



Version PDF

Responsable : Monique Lafon (mlafon@pasteur.fr)

Résumé

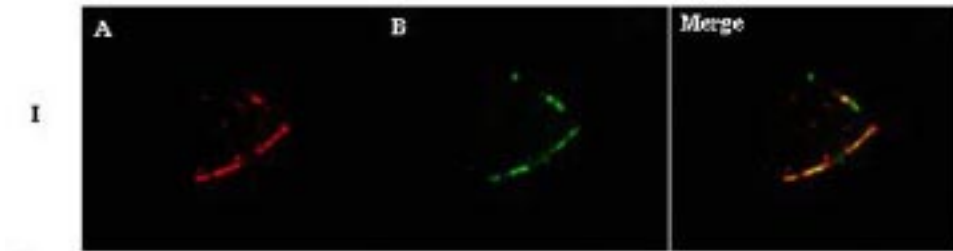
Le thème de recherche consiste à étudier les interactions qui s'établissent entre les virus neurotropes, le système immunitaire et le système nerveux (SN). Cette approche devrait permettre de développer des stratégies thérapeutiques antivirales adaptées aux infections du SN.

Rapport d'activité

Nous faisons l'hypothèse que, pour mener à bien leur cycle viral, les virus neurotropes ont sélectionné des mécanismes qui préservent l'intégrité des neurones qu'ils infectent. Les virus neurotropes sur-exprimeraient ainsi des molécules qui favorisent la survie du neurone et/ou lui permettent d'échapper à la réponse immunitaire. Ainsi les virus neurotropes bien adaptés au système nerveux induiraient une immuno-subversion, obtenue soit localement par le renforcement du privilège immun de ce système soit en périphérie en immuno-suppressant le système immunitaire.

Echapper à l'apoptose ferait aussi partie des stratégies suivies par les virus neurotropes pathogènes. Ceci pourrait être intrinsèquement modulé par les protéines virales ou par la sécrétion de facteurs protecteurs du neurone. La préservation de l'intégrité des neurones qu'ils infectent leur permettrait d'assurer avec succès leur cheminement au travers du SN et leur transmission à un nouvel hôte. Ce mécanisme aurait été retenu par des virus extrêmement adaptés au SN comme le virus de la rage qui, après son inoculation par morsure au niveau d'un muscle, doit impérativement atteindre les glandes salivaires pour être excrété et recommencer un cycle dans un nouvel hôte.

Nous utilisons le virus de la rage comme modèle d'infection du SN de la souris.



Nous disposons au laboratoire de souches de pathogénicité atténuée, peu adaptées au système nerveux qui ne causent qu'une infection transitoire et abortive (PV) et aussi de souches (CVS) qui sont au contraire fortement pathogènes et neuro invasives. Après injection dans le muscle de la patte arrière, les virus des deux souches gagnent par les nerfs le SNC et progressent de neurones en neurones, ils infectent de façon similaire la moelle épinière. Par la suite, la progression des

deux souches est tout à fait différente : l'infection par la souche de pathogénicité atténuée PV n'atteint en effet pas le cerveau ou transitoirement le cervelet, et les souris survivent, alors que la souche pathogène CVS envahit la totalité du cerveau et induit la mort de l'animal

Rôle de FasL dans l'immuno-subversion (Leïla Baloul)

Nous avons comparé la cinétique de migration des lymphocytes T et l'expression de FasL dans le système nerveux de souris immunocompétentes infectées par CVS ou PV.

Nous avons établi que malgré une migration similaire de lymphocytes dans le SNC des souris, leur devenir à partir du jour 7 différait sensiblement selon le type d'infection. Ainsi, les lymphocytes continuaient à envahir le SNC des souris infectées par la souche virale qui était contrôlée par la réponse immunitaire, alors qu'ils disparaissaient du SNC avec la souche pathogène. Nous avons montré que les lymphocytes disparaissaient par apoptose. Par PCR en temps réel, et immunohistochimie, nous avons établi que cette apoptose était concomitante à l'expression de FasL dans les extraits du système nerveux. Ni l'augmentation d'apoptose, ni celle de l'expression de FasL ne survenaient lors de l'infection par le virus faiblement pathogène (PV). Ceci suggérait fortement que la pathogénicité pouvait être liée à la capacité du virus à induire l'expression de FasL. Nous avons testé l'hypothèse en infectant des souris mutantes n'exprimant pas FasL (souris *gld*). Nous avons observé que l'infection était effectivement moins sévère chez les souris *gld*, que chez les souris normales (mortalité réduite et délai de deux jours dans l'apparition des paralysies).

L'ensemble de ces résultats établit que la capacité du virus à moduler FasL est un facteur essentiel de pathogénicité pour le virus de la rage. Ils suggèrent que ce mécanisme aurait été sélectionné par le virus pathogène pour désamorcer la protection conférée par les lymphocytes qui parviennent à éliminer le virus non pathogène qui lui ne module pas l'expression de FasL.

C'est à notre connaissance la première démonstration qu'un virus neurotrope est capable de moduler l'expression de FasL au niveau du système nerveux et de renforcer le privilège immun.

La pathogénicité d'une souche de virus de rage est

II

inversion corrélée à sa capacité à induire l'apoptose des cellules infectées (Stéphanie Lay, Mireille Lafage, Christophe Préhaud, Maria-Isabelle Thoulouze).

Les souches de virus qui infectent le système nerveux, (CVS, PV) de la souris et se propagent de la moelle épinière au cerveau après injection en périphérie ne sont pas capables d'induire *in vitro* l'apoptose ni des cellules de la lignée lymphoblastoïde humaine Jurkat ni de celles de neuroblastome humain (SK-N-SH). Par contre, les souches atténuées qui ont perdu leur capacité à se propager dans le système nerveux, (ERA, SAG, SN10) et qui sont des prototypes de souches de vaccin vivant oral, induisent *in vitro* l'apoptose. (Thoulouze et al., 1997, Préhaud et al, en préparation).

L'induction d'apoptose par la souche ERA se caractérise par l'exposition de phosphatidylsérine à la surface des cellules et par la fragmentation nucléaire (Photo). L'apoptose rabique dans les cellules Jurkat fait intervenir essentiellement l'activation des caspases mais aussi des mécanismes indépendants comme la translocation de l'AIF (apoptosis inducing factor) (Thoulouze et al, soumis). L'entrée en apoptose s'accompagne d'une accumulation et d'une répartition particulière de protéines virales, protéines G et N, dans le cytoplasme (Photo).

Seule la protéine G de ERA, souche de virus atténuée est pro-apoptotique (Christophe Préhaud, Stéphanie Lay, en collaboration avec B. Dietzschold, Jefferson Institute, Philadelphia, USA)

Puisque les deux virus ERA et CVS infectent tous deux les lymphocytes, mais que l'apoptose n'est observée qu'avec la souche ERA, nous avons testé l'hypothèse que l'entrée en apoptose pouvait être liée à la nature intrinsèque des protéines de la souche ERA.

La mise au point d'un système d'expression des protéines G et N du virus de la rage inducible par la Doxycycline dans les cellules Jurkat nous a permis d'établir que seule l'expression de la protéine G-ERA dans les lymphocytes cibles Jurkat rTA induit l'apoptose. L'utilisation de virus recombinants obtenus par génétique inverse, dans lesquels la G-ERA pro-apoptotique a été remplacée par la G de la souche non apoptotique, a permis de montrer qu'aucune des trois autres protéines virales, M, P, ou L, n'était impliquée dans l'apoptose induite par ERA aussi bien dans les cellules lymphoblastoïdes que les neuroblastomes humains.

Application de la propriété pro-apoptotique de G-ERA à la vaccinologie (Christophe Préhaud, Françoise Mégret, Mireille Lafage en collaboration avec Christophe Batejat et Nicolas Escriou, Unité GMVR, Institut Pasteur)

Nous cherchons à démontrer *in vivo* dans un modèle de vaccination hétérologue que la glycoprotéine pro-apoptotique du virus de la rage peut améliorer une réponse vaccinale de type B (anticorps). Ceci est fondé sur la propriété adjuvante des corps apoptotiques. (Berard et al, 2000) et protectrice (Paczesny, et al, 2001).

Nous avons choisi d'étudier l'amélioration de la réponse anticorps dirigée contre le déterminant antigénique majeur du virus de la grippe (hemagglutinine : HA). Pour cela le gène de la glycoprotéine G-ERA a été introduit dans un vecteur viral de la vaccine (vaccinia) recombinant pour l'hémagglutinine de la grippe.

L'immunogénéité de corps apoptotiques obtenus à partir de lymphoblastomes (EL-4) infectés par les simples et les double recombinant est étudiée chez la souris.

Analyse différentielle des transcriptomes de neurones humains post-mitotiques NT2-N (Christophe Préhaud, Françoise Mégret)

Les cellules NT2 dérivent d'un clone du teratocarcinome humain Tera-2. Elles ont la particularité de se différencier en cellules neuronales fonctionnelles (NT2-N) en présence d'acide rétinoïque (Andrews et al, 1984, Pleasure et al, 1992, Guillemain et al, 2000). La standardisation du protocole de culture (incubations séquentielles en acide rétinoïque et inhibiteur de mitose, l'utilisation de support adaptés) permettant la différenciation des NT2-N est le fruit de plusieurs études. A la différence des cellules de pheochromocytoma de rat (PC12) traitées au NGF, les cellules NT2-N acquièrent un phénotype de neurones différenciés post-mitotiques irréversible, caractérisé par l'expression de marqueurs de neurones matures comme MAP-2, β -tubulin, synaptophysine, neurofilaments et tau. Les cellules NT2-N établissent des contacts synaptiques classiques intercellulaires et des contacts fonctionnels avec des astrocytes en co-culture.

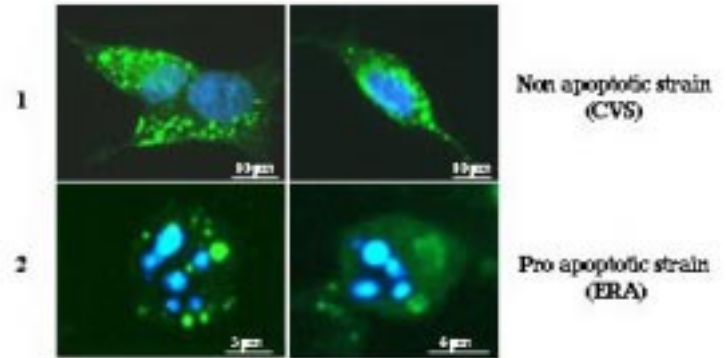
Ces cellules ont été infectées par les virus de l'herpes simplex de type 1 et par deux virus de rage de pathogénicité différentes. Les ARN ont été extraits de plusieurs préparations et soumis pour analyse différentielle des transcriptomes par la techniques de biopuces humaines (Université Louis Pasteur, Strasbourg).

L'expression des gènes sera vérifiée par des techniques classiques de Northern quantitatif et de PCR en temps réel. Leur capacité à moduler la survie des neurones suite au stress-viro-induit sera étudiée dans des systèmes de transfection et de sur-expression des protéines considérées. Lorsque les modèles murins de souris déficientes ou sur-exprimant le gène candidat seront disponibles, ils permettront de valider en modèle animal les observations faites *in vitro*.

Photo 1: La membrane des cellules infectées par la souche pro-apoptotique exprime la glycoprotéine (rouge) et la phosphatidylsérine (vert)

Photo 2: Le mode de distribution des antigènes viraux dans le cytoplasme est différent selon que la souche est pro-apoptotique (ERA) ou non (CVS). Antigènes viraux en vert. Noyau fragmentés (photo du bas) ou non (photo du haut) sont révélés avec le colorant Hoechst.

Mots-clés: neurone, apoptose, rage, HSV-1, NT2-N, AIF, neuroblastome, biopuces, Virologie, immunologie, neurologie



Publications de l'unité

➤ [Toutes les publications sur notre base de données](#)

Personnel

Secrétariat	Chercheurs	Stagiaires	Autre personnel
Corinne Baran, cbaran@pasteur.fr	Monique Lafon, Chef de laboratoire IP, HDR Christophe Préhaud, Chargé de recherches IP	Leïla Baloul, thèse d'université Paris VII soutenue le 14 Juin 2002, bourse ARC 2001-2002 Stéphanie Lay, étudiante en thèse Paris VII, bourse MRT Sandra Sotomayor, étudiante fin de maîtrise, Université de Madrid Nazim Ahnou, étudiant en licence, Paris VI Amina Bourahoui, médecin neurologue Hôpital Henri Mondor, étudiante en DEA de Neurosciences	Mireille Lafage, Technicienne Supérieure IP Françoise Mégret, Ingénieur de recherches IP (depuis le 1er juillet 2001) Jasmine Deshommes, Etudiante en BTS

Rapports d'activité 2002 - Institut Pasteur



En cas de problèmes, de remarques, ou de questions concernant cette page Web écrire à rescom@pasteur.fr