (vv811) qui ne possède aucune de ces protéines antiapoptotiques, capable à lui seul d'induire l'apoptose, en l'absence de toute autre stimulus. En infectant nos lignées cellulaires exprimant les molécules *in trans* avec vv811, nous avons pu montrer que B13 inhibait cette apoptose induite par le virus beaucoup plus efficacement que F1. GAAP et N1 dans ce contexte n'ont pas démontré de propriétés antiapoptotiques. Enfin, nous avons construit par mutagénèse des virus vv811 recombinants exprimant les molécules étudiées *in cis*. Suite à l'infection par ces virus de cellules U2-OS et Hela, B13, de nouveau, et F1 ont montré des capacités d'inhibition importantes de l'apoptose. L'action de GAAP s'est révélée dépendante du type cellulaire et N1 n'a pas pu inhiber l'apoptose induite par ce virus déficient dans aucune des cellules testées. En utilisant ces différentes approches, nous avons pu nous affranchir des problèmes de redondance et comparer 4 molécules antiapoptotiques du virus de la vaccine, y compris dans un contexte d'infection virale. Les résultats ont confirmé que toutes les protéines étudiées possédaient des propriétés antiapoptotiques et ont clairement montré que B13 était la plus puissante.

Summary

Apoptosis, which occurs following activation of effector caspases, can restrict the replication of intracellular pathogens, especially viruses. Vaccinia virus (VACV) is a large dsDNA virus encoding approximately 200 proteins, several of which inhibit apoptosis. This redundancy of viral anti-apoptotic proteins complicates the study of these proteins in the context of viral infection. Here a comparative study of the anti-apoptotic proteins B13, F1, GAAP and N1 with and without virus infection is presented. Firstly, using lentiviral constructs, we generated transduced cell lines expressing the anti-apoptotic proteins in isolation and we analysed their ability to protect against extrinsic and intrinsic apoptosis induced by different drugs. In that context B13 was the most potent inhibitor of intrinsic apoptosis and the only protein to inhibit both extrinsic and intrinsic apoptosis. We then used a deficient VACV strain, vv811, that lacks the genes coding for the four anti-apoptotic proteins. Infection with vv811 can induce apoptosis without the need for any other stimulus. After vv811 infection of cell lines expressing the anti-apoptotic proteins *in trans*, B13 and to a lesser extent F1, inhibited apoptosis. Finally, we introduced each gene separately into vv811 by genetic recombination. Using these recombinant viruses to induce apoptosis, B13 and F1 were very potent inhibitors. The protection conferred by GAAP was cell type dependant and N1 failed to protect any of the tested cells from the virus induced apoptosis. Using these different approaches, we have been able to overcome the redundancy issue to compare 4 anti-apoptotic proteins from VACV, including in the context of viral infection. The results illustrate that vv811 is a useful tool to determine the role of VACV anti-apoptotic proteins during infection and that whilst all of these proteins have some anti-apoptotic activity, B13 is most potent.