

Université de Montréal

Étude des propriétés anti-apoptotiques de la sous-unité R1
de la ribonucléotide réductase des virus de l'herpes simplex

par

Annie Gervais

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en biologie moléculaire

Juillet 2000

Annie Gervais, 20000



QH
506
N54
2000
N. 013



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude des propriétés anti-apoptotiques de la sous-unité R1
de la ribonucléotide réductase des virus de l'herpes simplex

présenté par :

Annie Gervais

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Richard Bertrand, Président rapporteur
Dr. Yves Langelier, Directeur de recherche
Dr. Wagner Yotov, Membre du jury

Mémoire accepté le :

Sommaire

La sous-unité R1 de la ribonucléotide réductase des virus de l'Herpes Simplex I et II possède une extension d'environ 350 acides aminés à son extrémité NH₂ qui n'est pas nécessaire à la réduction des ribonucléotides. Nous avons effectué des études pour déterminer le rôle de ce domaine. Nos résultats ont démontré que l'expression de la R1 déléetée de ce domaine NH₂ (AdTR5R1 (Δ 2-357)) provoquait l'apoptose des cellules, d'où l'hypothèse qu'il avait des propriétés anti-apoptotiques. Nos résultats subséquents ont démontré que la R1 empêchait l'apoptose induite par le TNF et par FasL. Afin d'identifier la partie de la protéine responsable de l'activité anti-apoptotique, nous avons construit des adénovirus recombinants codant pour différents segments du domaine NH₂. Les essais de protection contre l'apoptose que nous avons effectués avec ces recombinants ont démontré qu'il ne possédaient pas d'activité anti-apoptotique contre le TNF, FasL ou la R1 Δ . Nos travaux sur le mécanisme d'action de la R1 ont démontré que l'activation de la caspase 8 induite par le TNF ou par FasL était empêchée par la R1. Nos travaux aident à clarifier les mécanismes moléculaires de l'effet anti-apoptotique des virus de l'herpes, par la suppression de l'activité de la caspase 8.

Table des matières

Section I

Introduction

1.1 Les virus de l'Herpes Simplex 1 et 2	2
1.1.1 Structure du virion	
1.1.2 Le génome	
1.1.3 Cycle lytique	
1.1.4 Latence	
1.1.5 Réactivation	
1.2 La Ribonucléotide Réductase	6
1.2.1 Propriétés générales de la RR	
1.2.2 Particularités de la RR des HSV-1 et HSV-2	
1.2.3 Rôle de la RR chez les HSV	
1.3 L'apoptose	9
1.3.1 Généralités	
1.3.2 Induction de l'apoptose	
1.3.3 Activation par liaison d'un ligand à son récepteur	
1.3.4 Le TNF	
1.3.5 Le récepteur Fas (CD-95)	
1.3.6 Mécanismes effecteurs	
1.3.7 Les régulateurs de l'apoptose	
1.3.7 Les caspases	
1.4 Le contrôle de l'apoptose par les virus	20
1.4.1 Inhibition des caspases	
1.4.2 Les homologues de Bcl-2	
1.4.3 L'apoptose induite par un récepteur	
1.4.4 Sécrétion de récepteurs à cytokines	
1.4.5 Inhibiteurs ne possédant pas d'homologue cellulaire	
1.5 Objectifs de la recherche	23

Section II

Matériel et méthodes

2.1	Culture cellulaire	25
2.2	Essais de protection contre l'apoptose des adénovirus recombinants AdTR5R1, AdTR5NH ₂ GFP, AdTR5NH ₂ A et AdTR5 NH ₂ C	25
2.2.1	Ensemencement des cellules	
2.2.2	Infection des cellules	
2.2.3	Induction de l'apoptose	
2.2.4	Quantification de l'apoptose	
2.3	Récolte des cellules	28
2.4	Analyse des protéines	29
2.5	Construction des adénovirus recombinants NH ₂ A et NH ₂ C	30
2.5.1	Transfection des cellules	
2.5.2	Prélèvement des plages de lyse	
2.5.3	Amplification du virus	
2.5.4	Criblage des clones prélevés	
2.5.5	Seconde amplification du virus	
2.5.6	Titrage du virus	
2.6	Immunofluorescence	34
2.7	Essai d'activité caspase	35

Section III

Résultats – Partie 1

3.	Essais de protection contre l'apoptose des adénovirus recombinants R1, NH ₂ GFP, NH ₂ A et NH ₂ C	37
3.1	Essai de protection contre l'apoptose par la protéine R1	37
3.2	Essai de protection contre l'apoptose par NH ₂ GFP	42
3.3	Essai de protection contre l'apoptose par NH ₂ A	47
3.4	Essai de protection contre l'apoptose par NH ₂ C	50

3.5	Expression des protéines R1, NH ₂ GFP, et NH ₂ A	52
3.6	Immunofluorescence	54

Résultats – Partie 2

3.7	Mécanisme d'action de la protéine R1 dans la protection contre l'apoptose	56
3.7.1	Détection de la caspase 8 par immunobuvardage	
3.7.2	Essai d'activité caspase	
3.7.3	Interaction avec la pro-caspase	

Section IV

Discussion

4.1	Protection contre l'apoptose par la R1	65
4.2	Protection contre l'apoptose par la NH ₂ GFP, NH ₂ A et NH ₂ C	66
4.3	Mécanisme d'action.....	68
5.0	Perspectives	70

Liste des figures

Figure 1 : Protéines impliquées dans la transduction des signaux par TNFR	15
Figure 2 : Protection par la R1 de la RR contre l'apoptose induite par le TNF	39
Figure 3 : La R1 protège les cellules contre FasL	41
Figure 4 : Absence de protection par NH ₂ GFP contre l'apoptose induite par le TNF	44
Figure 5 : Absence de protection par NH ₂ GFP contre l'apoptose induite par la R1Δ et FasL	46
Figure 6 : Absence de protection par NH ₂ A contre l'apoptose induite par le TNF et la R1Δ	49
Figure 7 : Absence de protection par NH ₂ C contre l'apoptose induite par le TNF et la R1Δ	51
Figure 8 : Immunobuvardage des protéines R1, NH ₂ GFP et NH ₂ A	53
Figure 9 : Immunofluorescence des protéines R1, NH ₂ A et NH ₂ C	55
Figure 10 : Immunobuvardage – détection de la caspase 8	58
Figure 11 : Essai d'activité caspase	61
Figure 12 : La R1 n'a pas d'effet inhibiteur sur la caspase 8 active	63

Liste des abréviations

µl:	Micro-litre
µs :	Micro-seconde
°C:	Degré Celcium
Ad :	Adénovirus
AFC:	7-amino-4-trifluoromethyl coumarin
ATP:	Adénosine triphosphate
BH:	Bcl-2 homology
BHV:	Bovine herpesvirus
CARD:	Caspase Recrutement Domain
CHX :	Cycloheximide
CPE:	Complete Pathological Effect
CrmA:	Cytokine Response Modifier A
Cyt. C	Cytochrome C
DD:	Death domain
DED:	Death effector domain
DISC:	Death inducing signaling complex
E:	Early
EBV:	Epstein Barr virus
EHV:	Equine herpesvirus
FADD:	Fas-associated protein with death domain
FasL:	Fas ligand
FLIP:	Flice inhibitory protein
GFP:	Green fluorescent protein
h:	Heure
HHV:	Human herpesvirus
HSV :	Herpes Simplex Virus
HVS:	Herpesvirus saimiri
IAP :	Inhibitor of apoptosis
IE:	Immediate early
L:	Litre
LAT:	Latency associated transcript
m.i.:	Multiplicity of infection
MAP:	Mitogen activating protein
min :	Minute
ml :	Millilitre
ng:	Nanogramme
PARP:	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS :	Phosphate-buffered saline
p.f.u. :	Plaque forming unit
r.p.m.:	Rotation per minute
R1:	Sous-unité R1 de la Ribonucléotide Réductase
R2 :	Sous-unité R2 de la Ribonucléotide Réductase
RR:	Ribonucleotide Réductase

sec:	Secode
Tet:	Tetracycline
TNF:	Tumor Necrosis Factor
TRAD:	TNFR-1 associated death domain protein
TRIP:	TRAF interacting protein
tTa:	tet-regulated transactivator

Remerciements

Je voudrais remercier Yves Langelier, mon directeur de recherche, Stéphan Denis, mon mari Michel, ma famille et mon amie Yolaine.

Yves Langelier, parce qu'il a su bien diriger mes travaux et qu'il a fait preuve de beaucoup de patience,

Stéphan, parce qu'il m'a inculqué la notion très importante que les bactéries, les protéines, les virus, l'ADN sont nos amis...

Michel, parce qu'il m'a encouragée et supportée (ce qui n'est pas toujours facile) tout au long de mes études,

Ma famille, parce qu'il ont tous écouté attentivement chaque petit détail relatif à l'avancement de mes travaux,

Et Yolaine, parce qu'elle a montré tellement d'intérêt.

Section I

Introduction

Section I

Introduction

1.1 Les virus de l'Herpes Simplex 1 et 2

Les virus de l'herpes simplex (HSV-1 et HSV-2) sont des virus qui se maintiennent dans les populations humaines par leur capacité d'établir des infections latentes à long terme, qui sont suivies par des réactivations et transmissions périodiques (Revue, Steiner et Kennedy, 1993). L'infection par les virus HSV-1 et HSV-2 cause des lésions faciales et génitales. Suite à l'infection primaire, ces virus établissent une latence dans les ganglions neuronaux sensitifs, puis, par un mécanisme encore non élucidé, se réactivent et peuvent infecter de nouveaux hôtes (Aurelian, 1998). Plusieurs travaux sont en cours pour tenter d'élucider les mécanismes d'établissement de la latence et de la réactivation de ces virus.

1.1.1 Structure du virion

Les virus HSV-1 et HSV-2 sont morphologiquement identiques. Le génome est constitué d'une molécule d'ADN double brin linéaire d'environ 150 kb, entourée d'une capsidie icosaédrique formée de 162 capsomères. La nucléocapsidie (capsidie et ADN) est entourée du tégment, constitué de plus de 20 protéines virales, et d'une enveloppe constituée d'une double couche lipidique provenant de l'hôte qui contient différentes protéines membranaires virales (Aurelian, 1998).

1.1.2 Le génome

Les gènes des HSV1 et HSV-2 sont transcrits par la machinerie cellulaire de l'hôte. Les gènes sont classés en trois catégories selon la régulation de leur transcription. Les premiers gènes transcrits sont les gènes IE (*Immediate-Early*). Ces gènes sont exprimés avant la production des protéines virales, mais leur taux de transcription est stimulé par Vp16, une protéine du tégment, qui agit comme transactivateur. Vp-16 se lie à Oct-1, un facteur de transcription cellulaire, et par la suite, reconnaît et se lie à la séquence TAATGARAT pour stimuler la transcription des gènes IE. Les produits des gènes IE vont activer la transcription des gènes E (*Early*). Les gènes E codent pour les protéines essentielles à la réplication de l'ADN viral et autres protéines non structurales. Les gènes E sont dépendants de l'expression des gènes IE mais ne requièrent pas de synthèse d'ADN pour être transcrits. Les produits des gènes L (*Late*) sont transcrits de façon tardive et constituent les protéines structurales du virion (Subak-Sharpe et Dargan, 1998).

1.1.3 Cycle lytique

La fusion de l'enveloppe virale à la membrane de l'hôte permet la libération du virus dans le cytoplasme. Suite à l'infection, la synthèse d'ADN et de protéines de l'hôte est arrêtée. La transcription et la réplication du virus cause des changements structuraux importants à la cellule qui causeront éventuellement sa destruction. Les protéines du cytosquelette ainsi que les protéines de surface sont dégradées causant un détachement cellulaire, un arrêt de la synthèse de l'ADN cellulaire, des bris et une fragmentation des

chromosomes, ce qui provoque éventuellement la mort de la cellule (Steiner et Kennedy, 1993).

1.1.4 Latence

La période de latence est définie comme étant l'absence de particules virales infectieuses dans les tissus qui contiennent le génome viral (Stevens, 1989). Certains stimuli peuvent permettre au virus de se réactiver, d'amorcer un nouveau cycle de réplication et de causer de nouvelles lésions.

La réplication virale au site d'infection primaire n'est pas essentielle à l'établissement de la latence, des mutants viraux incapables de se répliquer étant capables d'établir une latence (Steiner et al., 1990). Suite à l'attachement des particules virales aux terminaisons axonales, le virus est transporté par transport axonal rétrograde jusqu'au corps cellulaire. L'infection des neurones peut aussi se faire par infection des cellules de Schwann et par la voie lymphatique. Lors de l'attachement du virus à la membrane axonale, le virus perd son enveloppe, et le contenu du tégment et de la capsid est transporté au noyau neuronal. L'ADN viral est maintenu sous forme circulaire dans le noyau et n'est pas intégré dans le génome de l'hôte. Trois différents transcrits viraux provenant de l'épissage alternatif d'un même transcrit sont détectables lors de la période de latence. Ces LATs (*Latency Associated Transcripts*) sont des ARN d'une grande stabilité qui ne seraient pas traduits (Steiner, 1993). Les LAT seraient requis pour la réactivation du HSV. En effet, il a été démontré que l'infection des ganglions trijumeaux

par un virus LAT (-) provoquait chez le lapin des taux très élevés d'apoptose, alors que les LAT exprimés par un plasmide empêchaient l'apoptose des cellules en culture. Les LAT permettraient donc la survie des neurones suite à l'infection par le HSV (Perng et. al., 2000).

1.1.5 Réactivation

Les stimuli provoquant la réactivation du virus incluent des lésions aux tissus innervés par des neurones infectés, une exposition aux UV, la fièvre et le stress. Lors de l'infection lytique, Vp-16 est un facteur essentiel à la réplication du virus. Lors de la réactivation, d'autres facteurs cellulaires ou viraux doivent permettre la réplication en absence de Vp-16. Certains auteurs impliquent un rôle au facteur C1 (*host cell factor*) qui agirait comme activateur de la transcription et jouerait un rôle dans la progression du cycle cellulaire (Kristie et. al., 1999). Un changement physiologique du neurone qui innerve le site d'infection pourrait rendre la cellule permissive à l'initiation d'un cycle lytique. Ce mécanisme impliquerait c-Jun et Oct-1. Un dommage à la surface épithéliale pourrait causer des changements dans la régulation de la transcription dans le neurone innervant la région, et stimuler la transcription de facteurs tel c-Jun et Oct-1. Ces derniers permettraient l'initiation de l'expression des gènes IE (Valyi-Nagy, 1991). Aucun mécanisme de réactivation n'a toutefois été identifié avec certitude à ce jour.

1.2 La ribonucléotide réductase

1.2.1 Propriétés générales de la RR

La ribonucléotide réductase (RR) est une enzyme essentielle à la réplication de l'ADN. Les 2'-désoxyribonucléotides proviennent d'une réduction enzymatique des ribonucléotides par la RR et servent de substrat à l'ADN polymérase. Il existe trois classes de RR selon le radical libre utilisé pour activer le substrat. La RR des HSV-1 et HSV-2 appartient à la classe I, et génère un radical tyrosyl. Ces enzymes sont constituées de deux homodimères R1 et R2. La sous-unité R1 contient le site catalytique et deux sites de contrôle allostérique. La sous-unité R2 contient un centre diferrique et, dans sa forme active, un radical tyrosyl (Jordan et Reichard, 1998).

1.2.2 Particularités de la RR des HSV-1 et HSV-2

La RR des mammifères et de *Escherichia Coli*, comme celle des HSV-1 et HSV-2, appartient à la classe 1. Des études biochimiques ont permis d'établir que la R1 de HSV-1 et HSV-2 possède des propriétés qui la distinguent des R1 de classe 1.

La synthèse des nucléotides est hautement régulée dans la cellule. Chez *E. Coli* et chez les mammifères, on retrouve deux sites de régulation allostérique de l'enzyme. Un site contrôle l'activité de l'enzyme et l'autre site contrôle la spécificité du substrat. La liaison du substrat au site actif est régulée de deux façons : la liaison du substrat ne se produit

que suite à la réduction des cystéines du site actif, et la liaison du substrat approprié est régulée par la liaison d'effecteurs allostériques. Le site de contrôle de l'activité de l'enzyme régule l'interaction avec la sous-unité R2 (Eriksson et.al, 1997). Chez HSV-1 et HSV-2, ces régions sont absentes, et l'enzyme ne subit aucune forme de régulation. De plus, l'activité de l'enzyme chez les mammifères dépend du cycle cellulaire. La protéine est exprimée en phase S, et la régulation de son activité dépend de la présence de la sous-unité R2. En effet, la sous-unité R1 ayant une grande stabilité, et la sous-unité R2 ayant une demi-vie très courte (3 h), l'activité de l'holoenzyme dépend de la présence de la R2 dans la cellule (Engstrom et.al., 1984). Chez les HSV-1 et HSV-2, l'enzyme est produite en excès. Les deux sous-unités peuvent s'accumuler dans la cellule et excéder jusqu'à dix fois les besoins pour la synthèse des nucléotides (Lamarche et Langelier, 1993). Une autre particularité de la R1 des HSV-1 et HSV-2, basée sur des alignements de séquences, est le fait qu'elle possède une extension d'environ 350 a.a. à son extrémité NH₂ qui est absente chez les R1 des autres virus herpes et chez les autres espèces.

1.2.3 Rôle de la RR chez les HSV

Plusieurs études ont été faites avec des mutants pour tenter de déterminer le rôle de la RR dans la pathogénèse et la réactivation du virus. Goldstein et Weller (1987) ont synthétisé un mutant HSV par transfection de cellules avec un plasmide contenant le gène lacZ inséré dans le gène ICP6 (R1) de façon à ce que le gène lacZ soit lu avec le N-terminal de ICP6. Ce mutant, appelé hrR3, génère une protéine contenant les 434 a.a. N-terminaux de la R1 fusionnés à la B-galactosidase, et ne possède pas d'activité réductase. ICP-6 Δ est également un mutant herpes. Parce que le mutant hrR3 codait pour 434 a.a. de la R1,

et que ces acides aminés pouvaient avoir un rôle dans l'activité de la protéine, ICP-6 Δ a été construit. ICP-6 Δ possède une délétion de plus de 90% du gène codant pour la R1. Cette protéine ne possède pas d'activité réductase (Goldstein et Weller, 1988). Les études faites avec ces mutants ont démontré que la R1 n'est pas essentielle à la réplication du virus dans les cellules en division et que la RR cellulaire peut la substituer, mais qu'elle est essentielle à la croissance du virus dans les cellules non répliquatives, qu'elle est donc essentielle à la réactivation du virus en latence (Yamada et. al., 1991).

Les résultats décrits ci-haut ont permis de supposer que la sous-unité R1 avait un rôle supplémentaire dans le cycle viral, non relié à la réduction des ribonucléotides. La R1 est synthétisée à de hauts niveaux dans la cellule, en excès de la R2, mais n'est pas essentielle à la réplication du virus. Son patron d'expression lors de la réactivation est différent de celui du cycle lytique ; en effet, lors du cycle lytique, la R1 est exprimée de façon précoce (gènes E), alors que lors de la réactivation, la R1 est exprimée avec les gènes IE (Averett et.al., 1983). Ce patron d'expression de la R1, en absence d'expression de la sous-unité R2, laisse supposer un rôle additionnel de cette protéine dans la réactivation du virus.

1.3 L'apoptose

1.3.1 Généralités

Le maintien d'un nombre adéquat de cellules dans un tissu résulte d'un équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire de ce tissu. L'apoptose est un des processus biologiques les plus importants dans la régulation du développement, de la croissance et de la tumorigénèse. L'apoptose constitue une mort cellulaire programmée (Konopleva et al., 1999).

L'apoptose peut être décrite de la façon suivante : il y a perte des structures spécialisées de la cellule, comme les microvilli et les desmosomes, et la cellule se sépare de ses voisines. Ceci est suivi d'une phase de *blebbing* facilement visualisée au microscope. Ces « *blebs* » sont des extensions du cytosol qui ne contiennent pas d'organelles. Il y a par la suite condensation du cytoplasme, augmentation de la densité cellulaire, compaction des organelles cytoplasmiques et condensation de la chromatine. La cellule se divise en plusieurs corps apoptotiques, chacun contenant divers organelles. La cellule apoptotique à l'intérieur d'un tissu sera phagocytée par les cellules voisines ou par les cellules phagocytaires spécialisées. La cellule disparaît du tissu sans génération d'une réaction inflammatoire (Hengartner, 1998).

1.3.2 Induction de l'apoptose

Plusieurs types de dommages cellulaires induisent l'apoptose dont: les dommages à l'ADN, dont la réponse est généralement médiée par p-53 (Araki et.al., 1998). L'ADN peut être endommagé par plusieurs facteurs, entre autres, suite à une exposition aux radiations ionisantes qui provoquent des bris à l'ADN, aux rayons UV qui provoquent surtout la formation de dimères de pyrimidines, aux agents alkylants (Meikrantz et.al., 1998). Les dommages aux membranes peuvent également stimuler l'apoptose par génération de céramides (Blanchette-Mackie et Ladisch, 1999). Les dommages à la structure de la mitochondrie, ou une perte de potentiel membranaire peuvent également induire l'apoptose de la cellule (Heiden et.al., 1997). L'induction de l'activation des pro-caspases en caspases actives peut se faire de deux façons: par liaison d'un ligand à son récepteur et par la voie de la mitochondrie (Luo X. et.al., 1998).

1.3.3 Activation par liaison d'un ligand à son récepteur

Les récepteurs induisant l'apoptose font partie de la super-famille des récepteurs à TNF. Ces récepteurs contiennent des "*death domains*" qui stimulent l'apoptose de la cellule lors de l'association de leur domaine intracellulaire (Ashkenazi et Dixit, 1998).

1.3.4 Le TNF

Le TNF- α est une cytokine produite surtout par les macrophages activés. Le TNF- α peut amener des réponses très diverses à l'intérieur de la cellule. Sa liaison au récepteur peut résulter en la transcription de gènes régulant la croissance cellulaire, ou à l'opposé, peut résulter en l'activation de protéines contrôlant l'apoptose de la cellule (Malek, 1998).

Le TNF- α appartient à une famille de neuf ligands dont FasL fait partie. Ces ligands sont formés de trois chaînes polypeptidiques identiques. Les récepteurs TNF et Fas font partie d'une famille de 12 protéines transmembranaires, la super-famille des récepteurs du TNF (TNF-R). La plupart des réponses cellulaires au TNF sont médiées par TNFR-1 ou TNFR-2 qui sont exprimés de façon ubiquitaire. Ces récepteurs possèdent deux sous-unités identiques. A cause de la présence de motifs d'acides aminés riches en cystéines situés dans le domaine extracellulaire de liaison au ligand, ces récepteurs forment des contacts entre eux, permettant ainsi la formation de complexes multimériques. En absence de ligand, le récepteur est sous forme de dimère, alors que lors de la liaison du ligand trimérique à son récepteur, la conformation du récepteur est modifiée, permettant la transduction du signal au niveau intracellulaire. Il est à noter que certaines formes solubles de TNF-R1, TNF-R2 et Fas ont été identifiées (Malek, 1998).

TRAF-1 et TRAF-2 sont des protéines associées au récepteur TNF. Suite à la formation d'homodimères TRAF-2 ou d'hétérodimères avec TRAF-1, ces protéines se lient au récepteur TNF par leur domaine TRAF situé en C-terminal, alors que la transduction du

signal se fait par le domaine N-terminal (Wallach et.al., 1999). Suite à sa liaison au récepteur, le TNF active deux voies de signalisation, une menant à la transcription de gènes et à la prolifération cellulaire, et l'autre menant à l'apoptose de la cellule (Ledgewood et.al, 1999).

Le TNF peut causer l'apoptose des cellules endommagées ou des cellules traitées avec un inhibiteur de la synthèse protéique, mais n'a pas cet effet sur une cellule saine. Le TNF peut donc induire la synthèse de protéines qui empêchent le processus apoptotique (Malek, 1998).

Deux facteurs de transcription sont activés par le TNF, NF- κ B et AP-1. L'activation de NF- κ B se fait par phosphorylation de ses inhibiteurs (*I κ B*, *Inhibitors of κ B*) par un complexe de protéines kinases (Natoli et.al., 1998). NF- κ B libre est par la suite transloqué au noyau (Hsu et.al., 1996). AP-1 est sous forme homodimérique ou hétérodimérique avec Jun ou Fos (Malinin et.al., 1997). Ces deux facteurs de transcription activent la voie des MAP kinases (*mitogen activated protein*) menant à la transcription de gènes et à la prolifération cellulaire (Malinin et.al., 1997). Les membres de la famille C-IAP (*cellular inhibitor of apoptosis*) peuvent inhiber l'apoptose induite par le TNF par association aux hétérodimères TRAF-1/TRAF-2 (Rothe et.al., 1995).

La protéine TRIP (*TRAF interacting protein*) est capable de s'associer au complexe TNFR-TRAF par interaction avec TRAF-2 et inhiber l'activation de NF- κ B, activant ainsi la voie apoptotique (Lee et.al., 1997). La voie empruntée par la cellule en réponse à

la liaison de TNF à son récepteur sera déterminée par l'action des IAP ou des TRIP et par les protéines TRAF, mais le mécanisme exact déterminant la voie choisie reste à élucider (Malek et.al., 1998).

Le *death domain* est un motif responsable d'une interaction protéine-protéine présent dans le domaine intracellulaire du récepteur TNF et Fas et des protéines adaptatrices du récepteur (Wallach et.al, 1999). La protéine TRADD (*TNFR-1 associated death domain protein*) se lie au récepteur TNF par son propre *death domain* (Hsu et.al., 1996). L'association subséquente de TRADD à FADD (*Fas-associated protein with death domain*) est médiée par les *death domains* C-terminaux des deux protéines et amène l'apoptose de la cellule (Hsu et.al., 1996). TRADD ne peut toutefois pas se lier au *death domain* du récepteur Fas (Malek et.al., 1998). La protéine FADD (*Fas-associated protein with death domain*) est responsable de l'induction de l'apoptose par ce récepteur (Wallach et.al, 1999) (Boldin et.al., 1995).

1.3.5 Le récepteur Fas (CD-95)

La liaison de FasL à son récepteur résulte en l'agrégation de ses *death domains* intracellulaires, permettant le recrutement de protéines qui vont former avec ce dernier le DISC (*death-inducing signaling complex*). FADD se lie au récepteur par son propre *death domain* situé en C-terminal (Ashkenazi et Dixit, 1998).

1.3.6 Mécanismes effecteurs

La caspase 8 possède en N-terminal une région homologue au domaine *death effector* de FADD avec lequel elle interagit (Kischkel et.al., 1995). La caspase 8 activera par la suite les caspases effectrices (caspases 3, 6 et 7), induisant ainsi l'apoptose de la cellule (Ferrari et.al., 1998). Un des substrats préféré de la caspase 8 est Bid, une protéine cytoplasmique de la famille des protéines Bcl-2 (Luo et.al., 1998). Bid sera clivée par la caspase 8, et son domaine BH3 ira à la mitochondrie. Bid favorise le relarguage du cytochrome C de la mitochondrie vers le cytoplasme (Luo et.al., 1998). Cette voie permettrait une amplification du signal apoptotique mais l'apoptose induite par Fas peut se faire de façon indépendante de la mitochondrie en présence d'une quantité adéquate de caspase 8 active (Konopleva et.al, 1999). Une protéine nouvellement identifiée, toso, serait un régulateur négatif de l'apoptose médiée par FasL et empêcherait l'activation de la caspase 8 (Hitoshy et. al., 1998).

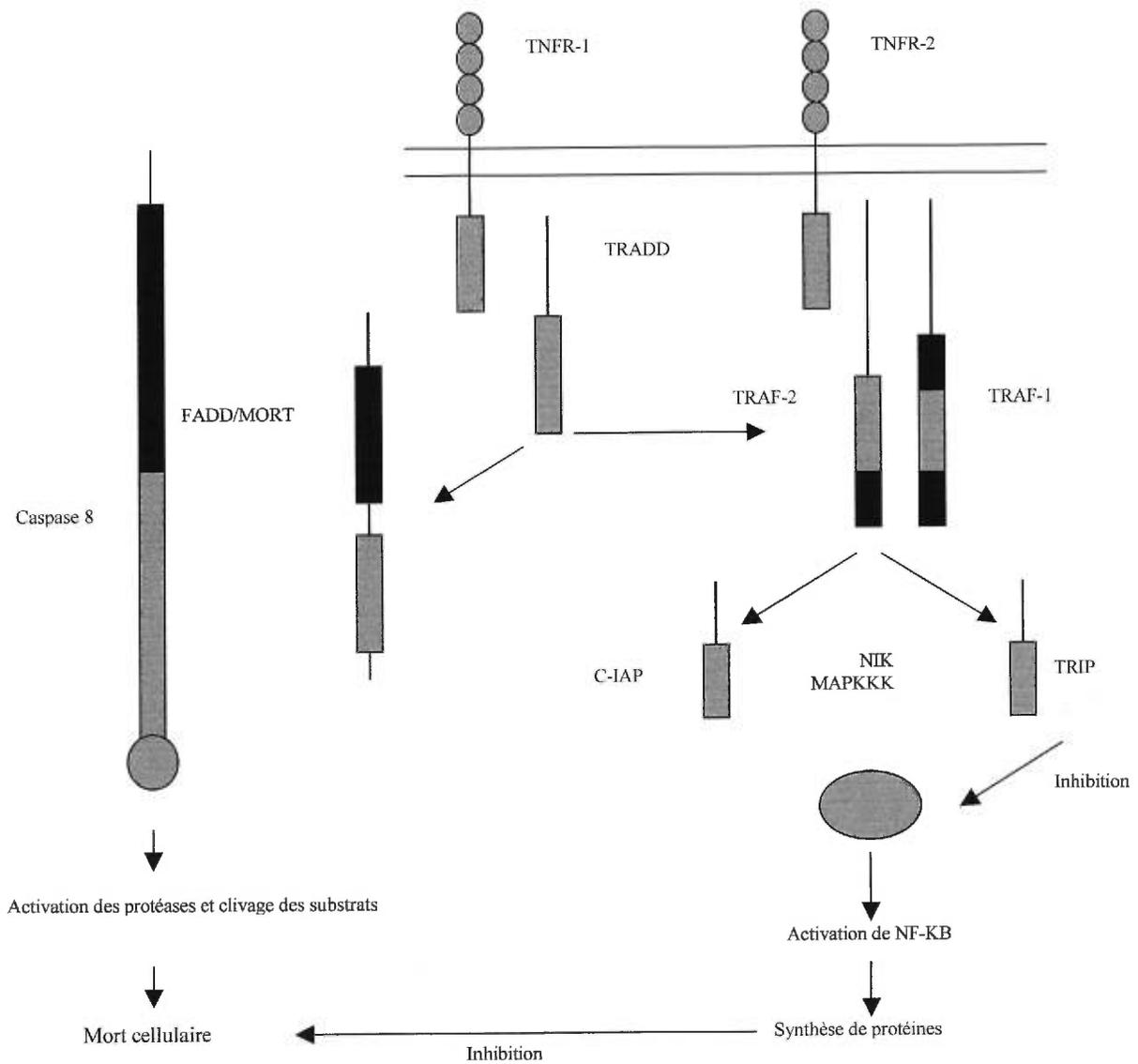


Figure 1: Protéines impliquées dans la transduction des signaux par TNFR.
(Molecular Mechanisms of TNF Receptor-Mediated Signaling, Malek et.al., 1998).

1.3.7 Les régulateurs de l'apoptose

Les membres de la famille Bcl-2 incluent des inhibiteurs et des inducteurs de l'apoptose. Ces protéines jouent un rôle central dans le contrôle de l'apoptose. Tous les membres de la famille Bcl-2 possèdent au moins un de quatre domaines conservés appelés Bcl-2 *Homology domains* (BH1 à BH4) (Adams et Corey, 1998). Tous les membres de la famille pouvant inhiber l'apoptose possèdent le domaine BH4, et certains possèdent les quatre domaines. On peut séparer en deux catégories les membres pro-apoptotiques : Bax, Bak et Bok possèdent les domaines BH1, BH2 et BH3 et ont le plus d'homologie avec Bcl-2, alors que Bik, Blk, Hrk, Bim, Bad et Bid ne possèdent que le domaine BH3, et à part ce domaine, ont peu d'homologie avec les autres membres. Le domaine BH3 est important pour la fonction pro-apoptotique (Konopleva et al., 1999).

Plusieurs de ces protéines peuvent former des homodimères ou des hétérodimères avec différentes protéines du groupe, et le ratio de dimères pro et anti-apoptotiques sera très important pour déterminer la susceptibilité de la cellule à l'apoptose. L'hétérodimérisation des protéines du groupe BH3 est nécessaire à l'activité pro-apoptotique, mais n'est pas nécessaire aux membres du groupe Bax (Adams et Corey, 1998).

Bcl-2 peut former des dimères avec Bax, Bcl-X_L, Bcl-X_S, Mcl-1 et Bad (Adams et Corey, 1998). Bcl-X_L est une protéine anti-apoptotique possédant des affinités de liaison

très similaires à celles de Bcl-2. Bcl-X_L peut former des dimères avec elle-même, avec Bcl-2, Bax, Bcl-X_S, Mcl-1, Bad et Bak (Adams et Corey, 1998).

Bcl-2 qui est localisée à la membrane externe de la mitochondrie est capable de réagir à un stress de celle-ci et d'induire l'efflux d'ions positifs vers le cytosol afin de maintenir le potentiel membranaire de la mitochondrie (Yang et.al., 1997). Bcl-2 et Bcl-X_L agissent également en liant directement Apaf-1 par leur domaine BH4, empêchant ainsi l'activation des caspases (Li et.al., 1997).

Les membres de cette famille possédant les domaines BH1 et BH2 agissent en formant des pores mitochondriaux formant des canaux ioniques. Bcl-2, Bcl-X_L et Bax sont capables de former ces pores (Green et Reed, 1998). La régulation de ces protéines se fait par différents mécanismes: les cytokines induisent la transcription des gènes anti-apoptotiques ainsi que l'inactivation de Bad, alors que Bax pourrait être induit par p-53 suite à un dommage à l'ADN (Han et.al., 1996).

La mitochondrie peut stimuler l'apoptose de la cellule suite au relargage du cytochrome C mitochondrial vers le cytosol (Yang et.al.,). En effet, suite à un stimulus apoptotique, la mitochondrie peut subir un déséquilibre de son potentiel membranaire (il a toutefois été démontré que l'induction de l'apoptose par la mitochondrie peut se faire sans aucune atteinte de la membrane ou du potentiel membranaire de la mitochondrie) (Scaffidi et.al., 1998). Les *Apoptotic Protease Activating Factors* (Apafs) responsables de l'activation de la caspase 3 incluent Apaf-2 (cyt. C), Apaf-1 (homologue de Ced-4) et la pro-caspase

9 (Lee et.al., 1997). Les domaines N-terminaux de la caspase 9 et de Apaf-1 contiennent un CARD (*Caspase Recruitment Domain*) qui permet leur interaction (Lee et.al., 1997). La caspase 9 forme un complexe avec Apaf-1 et le cyt.C. Le cyt. C initie l'apoptose en induisant la formation d'un complexe Caspase 9-Apaf-1 médié par leur domaine CARD (la réaction requiert également du dATP) (Lee et.al., 1997). Bcl-X_L interagit également avec Apaf-1 par liaison de son domaine BH4, inhibant ainsi l'activation de la caspase 9 (Green et Reed, 1998). Les IAP sont des inhibiteurs de l'apoptose. Ces protéines sont capables d'inhiber plusieurs membres de la famille des caspases (Konopleva et.al, 1999).

1.3.8 Les caspases

Les effecteurs de l'apoptose sont des cystéines protéases appelées caspases, qui clivent leurs cibles respectives dans la cellule. Les caspases peuvent être activées par deux mécanismes différents : l'activation d'une pro-caspase peut se faire par une caspase activée; les caspases effectrices sont en général activées de cette façon (caspase 3, 6 et 7) (Thornberry et Lazebnik, 1998). L'activation peut se faire également par auto-clivage, suite à l'agrégation de plusieurs molécules au même site, comme par exemple lors de l'activation d'un récepteur (caspase 8) (Thornberry et Lazebnik, 1998).

Les caspases sont responsables des changements morphologiques observés durant l'apoptose (Thornberry et Lazebnik, 1998). Les caspases ont entre elles des similarités de séquences, de structure et de spécificité de substrat. Ces pro-enzymes possèdent trois domaines, un domaine NH₂ terminal, une grande sous-unité et une petite sous-unité.

L'activation se fait par protéolyse entre les domaines, suivie d'une dimérisation de la petite et de la grosse sous-unité. Les caspases sont très spécifiques et clivent toujours après un acide aspartique. La préférence de substrat de chaque caspase est déterminée par un motif de quatre acides aminés situé en N-terminal de l'acide aspartique (Thornberry et.al., 1997).

Parmi les cibles des caspases, on retrouve : l'inactivation des protéines impliquées dans la protection des cellules contre l'apoptose, l'inactivation des régulateurs négatifs de l'apoptose, le désassemblage des structures cellulaires, l'inactivation des protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette, l'inhibition de la réplication de l'ADN, et la destruction des structures cellulaires et nucléaires (Thornberry et Lazebnik, 1998).

La régulation des caspases se fait par des molécules activatrices et inhibitrices. Suite à l'activation des caspases initiatrices, les caspases effectrices vont être activées. Deux caspases activatrices ont des voies d'activation différentes, la caspase 8 est activée suite à l'association des *Death Domains* de différents récepteurs, par liaison de son *death effector domain* au *death effector domain* du récepteur (Boldin et.al., 1996), alors que l'activation de la caspase 9 requiert son association à Apaf-1 par son domaine CARD, et requiert le cytochrome C et du dATP (Lee et.al., 1997). L'inhibition de l'activation des caspases se ferait par des protéines IAP (*Inhibitors of Apoptosis*) qui agiraient comme régulateurs négatifs de l'amplification du signal pro-apoptotique par les caspases effectrices (Uren et.al., 1998).

1.4 Le contrôle de l'apoptose par les virus

L'apoptose des cellules infectées par un virus peut être induite par les cellules cytotoxiques activées lors de la réponse immunitaire, ou peut résulter directement de l'infection virale (Tschopp et al., 1998). Plusieurs virus ont donc développé des moyens de retarder ou d'empêcher l'apoptose pour permettre la production d'un nombre élevé de particules virales.

1.4.1 Inhibition des caspases

Certains virus ont développé des moyens d'interférer avec l'activité des caspases. CrmA (*Cytokine Response Modifier A*), une protéine du cowpox virus, possède des séquences homologues à plusieurs caspases, et inhibe fortement l'activation des caspases 1 et 8, et plus faiblement, l'activation d'autres caspases (Zhou et al., 1997).

Le baculovirus code pour deux protéines pouvant inhiber l'activation des caspases, p35 et IAP (*Inhibitor of Apoptosis*). p35 contient des séquences qui agissent comme substrats de plusieurs caspases, et après clivage, génère un fragment qui est un inhibiteur irréversible (Bump et al., 1995). Un des homologues cellulaires de IAP chez l'humain interagit avec TRAF2 (Rothe, 1995), une protéine du complexe de signalisation du récepteur TNF, et un autre, X-IAP, interagit avec les caspases 3 et 7 et empêche leur activation (Devereaux et al., 1997).

1.4.2 Les homologues de Bcl-2

Certaines protéines virales sont des homologues des membres de la famille Bcl-2. Le HVS (herpesvirus saimiri), le EBV (Epstein Barr virus), et l'adenovirus sont tous des virus codant pour des protéines homologues à Bcl-2, capables d'empêcher l'apoptose (Nava et.al., 1997) (Kawanishi et.al., 1997) (Henderson et.al., 1993). Comparativement à leur homologue cellulaire, ces protéines virales sont plus courtes, ne possèdent pas de domaine BH4, et n'ont pas de séquence permettant l'ancrage à la membrane mitochondriale (Huang et.al., 1997).

1.4.3 L'apoptose induite par un récepteur

Les FLIPs (*fllice inhibitory proteins*) sont des protéines pouvant bloquer l'apoptose induite par un récepteur. Les FLIPs cellulaires se lient au DED (*Death Effector Domain*) de FADD et FLICE (caspase 8) et empêchent ainsi l'activation des caspases (Thome et.al., 1997). L'homologue viral des FLIPs est retrouvé chez HHV-8 (human herpesvirus), EHV-2 (equine herpesvirus), HVS (herpesvirus saimiri), BHV-4 (bovine herpesvirus) et le poxvirus (Tschopp et.al., 1998).

1.4.4 Sécrétion de récepteurs à cytokines

Le myxoma virus code pour un homologue du TNFR-2, qui bloque l'activité du TNF (Schreiber et.al., 1997).

1.4.5 Inhibiteurs ne possédant pas d'homologue cellulaire

Certains adénovirus, les papillomavirus et les polyomavirus codent pour des protéines pouvant empêcher, par différentes stratégies, l'apoptose induite par p53. Ces protéines interagissent avec certains régulateurs du cycle cellulaire et peuvent stimuler la synthèse d'ADN (Levine, 1997).

L'induction précoce de l'apoptose dans une cellule infectée par un virus limiterait la production de particules virales et empêcherait la dissémination du virus. L'acquisition de gènes codant pour des protéines qui peuvent moduler la cascade apoptotique résulte en un avantage certain pour le virus, en permettant un meilleur taux de réplication (Tschopp et.al., 1998).

1.5 Objectifs de la recherche

Les buts de mes travaux étaient de déterminer le rôle du domaine NH₂ de la R1 dans le contrôle de l'apoptose, ainsi que d'identifier la/les cibles (s) cellulaires de la protéine R1 permettant de bloquer l'apoptose. A cause de la présence de l'extension de 350 acides aminés à l'extrémité NH₂ de la R1 du HSV, l'hypothèse a été émise que ce domaine était responsable de la protection contre l'apoptose. Cette hypothèse a été testée avec différents adénovirus recombinants codant pour différents segments du domaine NH₂ de la R1. Les résultats obtenus par infection de cellules avec ces recombinants ont démontré que ce domaine n'était pas suffisant à la protection des cellules contre l'apoptose.

Par immunobuvardage, il a été démontré que la R1 empêche le clivage de la caspase 8, bloquant ainsi le processus apoptotique, par une interaction directe avec la caspase 8, ou par une interaction avec les protéines en amont de celle-ci dans la cascade apoptotique.

Section II

Matériel et Méthodes

Section II

Matériel et méthodes

2.1 Culture cellulaire

Les cellules A-549, utilisées pour les essais de protection contre l'apoptose, sont d'origine épithéliale pulmonaire humain. Ces cellules ont été maintenues dans du milieu contenant 30 µg/ml de phléomycine pour permettre le maintien de la sélection des cellules exprimant des niveaux élevés et inductibles du transactivateur tTa. Les cellules A549tTa, BMAD 7842 et 220-8 ont été maintenues dans du milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau foetal. Les cellules 293, dérivées de cellules de rein embryonnaire humain ont été maintenues dans du milieu DMEM contenant 5% de sérum de veau foetal dont le complément a été inactivé par un traitement thermique de 30 min. à 65°C. Les cellules ont été maintenues en incubateur à 37°C, à 5% de CO₂.

2.2 Essais de protection contre l'apoptose des adénovirus recombinants

AdTR5R1, AdTR5NH₂GFP, AdTR5NH₂ A et AdTR5NH₂ C

Les virus utilisés pour les essais de protection sont les adénovirus recombinants AdTR5R1, qui exprime la sous-unité R1 de la ribonucléotide réductase du HSV, AdTR5R1(Δ2-357), qui exprime une protéine R1 tronquée de ses 357 acides aminés N-terminaux, AdTR5NH₂GFP, qui exprime une protéine de fusion formée des 357 acides aminés N-terminaux de la R1 liés au N-terminal de la GFP, AdTR5NH₂ A qui exprime

les 398 acides aminés N-terminaux de la R1et AdTR5NH₂ C, qui exprime les 496 acides aminés N-terminaux de la R1. Tous les adénovirus utilisés ont une délétion des gènes des régions E1 et E3 qui sont essentielles à la réplication du virus. Ils sont donc non-réplicatifs dans les cellules utilisées pour les essais de protection. L'expression des protéines d'intérêt du virus herpes dans des cellules exprimant le transactivateur tTa a permis d'obtenir des niveaux élevés et inductibles de la protéine. Le recombinant adénovirus AdCMVFasL, exprime FasL humain sous le contrôle du promoteur CMV.

2.2.1 Ensemencement des cellules

Les cellules A549tTa ont été lavées au PBS, trypsinisées, et comptées à l'aide d'un hémacytomètre. Les cellules ont été ensemencées dans des boîte de culture tissulaire de 60 mm à une densité de 1×10^6 cellules par boîte.

2.2.2 Infection des cellules

Vingt-quatre heures après l'ensemencement, les cellules ont été comptées à nouveau. Une quantité variant de 5 à 50 p.f.u. (plaque forming unit) par cellule a été utilisée selon les expériences. Le volume de solution virale correspondant à la m.i. a été ajouté à 2 ml de milieu de culture DMEM contenant 10% de sérum de veau foetal, la solution a été agitée avec vortex durant 15 sec, puis ajoutée aux cellules. L'adsorption du virus s'est faite en incubateur durant 7 h avec agitation des boîtes de culture tissulaire sur agitateur.

2.2.3 Induction de l'apoptose

Suite à l'adsorption du virus, la solution virale a été aspirée et les différents inducteurs de l'apoptose ont été ajoutés aux boîtes de culture tissulaire :

Induction de l'apoptose par la R1Δ: Les cellules ont été infectées à nouveau, cette fois, avec AdTR5R1(Δ2-357). L'adsorption du recombinant AdTR5R1(Δ2-357) s'est faite à l'incubateur durant 18 h avec agitation des boîtes de culture tissulaire.

Induction de l'apoptose par TNF : 2,5 ng/ml de TNF et 30 µg/ml de cycloheximide ont été ajoutés à du milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau foetal. 2 ml de la solution ont été ajoutés aux boîtes de culture tissulaire. L'incubation s'est faite durant 18 h avec agitation des boîtes.

Induction de l'apoptose par FasL : Les cellules ont été infectées à nouveau, cette fois avec l'adénovirus recombinant AdCMVFasL, à une m.i. de 40 p.f.u. par cellule. L'adsorption du virus s'est faite durant 18 h avec agitation de la boîte de culture tissulaire.

Pour tous les essais de protection contre l'apoptose, des cellules infectées avec l'adénovirus recombinant AdTR5R1 ont été utilisées comme contrôle positif. Les cellules ont été infectées avec AdTR5R1 aux mêmes m.i. que les m.i. utilisées pour les adénovirus recombinants testés.

2.2.4 Quantification de l'apoptose

La quantification de l'apoptose s'est faite au microscope à contraste de phase à un grossissement 400X. Le taux d'apoptose a été évalué en comptant à l'intérieur d'un champs, le nombre de cellules ayant un aspect apoptotique (cellule non accolée, réfringente, arrondie) et le nombre de cellules ayant un aspect normal. Trois champs choisis de façon aléatoire ont été comptés pour chaque boîte de culture tissulaire. Le pourcentage d'apoptose a été évalué en divisant le nombre de cellules apoptotiques par le nombre de cellules totales.

2.3 Récolte des cellules

Les cellules ont été trypsinisées et centrifugées à 1 500 rpm durant 5 min. Le surnageant a été aspiré et les cellules lavées au PBS et centrifugées deux fois. Les cellules ont été mises dans 125 µl de tampon d'extraction contenant 62,5 mM Tris, 8 M urée, 2% SDS. Les cellules ont été ensuite soniquées à 4° C, 5 fois durant 10 sec avec une période de repos de 10 sec entre chaque sonication.

2.4 Analyse des protéines

Les extraits de protéines ont été dosés avec un ensemble commercial de BIO-RAD. 10 µg de chacun des extraits ont été par la suite mis sur gel de polyacrylamide 9% et les protéines ont été séparées par électrophorèse. Les protéines ont ensuite été transférées sur membrane de nitrocellulose. Pour l'immunobuvardage, les sites de liaison non spécifiques ont été bloqués avec une solution commerciale, Superblock de Pierce, durant 30 min. L'anticorps primaire a été ajouté à la dilution appropriée, et incubé avec agitation durant 60 min. La membrane a été lavée 3 fois durant 10 sec, puis 3 fois durant 5 min avec une solution PBS Tween 20 0,2%. L'anticorps secondaire couplé à la horseradish peroxidase a été ajouté et incubé durant 60 min avec agitation. La membrane a été à nouveau lavée 3 fois durant 10 sec, puis 3 fois durant 5 min. La membrane a été par la suite incubée avec le réactif commercial Super Signal de Pierce, dilué 1 :10 dans la solution PBS-Tween 20 durant 30 min. La membrane a ensuite été exposée à un film. Les différents anticorps ont été utilisés aux dilutions suivantes : pour la détection de la R1, l'anticorps polyclonal 168R1 a été utilisé à une dilution (1 :25 000). Cet anticorps a été produit au laboratoire par injection à des lapins de la protéine R1 purifiée (Langelier et.al., 1998). L'anticorps 932 est un anticorps monoclonal qui reconnaît un épitope situé dans le domaine NH₂ de la R1. Cet anticorps a été utilisé à une dilution (1 :10 000). L'anticorps anti-Parp (poly-ADP-ribose Polymerase) est un anticorps monoclonal d'origine commerciale (Calbiochem), utilisé à une dilution (1 :750). L'anticorps anti-caspase 8 est un anticorps monoclonal fourni par Marcus Peter, et utilisé à une dilution (1 :25 000) (Scaffidi et.al., 1997). Les anticorps secondaires utilisés sont des anticorps de

chèvre anti-lapin couplés à la horseradish peroxidase d'origine commerciale (Amersham Corp.) ou des anticorps IgG de chèvre anti-souris couplés à la horseradish peroxidase d'origine commerciale (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.). Ces deux anticorps ont été utilisés à la dilution (1 :100 000).

2.5 Construction des adénovirus recombinants NH₂ A et NH₂ C et purification de NH₂GFP

Nous avons utilisé les cellules 293 pour la production des différents virus recombinants. Ces cellules expriment les gènes des régions E1 et E3 de l'adénovirus. Cette complémentation permet la réplication du virus dans ces cellules et permet d'obtenir des titres viraux élevés.

Les cellules 293 ont été mises en culture dans des boîtes de culture tissulaire de 100 mm à une confluence de 2×10^6 cellules par boîte, dans du milieu DMEM + 5% de sérum de veau foetal dont le complément a été inactivé par un traitement thermique.

2.5.1 Transfection des cellules

Les plasmides contenant les fragments NH₂ A et NH₂ C (NH₂ A :391 a.a., NH₂ C : 489 a.a.) ont été linéarisés avec *Fse I*, purifiés dans une solution 1 :1 de phénol-chloroforme, puis précipités dans 2,5 volume d'éthanol 100%. 5 µg d'ADN plasmidique ont été mélangés à 5 µg de l'ADN viral Ad5ΔE1 /ΔE3 (don de B. Massie, Institut de Recherche

en Biotechnologies, Montréal) et transfectés sur les cellules par la méthode calcium-phosphate (Cambrook et.al., 1989).

Après une incubation de 18 h le précipité a été aspiré et les cellules ont été lavées au PBS. Les cellules ont ensuite été trypsinisées et mises en culture dans un ratio 1 :3 de cellules transfectées et de cellules non transfectées à une confluence de 1×10^6 cellules par boîte de culture tissulaire. Cette dilution permet d'obtenir des plages de lyse isolées les unes des autres, ce qui facilite le prélèvement. 24 h après l'ensemencement, 6 ml d'une solution 1 :5 d'agarose commercial Seeplaque et de milieu DMEM enrichi de 5% de sérum de veau foetal (dont le complément a été inactivé par un traitement thermique) a été ajouté aux cellules. Les boîtes de culture tissulaire ont été mises en incubateur pour une période de 14 jours, qui est le temps requis pour obtenir des plages de lyse assez grandes pour être prélevées.

2.5.2 Prélèvement des plages de lyse

Les boîtes de culture tissulaire ont été observées au microscope à fluorescence et 5 plages de lyses de NH₂ A et 2 plages de NH₂ C présentant l'expression de la GFP ont été prélevées par aspiration avec une micropipette P200. Le contenu de la micropipette a été mis dans 1 ml de milieu de culture.

2.5.3 Amplification du virus

300 μ l de la solution virale ont été déposés sur $1,5 \times 10^6$ cellules 220-8 et incubés durant 7 h avec agitation des boîtes de culture tissulaire. L'utilisation de ces cellules permet de réduire le nombre de révertants viraux qui peut apparaître lors de l'amplification. 3,7 ml de milieu DMEM enrichi de 10% de sérum de veau foetal ont été ajoutés et les boîtes de culture tissulaire ont été incubées jusqu'à C.P.E. complet (Complete Pathologic Effect). Les boîtes de culture ont été congelées-décongelées 2 fois pour permettre le relâchement des virions. Le contenu des boîtes a ensuite été centrifugé à 5 000 rpm durant 5 min pour éliminer les débris cellulaires. La solution virale a ensuite été récoltée en aliquots de 1 ml, et congelée à -80°C .

2.5.4 Criblage des clones prélevés

Des plaques de 6 puits ont étéensemencées avec des cellules 293 TetOn à une confluence de 5×10^5 cellules par puit. 24 h plus tard, 200 μ l de la solution virale ont été ajoutés aux cellules et les boîtes de culture tissulaire ont été incubées durant 7 h avec agitation. 800 μ l de milieu DMEM enrichi de 10% de sérum et 1 $\mu\text{g/ml}$ de doxycycline ont été ajoutés aux cellules et les cellules ont été incubées jusqu'au lendemain. Les cellules ont ensuite été récoltées tel que décrit ci-haut, les protéines ont été extraites, dosées et mises sur gel de polyacrylamide. Suite au transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose, un immunobuvardage avec l'anticorps 932, qui reconnaît un épitope contenu dans le

domaine NH₂ a permis de faire la sélection des clones ayant la plus forte expression des protéines NH₂ A et NH₂ C.

2.5.5 Seconde amplification du virus

Les clones sélectionnés ont été amplifiés une seconde fois. Des cellules 220-8 ont étéensemencées à une confluence de 5×10^6 cellules par boîte dans des boîtes de culture tissulaire de 150 mm. 24 h plus tard, 400 µl de solution virale ont été ajoutés aux boîtes. Après 7 h d'adsorption, 4,6 ml de milieu ont été ajoutés aux cellules, et les cellules ont été incubées jusqu'à C.P.E. complet. Les boîtes de culture ont ensuite été congelées-décongelées 2 fois pour permettre le relâchement des virions. Le contenu des boîtes de culture a été centrifugé à 5 000 rpm durant 5 min pour éliminer les débris cellulaires. Les solutions virales ont ensuite été aliquotées dans des tubes de 1 ml.

2.5.6 Titrage du virus

1×10^6 cellules BMAD-7842 ont étéensemencées dans des boîtes de culture tissulaire de 60 mm. Une cellule infectée produit généralement entre 10 et 1 000 particules virales avant la lyse. Un titre approximatif a donc été évalué entre 10^7 et 10^{10} p.f.u. par ml. Des dilutions sériées des solutions virales ont été préparées dans du milieu DMEM enrichi de 10% de sérum. 20 µl de la solution virale ont été ajoutés à 1,98 ml de milieu pour obtenir la première dilution, 10^{-2} . La solution a été agitée par vortex 3 fois durant 15 sec. 200 µl de la solution 10^{-2} ont été ajoutés à 1,80 ml de milieu pour obtenir la dilution 10^{-3} . La

solution a été agitée par vortex 3 fois durant 15 sec. Cette même étape a été répétée jusqu'à la dilution 10^{-12} . 500 μ l des dilutions 10^{-7} à 10^{-12} ont été mis sur les cellules et celles-ci ont été incubées durant 7 h avec agitation des boites de culture. La solution virale a été aspirée et un volume de 4 ml d'une solution 1 :5 d'agarose commercial Seeplaque et de milieu DMEM + 10% de sérum a été déposé sur les cellules. Le compte des plages de lyse après une période d'incubation de 10 jours a permis de déterminer le titre viral.

2.6 Immunofluorescence

3×10^5 cellules A549 tTa ont été mises en culture dans des plaques de 6 puits contenant chacun une lamelle stérile. Les cellules ont ensuite été infectées avec 25 p.f.u. par cellule mélangés à 1 ml de milieu et incubées pour 7 h avec agitation de la boite de culture tissulaire. La solution virale a ensuite été aspirée et 2 ml de milieu frais ont été ajoutés aux boites. Les boites de culture ont été remises à incuber jusqu'au lendemain.

Les cellules ont été lavées 2 fois au PBS, puis 1 ml d'une solution de paraformaldéhyde 3,7% a été ajouté à chaque puit, et une incubation de 10 min a été faite à la température ambiante. La solution de paraformaldéhyde a été aspirée et les cellules ont été lavées au PBS 2 fois 10 sec et 2 fois 5 min. Les cellules ont ensuite été perméabilisées avec 1 ml de méthanol à -20°C durant 10 min. Les cellules ont été lavées 2 fois 10 sec. et deux fois 5 min avec du PBS. Un dernier lavage de 5 min. a été fait avec du PBS Tween 80 0,05%.

10 μ l d'anticorps 932 dilué 1 :100 a été déposé sur les lamelles et laissé à incuber durant 30 min en milieu humide. Les lamelles ont ensuite été lavées 3 fois au PBS durant 5 min. 10 μ l de l'anticorps secondaire anti-souris ont ensuite été ajoutés à une dilution 1 :100 et incubés pour 30 min à l'obscurité. Les lamelles ont été lavées 3 fois au PBS durant 5 min, puis ont été scellées sur lame.

2.7 Essai d'activité caspase

Pour mesurer l'activité caspase 8, la trousse commerciale ApoAlert™ de Clontech (ApoAlert Caspase Fluorescent Assay kit) a été utilisé. Les cellules ont été récoltées dans du tampon de lyse et mis sur glace pour 10 min. Les extraits ont été centrifugés durant 3 min à 12 000 rpm. L'activité enzymatique a été déterminée par incubation de 60 μ g d'extraits protéiques avec 50 μ M de substrat couplé à IEDT-7-amino-4-trifluorométhyl coumarin (AFC). Le taux de clivage du substrat a été évalué à l'aide d'un fluoromètre (Cytofluor, Perceptive Biosystem). La quantification de AFC libre a été faite en utilisant l'étalon fourni avec l'ensemble commercial.

Section III

Résultats

Section III

Résultats

Résultats – Partie 1

3. Essais de protection contre l'apoptose des adénovirus recombinants

R1, NH₂GFP, NH₂ A et NH₂ C

3.1 Protection contre l'apoptose par la protéine R1

Dans le but de connaître le rôle du domaine NH₂ de la protéine R1, la protéine a été déléetée de ce domaine et l'adénovirus recombinant AdTR5R1(Δ 2-357) a été construit. Il a été démontré que l'expression de cette protéine tronquée induisait l'apoptose des cellules, d'où l'hypothèse que le domaine NH₂ avait des propriétés anti-apoptotiques (Langelier et.al., 2000). Il a été démontré par la suite que la protéine R1 protégeait les cellules contre l'apoptose induite par la R1 Δ et par le TNF (Langelier et.al., 2000). Nous avons répété ces expériences de protection dans les conditions qui suivent.

Des cellules A549tTa ont été infectées avec AdTR5R1 à 25 p.f.u. par cellule pour une période de 7 h. L'apoptose a par la suite été induite avec cycloheximide ou cycloheximide et TNF. Nous avons quantifié l'apoptose 18 h plus tard. L'évaluation du pourcentage d'apoptose a été faite par observation au microscope. A l'intérieur d'un champ microscopique, le nombre de cellules acollées et de cellules décollées est déterminé. Les pourcentages de protection contre l'apoptose représentent la moyenne du rapport cellules acollées/cellules totales de trois champs microscopiques différents.

A la figure 2A, la boîte de culture contrôle de la série Mock (boîte contenant des cellules non-infectées, mais ayant été placées dans les mêmes conditions de culture que les cellules infectées) est constitué à plus de 90% de cellules accolées. Les cellules de la boîte de culture contrôle de la série R1 ont une apparence très similaire, démontrant que l'infection par AdTR5R1 à ce nombre de p.f.u. ne représente aucune toxicité pour les cellules. Dans les boîtes contenant de la cycloheximide, quelques cellules flottant dans le milieu et ayant une forme arrondie sont dénombrables. Dans la boîte contrôle contenant CHX et TNF de la série Mock (cellules non-infectées), plus de 90% des cellules ont une morphologie apoptotique. Dans la boîte contenant des cellules infectées avec la R1 et contenant CHX et TNF, les cellules sont accolées et normales à plus de 90%, démontrant la protection de cette protéine contre l'apoptose induite par le TNF.

Suite à la quantification de l'apoptose, les cellules ont été récoltées et un immunobuvardage a été fait avec un anticorps anti-PARP. A la figure 2B, une bande est visible à 116 kDa dans la ligne Mock (cellules non-infectées), et aucune bande n'est visible à 89 kDa, indiquant une absence de clivage de PARP. Dans la ligne contenant CHX et TNF, la forme 116 kDa n'est pas détectable, alors qu'une bande est présente à 89kDa, indiquant que PARP se retrouve sous sa forme clivée dans cet extrait. Dans la ligne R1 contenant CHX et TNF, la protéine est retrouvée principalement sous sa forme non clivée, à 116 kDa indiquant une absence du processus apoptotique.

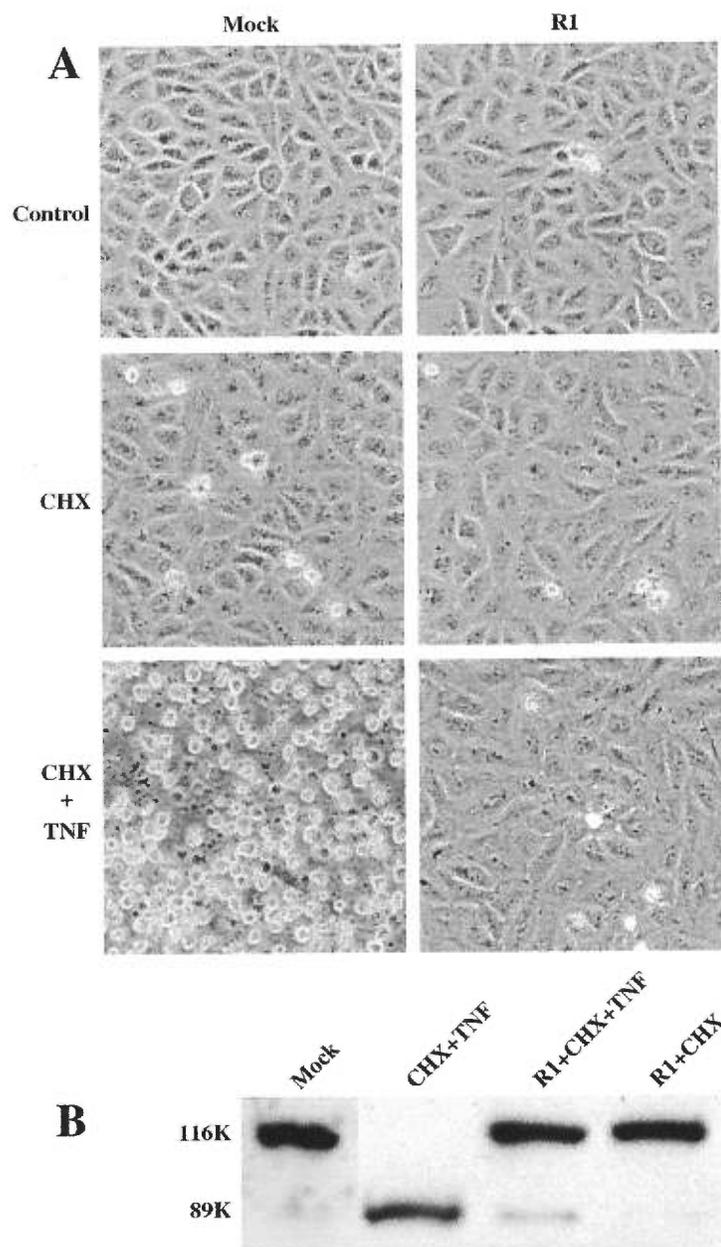


Figure 2 : Protection par la R1 de la RR contre l'apoptose induite par le TNF.

A: Les cellules ont été infectées avec AdTR5R1 à 25 p.f.u. par cellule pour une période de 7 h. Le cycloheximide a été ajouté à une concentration de 30 µg/ml. Le TNF a été ajouté à une concentration de 2,5 ng/ml.

B : 10 µg d'extraits protéiques ont été séparés sur gel de polyacrylamide, puis transférés sur membrane de nitrocellulose. L'immunobuvardage a été fait avec une dilution 1 :750 d'anticorps anti-Parp, puis avec une dilution 1 :100 000 d'anticorps secondaire anti-souris lié à la horseradish peroxydase. Le film a été exposé à la membrane pour une période de 60 sec.

Des expériences ont par la suite été effectuées pour tester l'efficacité de protection de la R1 contre l'apoptose induite par FasL (fig. 3). Ces expériences ont été faites en absence de CHX, permettant ainsi d'évaluer l'efficacité de protection de la R1 dans des conditions se rapprochant plus des conditions physiologiques. La protéine FasL est exprimée par un adénovirus recombinant, AdCMVFasL. La quantification de l'apoptose a été faite à différents temps post-infection. Dans la boîte de culture contrôle contenant du FasL, le pourcentage d'apoptose a augmenté avec le temps, pour atteindre 90% après 75 heures. Dans la boîte R1 contenant du FasL, le pourcentage d'apoptose a atteint un maximum de 20% après 75 heures, démontrant que la R1 avait un effet protecteur contre l'induction de l'apoptose par FasL. Dans la boîte R1 contenant du FasL et de la doxycycline, le pourcentage d'apoptose a augmenté de façon très similaire au contenu de la boîte contrôle contenant du FasL. L'ajout de doxycycline démontre que la protéine R1 est responsable de la protection. En effet, l'ajout au milieu de culture de doxycycline, un analogue de la tetracycline, inhibe la transcription de la protéine R1 dans ces cellules qui sont tTa.

La R1 protège les cellules contre FasL

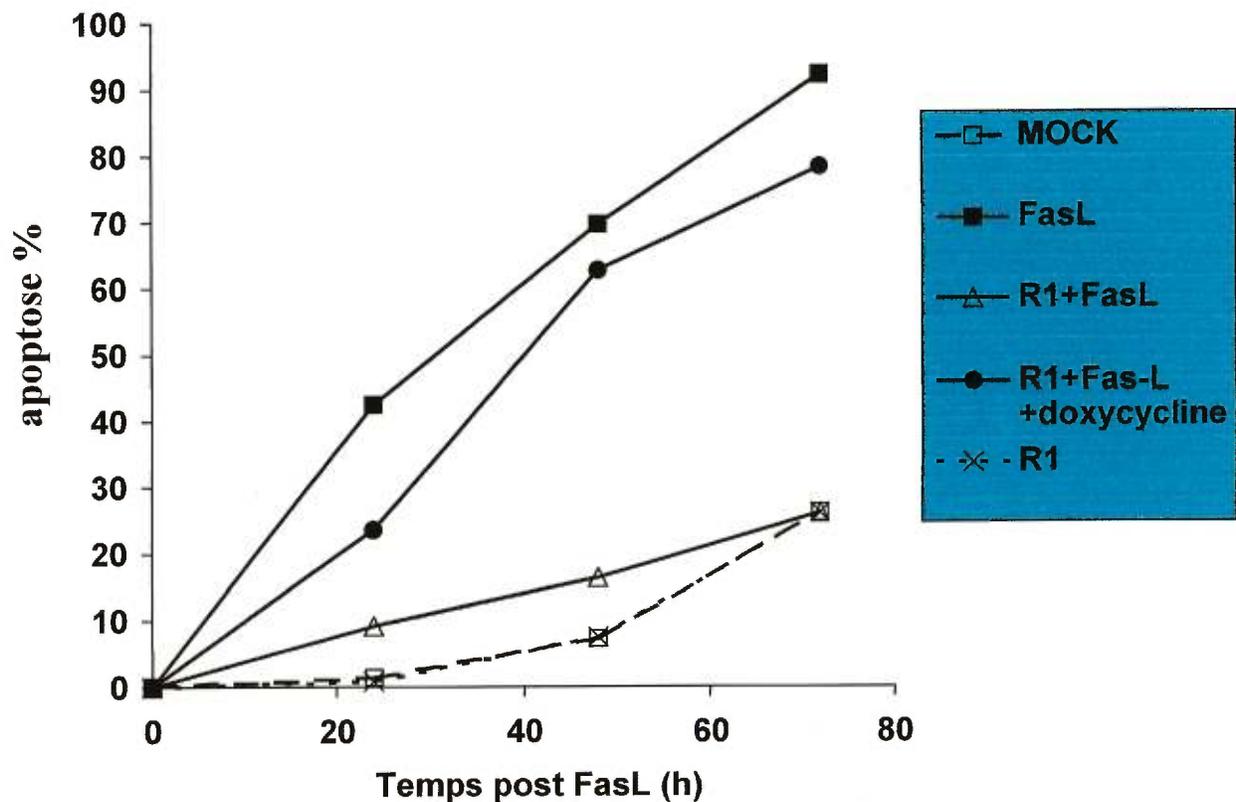


Figure 3 : La R1 protège les cellules contre FasL.

La série Mock représente des cellules non-infectées, mais ayant été placées dans les mêmes conditions de culture que les cellules infectées. Les cellules A549tTa ont été infectées avec AdTR5R1 pour une période de 7 h. Dans la boîte R1 + doxycycline, la doxycycline a été ajoutée au moment de l'infection avec AdTR5R1 à une concentration de 3 µg/ml. L'apoptose a par la suite été induite par infection avec AdCMVFasL à 40 p.f.u. par cellule pour les périodes de temps indiquées.

Suite à la démonstration que la R1 protégeait efficacement contre l'induction de l'apoptose par le TNF et par FasL, il était important de déterminer quelle partie de la protéine était responsable de cette propriété. A cause de la présence de l'extension de 350 acides aminés à l'extrémité NH₂ de la R1 du HSV, l'hypothèse a été émise que ce domaine était responsable de la protection contre l'apoptose. Cette hypothèse a été testée avec différents adénovirus recombinants codant pour différents segments du domaine NH₂ de la R1.

3.2 Essai de protection contre l'apoptose par NH₂GFP

Le premier virus recombinant testé pour ses propriétés anti-apoptotiques a été le AdTR5NH₂GFP. Ce vecteur adénovirus exprime une protéine dénommée NH₂GFP, qui est une protéine de fusion formée des 357 a.a. N-terminaux de la R1 liés à l'extrémité NH₂ de la GFP. Trois différents inducteurs de l'apoptose ont été testés pour vérifier si la protéine NH₂GFP avait un effet protecteur : le CHX et TNF- α , la R1 Δ et FasL. Des cellules infectées avec la R1 ont servi de contrôle positif, l'effet protecteur de cette protéine contre l'apoptose induite par ces trois inducteurs ayant été démontré.

Les résultats obtenus avec le TNF sont présentés à la figure 4. Dans la boîte de culture Mock (boîte contenant des cellules non-infectées, mais ayant été placées dans les mêmes conditions de culture que les cellules infectées), plus de 90% des cellules étaient accolées. Des cellules ont été infectées avec AdTR5R1, AdTR5NH₂GFP et co-infectées avec AdTR5 R1 et AdTR5 NH₂GFP sans ajout d'inducteur de l'apoptose, pour assurer que l'infection par ces recombinants viraux ne causait aucune toxicité cellulaire.

Dans ces boîtes culture, de même que dans le contrôle Mock (cellules non-infectées), la majorité des cellules était accolée. Dans la boîte contrôle contenant CHX et TNF, la plupart des cellules étaient décollées et flottaient dans le milieu de culture. Seulement quelques cellules accolées pouvaient être comptées à l'intérieur d'un champ, et dans certains champs, elles étaient complètement absentes. Dans la boîte R1 contenant CHX et TNF, le pourcentage de cellules accolées a été évalué à plus de 75%, ces cellules étaient accolées et avaient une morphologie semblable à celles du Mock. La boîte NH₂GFP contenant CHX et TNF avait une apparence très similaire à la boîte contrôle contenant CHX et TNF, la plupart des cellules étant décollée et en processus d'apoptose. Dans la boîte de culture contenant des cellules co-infectées avec AdTR5R1 et AdTR5NH₂GFP, le pourcentage de cellules vivantes a été évalué à plus de 70%.

Absence de protection par NH₂GFP

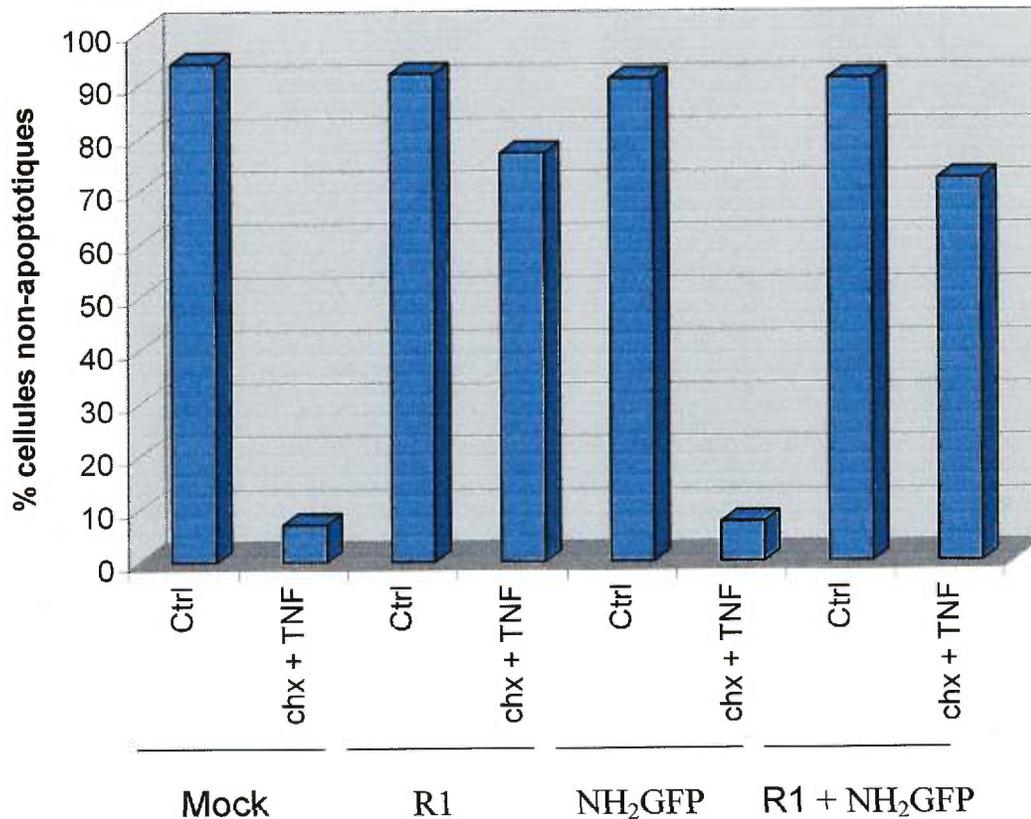


Figure 4 : Absence de protection par NH₂GFP contre l'apoptose induite par le TNF. Les cellules A549tTa ont été infectées avec les recombinants AdTR5NH₂GFP et AdTR5R1 à 25 p.f.u. par cellule pour une période de 7 h. L'apoptose a par la suite été induite par ajout de cycloheximide (30 µg/ml) et TNF-α (2,5 ng/ml). Les résultats ont été compilés après une période de 18 h et représentent le pourcentage de cellules accolées, calculé en divisant le nombre de cellules vivantes comprises dans un champ microscopique par le nombre de cellules totales.

Des essais de protection contre l'apoptose induite par la R1 Δ et par FasL ont également été faits. Ces résultats sont présentés à la figure 5.

Dans la boîte de culture tissulaire contenant des cellules infectées par AdTR5R1(Δ 2-357) (Fig. 5A), le pourcentage d'apoptose a été évalué à 40%. La protection par la R1 contre l'apoptose induite par la R1 Δ était très élevée (89%). Dans la boîte contenant des cellules co-infectées avec AdTR5NH₂GFP et AdTR5R1(Δ 2-357), le taux d'apoptose était semblable au contenu de la la boîte AdTR5R1 Δ , le taux d'apoptose étant de 39%. Les cellules co-infectées avec AdTR5R1, AdTR5NH₂GFP et AdTR5R1 Δ avaient un taux d'apoptose très faible, évalué à 12%.

Dans la boîte de culture contrôle contenant du FasL (Fig. 5B), le taux d'apoptose a été évalué à 40%. La protection par la R1 était très élevée (88%), alors que NH₂GFP n'offrait aucune protection.

Ces résultats démontrent que la protéine NH₂GFP ne protège pas les cellules contre l'apoptose induite par le TNF, par FasL ou par la R1 Δ .

Absence de protection par NH₂GFP

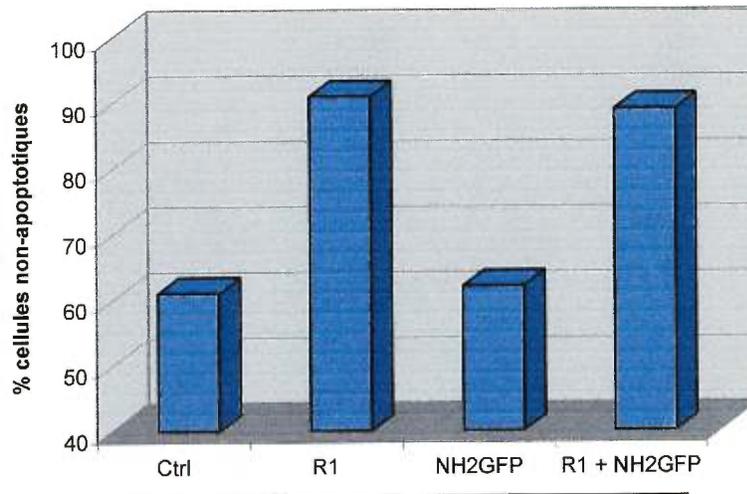


Figure 5A

R1Δ

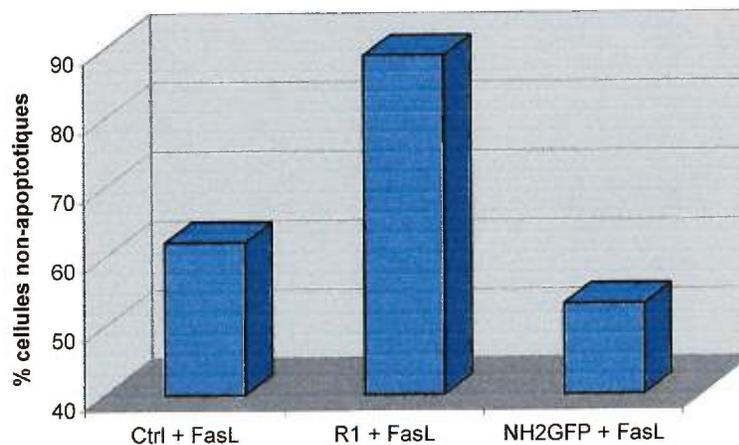


Figure 5B

Figure 5: Absence de protection par NH₂GFP contre l'apoptose induite par la R1Δ et FasL .

A : Les cellules A549tTa ont été infectées avec les recombinants AdTR5NH₂GFP et AdTR5R1 à 25 p.f.u. par cellule pour une période de 7 h. L'apoptose a par la suite été induite par AdTR5R1Δ à 25 p.f.u. par cellule. Dans la boîte contrôle + AdTR5R1Δ, les cellules ont été infectées après la période d'adsorption de 7 h des cellules infectées avec AdTR5NH₂GFP et AdTR5R1. Les résultats ont été compilés après une période de 18 h et représentent le pourcentage de cellules vivantes, calculé en divisant le nombre de cellules vivantes comprises dans un champ microscopique par le nombre de cellules totales. **B :** L'apoptose a été induite par AdCMVFasL à 40 p.f.u par cellule. Dans la boîte contrôle + AdCMVFasL, les cellules ont été infectées après la période d'adsorption de 7 h des cellules infectées avec AdTR5NH₂GFP et AdTR5R1.

3.3 Essai de protection contre l'apoptose par NH₂ A

Les adénovirus recombinants codant pour NH₂ A et NH₂ C ont été construits principalement pour deux raisons. Premièrement, la protéine NH₂GFP exprime les 357 acides aminés N-terminaux de la R1. La limite de 357 acides aminés délimitant les domaines NH₂ et réductase est basée sur des alignements de séquences, mais n'est pas déterminée avec précision. Suite aux résultats obtenus avec NH₂GFP, nous avons émis l'hypothèse que le fragment exprimé était trop court, et que des acides aminés supplémentaires étaient nécessaires à la protection contre l'apoptose. Deuxièmement, nous voulions éliminer la possibilité d'une influence de la GFP dans les résultats obtenus, soit au niveau du taux d'expression de la protéine, ou soit dans sa localisation à l'intérieur de la cellule. Le but était donc d'exprimer le domaine NH₂ seul. NH₂ A code pour les 398 acides aminés N-terminaux de la R1. NH₂ C est le plus long des trois fragments testés et code pour les 496 acides aminés N-terminaux de la R1.

Les résultats des essais de protection faits avec le TNF et avec la R1 Δ sont présentés à la figure 6. Dans la boîte de culture tissulaire Mock (cellules non-infectées), la majorité des cellules était accolée (91%). Dans la boîte contrôle contenant CHX et TNF, la plupart des cellules était en processus d'apoptose. Un faible pourcentage de cellules accolées a été noté (17%). Dans la boîte R1 contenant CHX et TNF, le pourcentage de cellules accolées a été évalué à 63%, les cellules accolées ayant la même morphologie que celles de la boîte Mock. La boîte NH₂ A contenant CHX et TNF avait une apparence similaire à la boîte contrôle contenant CHX et TNF, la plupart des cellules ayant une morphologie apoptotique (85%).

Dans la boîte de culture contenant des cellules infectées par AdTR5R1(Δ 2-357), le pourcentage d'apoptose a été évalué à 27%. Dans la boîte contenant des cellules co-infectées avec R1 et R1 Δ , la protection de la R1 était évidente, et les cellules contenues dans la boîte avaient la même apparence que celles contenues dans la boîte Mock (cellules non-infectées), et un faible pourcentage de cellules ayant une morphologie apoptotique a été noté (11%). Dans la boîte contenant des cellules co-infectées avec NH₂ A et R1 Δ , le pourcentage d'apoptose était sensiblement le même que dans la boîte R1 Δ , soit 30%.

Ces résultats démontrent que la protéine NH₂ A ne protège pas les cellules contre l'apoptose induite par le TNF ou par la R1 Δ .

Absence de protection par NH₂ A

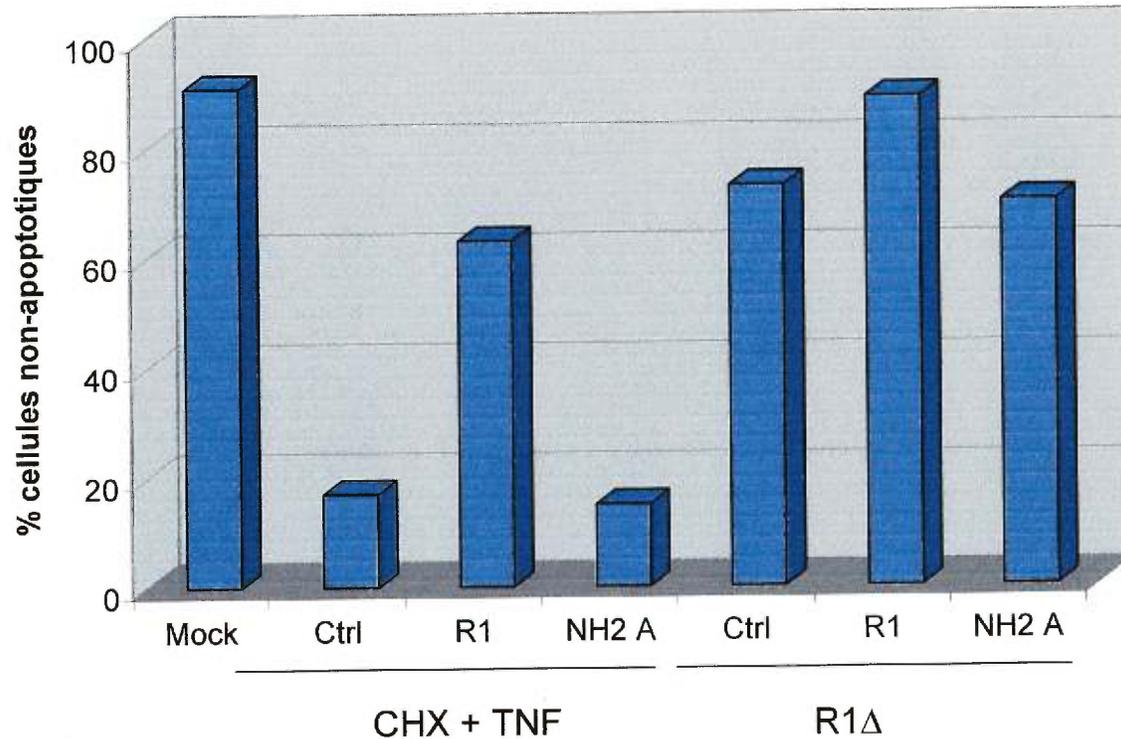


Figure 6 : Absence de protection par NH₂ A contre l'apoptose induite par le TNF et la R1Δ.

Les cellules A549tTa ont été infectées avec les recombinants AdTR5NH₂ A et AdTR5R1 à 25 p.f.u. par cellule pour une période de 7 h. L'apoptose a par la suite été induite par ajout de cycloheximide (30 µg/ml) et TNF-α (2,5 ng/ml), ou par infection avec AdTR5R1Δ à 25 p.f.u. par cellule. Dans la boîte contrôle + AdTR5R1Δ, les cellules ont été infectées après la période d'adsorption de 7 h des cellules infectées avec AdTR5NH₂ A et AdTR5R1. Les résultats ont été compilés après une période de 18 h et représentent le pourcentage de cellules vivantes, calculé en divisant le nombre de cellules vivantes comprises dans un champ microscopique par le nombre de cellules totales.

3.4 Essai de protection contre l'apoptose par NH₂ C

Lorsque les essais de protection avec NH₂ C ont été faits, le titre viral n'avait pas été obtenu avec exactitude, différentes dilutions virales ont donc été utilisées afin d'assurer que les cellules étaient infectées avec un nombre de p.f.u. adéquat.

Les résultats des essais de protection effectués avec le TNF et avec la R1Δ sont présentés à la figure 7. Dans la boîte de culture Mock (cellules non-infectées)(Fig. 7A), la plupart des cellules était acollée (96%). Dans la boîte contrôle contenant CHX et TNF, la majorité des cellules avait une morphologie apoptotique (84%). Dans la boîte R1 contenant CHX et TNF, le pourcentage de cellules acollées a été évalué à 77%. Les boîtes contenant des cellules infectées avec NH₂ C et contenant CHX et TNF avaient la même apparence que les cellules de la boîte contrôle contenant CHX et TNF, la majorité des cellules était en processus d'apoptose.

Dans la boîte de culture contenant des cellules infectées avec AdTR5R1(Δ2-357) (Fig. 7B), le pourcentage d'apoptose a été évalué à 28%. Dans la boîte contenant des cellules co-infectées avec R1 et R1Δ, la protection par la R1 était très élevée et 92% des cellules étaient acollées. Le contenu des boîtes infecté avec AdTR5NH₂ C était très semblable morphologiquement au contenu de la boîte contrôle R1Δ, et les pourcentages de cellules vivantes étaient sensiblement les mêmes, soit 74%, 69% et 71% .

Ces résultats démontrent que la protéine NH₂ C ne protège pas les cellules contre l'apoptose induite par le TNF ou par la R1 Δ.

Absence de protection contre l'apoptose par NH₂ C

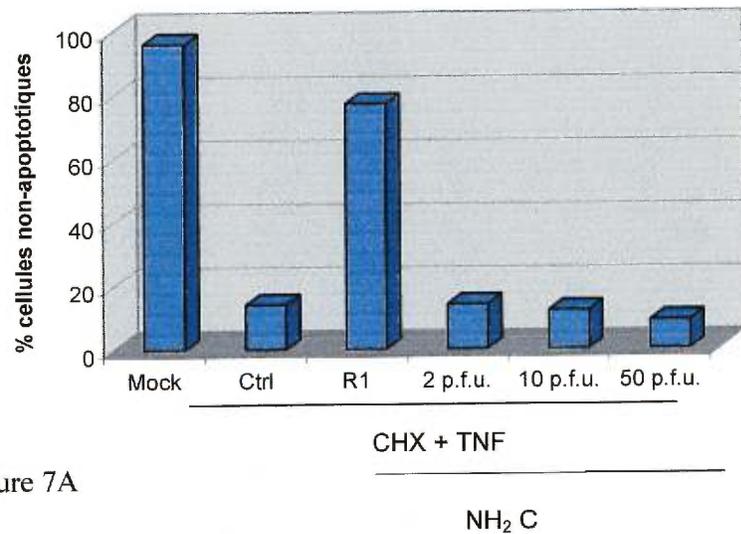


Figure 7A

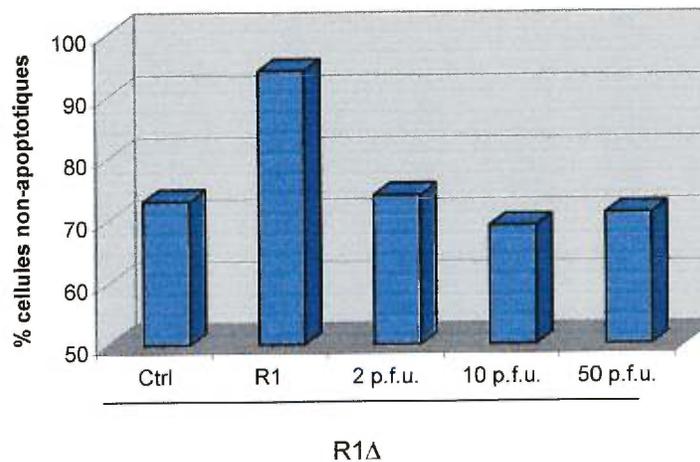


Figure 7B

Figure 7: Absence de protection par NH₂ C contre l'apoptose induite par le TNF et la R1Δ.

A : Les cellules A549tTa ont été infectées avec les recombinants AdTR5NH₂ C et AdTR5R1 à 25 p.f.u. par cellule pour une période de 7 h. L'apoptose a par la suite été induite par ajout de cycloheximide (30 µg/ml) et TNF-α (2,5 ng/ml). Les résultats ont été compilés après une période de 18 h et représentent le pourcentage de cellules vivantes, calculé en divisant le nombre de cellules vivantes comprises dans un champ microscopique par le nombre de cellules totales.

B : L'apoptose a été induite par infection avec AdTR5R1Δ à 25 p.f.u. par cellule. Dans la boîte contrôle + AdTR5R1Δ, les cellules ont été infectées après la période d'adsorption de 7 h des cellules infectées avec AdTR5NH₂ A et AdTR5R1.

3.5 Expression des protéines R1, NH₂GFP et NH₂ A

Suite à l'évaluation des propriétés anti-apoptotiques des protéines recombinantes, les cellules ont été récoltées afin d'en extraire les protéines pour vérifier leur niveau d'expression. Un immunobuvardage des extraits protéiques a été fait avec l'anticorps 932. Cet anticorps reconnaît un épitope contenu dans le domaine NH₂ de la R1. La protéine R1Δ étant déléetée des 357 acides aminés N-terminaux de la R1, l'anticorps ne reconnaît pas cette protéine. Dans la ligne contrôle, la ligne contrôle contenant CHX et TNF et la ligne R1Δ, aucune bande n'est visible. Dans la ligne R1, la ligne R1 contenant CHX et TNF et la ligne R1 et R1Δ, une bande est visible à 140 kDa, qui est le poids moléculaire de la R1. Dans la ligne NH₂GFP, la ligne NH₂GFP contenant CHX et TNF et la ligne NH₂GFP et R1Δ, une bande est visible à 80 kDa. Dans la ligne R1 et NH₂GFP contenant CHX et TNF, deux bandes distinctes sont visibles à 140 et 80 kDa, démontrant l'expression des deux protéines. Dans la ligne NH₂ A, une bande est visible à 43 kDa.

Les protéines NH₂GFP et NH₂ A sont donc exprimées dans la cellule, et la comparaison de l'intensité des bandes démontre qu'elles sont exprimées à des niveaux similaires à la R1.

Immunobuvardage des protéines R1, NH₂GFP et NH₂ A

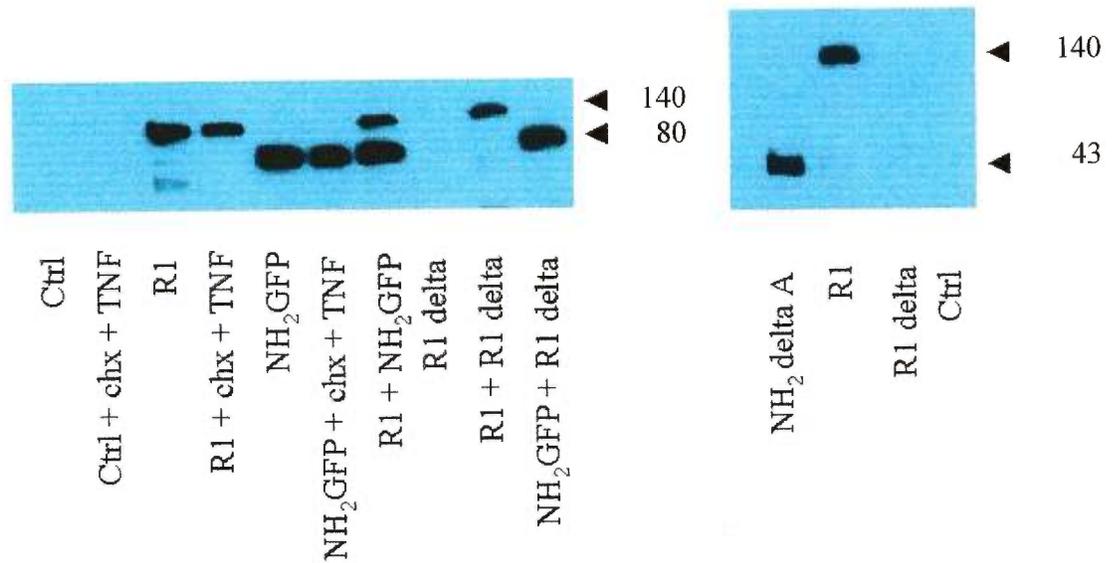


Figure 8 : Immunobuvardage des protéines R1, NH₂GFP et NH₂ A.

10 µg d'extraits protéiques ont été séparés sur gel de polyacrylamide, puis transférés sur membrane de nitrocellulose. L'immunobuvardage a été fait avec une dilution 1 :10 000 d'anticorps 932, puis avec une dilution 1 :100 000 d'anticorps secondaire anti-souris lié à la Horse Radish Peroxydase. Le film a été exposé à la membrane pour une période de 60 secondes.

3.6 Immunofluorescence

Des expériences d'immunofluorescence ont été faites pour comparer la localisation des protéines NH₂ A et NH₂ C avec celle de la protéine R1 (fig. 9). La protéine R1 est une protéine cytoplasmique qui se retrouve normalement de façon diffuse dans le cytoplasme. Les expériences d'immunofluorescence ont été faites avec l'anticorps 932. Les résultats ont démontré que, tel qu'attendu, la R1 se retrouve dans le cytoplasme, de façon diffuse. Il n'y a pas de formation d'agrégats de la protéine, et elle est absente du noyau. La localisation des protéines NH₂ A et NH₂ C est très semblable à celle de la R1, et les deux protéines se retrouvent de façon diffuse dans le cytoplasme, sans formation d'agrégats. Les deux protéines sont également absentes du noyau.

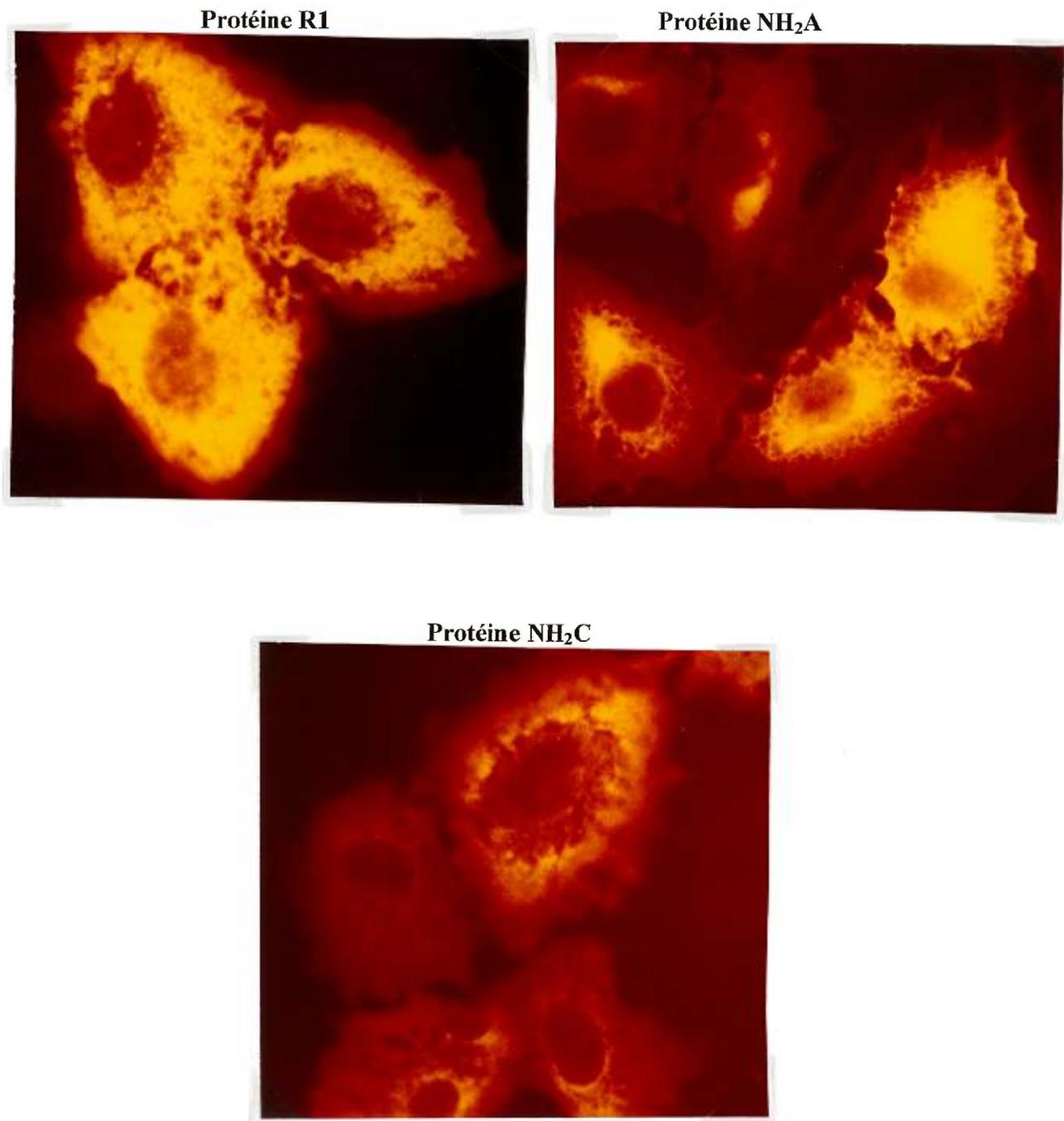


Figure 9 : Immunofluorescence des protéines R1 NH₂ A et NH₂ C.

Les cellules ont été infectées avec AdTR5R1, AdTR5NH₂ A ou AdTR5NH₂ C à 25 p.f.u. par cellule, l'adsorption du virus s'est faite pour une période de 7 h et les cellules ont été incubées jusqu'au lendemain. Les lamelles ont été fixées, 10 µl d'anticorps 932 (1 :100) ont été ajoutés sur les lamelles pour 30 min., les lamelles ont été lavées, puis 10 µl d'anticorps secondaire (1 :100) ont été ajoutés sur les lamelles pour 30 min.

Résultats – Partie 2

3.7 Mécanisme d'action de la protéine R1 dans la protection contre l'apoptose

La R1 peut agir à plusieurs niveaux dans la cascade apoptotique pour empêcher le processus. Parmi les interactions possibles, la R1 pourrait avoir un effet inhibiteur sur une des caspases effectrices, en empêchant son clivage ou en empêchant son interaction avec le substrat. Elle peut agir comme analogue d'une protéine anti-apoptotique cellulaire et modifier l'équilibre caspases activées/caspases non-activées, empêchant ainsi l'amplification du signal apoptotique. Elle peut agir comme inhibiteur de caspase initiatrice en empêchant son clivage, ou en empêchant son interaction avec le substrat. Il peut également y avoir une interaction avec une des nombreuses molécules du récepteur ou se liant au récepteur TNF ou Fas. Des expériences faites auparavant au laboratoire avaient démontré que lors de l'inhibition par la R1 de l'apoptose induite par le TNF, il y avait absence d'activation de la caspase 3. Celle-ci n'était pas clivée. Nous avons décidé d'étudier la caspase 8, qui est la caspase initiatrice impliquée dans l'apoptose induite par un récepteur.

3.7.1 Détection de la caspase 8 par immunobuvardage

Des cellules contrôle ou des cellules infectées avec la R1, ont été traitées avec de la cycloheximide, avec cycloheximide et TNF, ou avec FasL et ont été incubées pour une période de 8 h et de 16 h avant d'être récoltées. Un immunobuvardage des extraits protéiques a été fait avec un anticorps monoclonal anti-caspase 8.

Les résultats des immunobuvardages sont présentés à la figure 10. Dans la ligne contrôle de la série Mock (cellules non-infectées) (Fig 10, 8h), une bande est visible à 55 kDa qui est le poids moléculaire de la pro-caspase 8 (forme inactive). Dans la ligne contrôle contenant du CHX, la même bande est visible. Le cycloheximide induit l'apoptose d'environ 10% des cellules, ce pourcentage étant faible, la diminution de l'intensité de la bande représentant la pro-caspase n'est pas visible. Dans la ligne contrôle contenant CHX et TNF, la forme inactive de la caspase 8 est non détectable, alors qu'une bande est détectable à 18 kDa, qui est le poids moléculaire du fragment actif de la la caspase 8. Dans la ligne contrôle, la ligne contrôle et CHX et la ligne contrôle contenant CHX et TNF de la série R1, la forme inactive de la caspase 8 est détectable dans les trois lignes, mais le fragment actif de 18 kDa n'est pas détectable, indiquant que la pro-caspase 8 n'est pas clivée en sa forme active.

Dans la ligne contrôle de la série Mock (cellules non-infectées) (Fig. 10, 16 h.), la pro-caspase 8 est détectable à 55 kDa. Dans la ligne contrôle et CHX, la même bande est visible. Dans la ligne contrôle contenant CHX et TNF, le fragment actif de 18 kDa n'est plus détectable, ce qui démontre son instabilité. Dans la ligne contrôle contenant du FasL, la bande de 55 kDa est plus faible que celle du contrôle, alors qu'une bande apparaît à 18 kDa, représentant le fragment actif de la protéine. Dans la série R1, dans la ligne contrôle et la ligne contrôle contenant du CHX, la pro-caspase 8 est détectable à 55 kDa. Dans la ligne contenant CHX et TNF et la ligne contenant du FasL, l'intensité de la bande de 55 kDa n'est pas diminuée, et la forme active de 18 kDa n'est pas détectable, indiquant que la caspase 8 n'est pas clivée. Ces résultats indiquent donc que la R1 empêche l'activation de la caspase 8 dans la cellule.

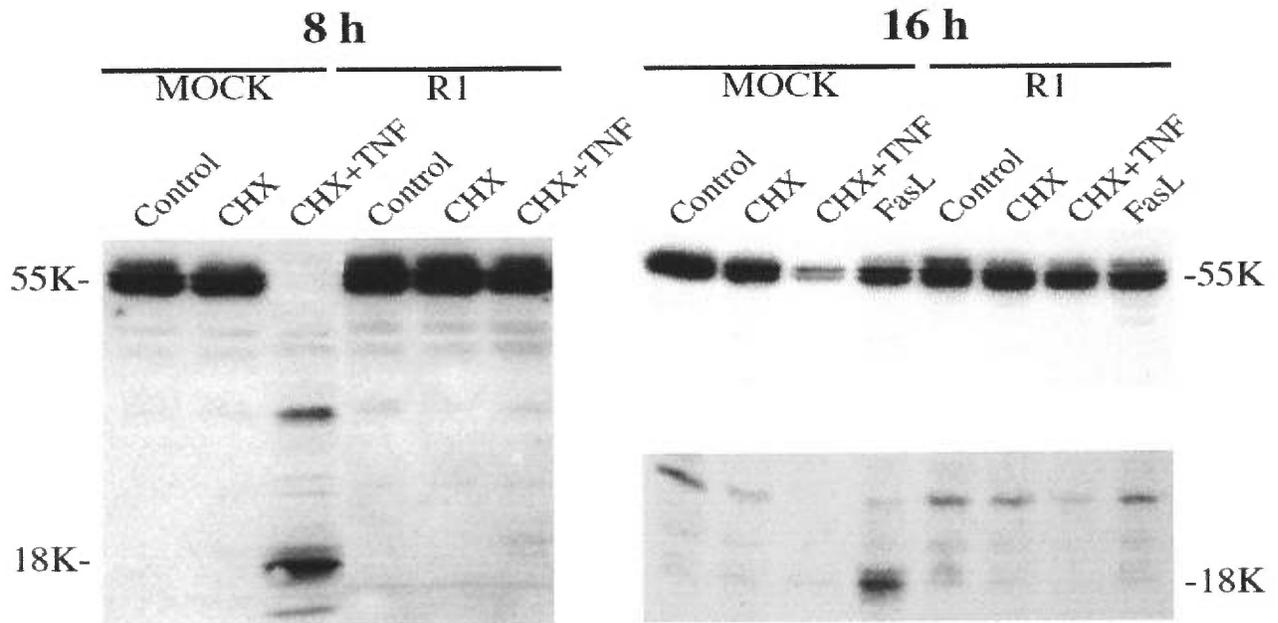


Figure 10 : Immunobuvardage – détection de la caspase 8.

10 μ g d'extraits protéiques ont été séparés sur gel de polyacrylamide, puis transférés sur membrane de nitrocellulose. L'immunobuvardage a été fait avec une dilution 1 :25 000 d'anticorps anti-caspase 8, puis avec une dilution 1 :100 000 d'anticorps secondaire anti-souris lié à la horseradish peroxydase.

3.7.2 Essai d'activité caspase

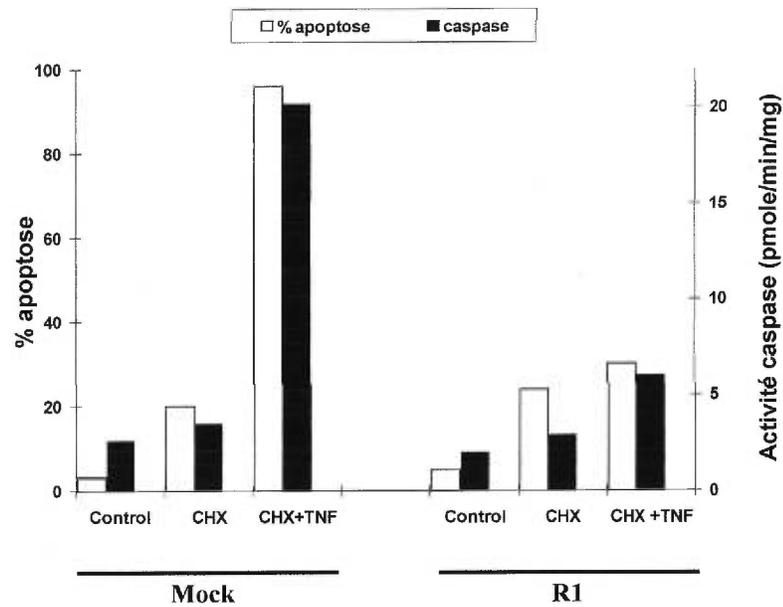
Des essais d'activité caspase ont par la suite été faits avec l'ensemble commercial ApoAlert, qui permet de mesurer l'activité caspase 8 dans la cellule.

Des cellules A549tTa ont été infectées avec AdTR5R1 à 25 p.f.u. par cellule pour une période de 7 heures. L'apoptose a par la suite été induite par ajout de cycloheximide ou de cycloheximide et de TNF, avec incubation des cellules durant 8 heures avant la récolte, ou par ajout de cycloheximide, de cycloheximide et de TNF ou de FasL avec incubation des cellules durant 16 heures avant la récolte. Les extraits protéiques ont été mis en présence d'un substrat spécifique à la caspase 8, IETD, qui est couplé à AFC. Le clivage par la caspase 8 de IETD-AFC permet la libération de AFC, et celle-ci émet alors à une longueur d'onde différente. Ce changement d'émission permet d'évaluer le taux d'activité de la caspase.

Les résultats de l'expérience sont présentés à la figure 11. Dans l'extrait Mock (cellules non-infectées) (incubation 8 h), le taux d'apoptose était de moins de 10% et le taux d'activité caspase était également faible (2 pmole/min/mg). Dans l'extrait contrôle et CHX, le taux d'apoptose et d'activité caspase étaient légèrement plus élevés. Dans l'extrait contrôle contenant CHX et TNF, le taux d'apoptose (98%) et l'activité caspase (20 pmole/min/mg) étaient maximaux. Dans la série R1, le taux d'apoptose et d'activité caspase ont respectivement atteint un maximum de 30% et 6 pmole/min/mg en présence de CHX et TNF.

Les résultats obtenus avec les extraits Mock (cellules non-infectées) et contrôle contenant du CHX (incubation de 16 h) sont similaires aux résultats obtenus avec l'incubation de 8 heures, les taux d'apoptose et d'activité caspase étant faibles. Dans l'extrait contrôle contenant CHX et TNF, le taux d'apoptose atteint presque 100% alors que l'activité caspase est presque nulle, reflétant le temps d'activité limité de cette protéine. Dans l'extrait contrôle contenant du FasL, les taux d'apoptose étaient respectivement de 70% et 55%. Dans la série R1, les taux d'apoptose et d'activité caspases étaient faibles (20% et 5 pmole/min/mg respectivement). Ces résultats indiquent donc que la R1 empêche le clivage des substrats de la caspase 8.

8 h



16 h

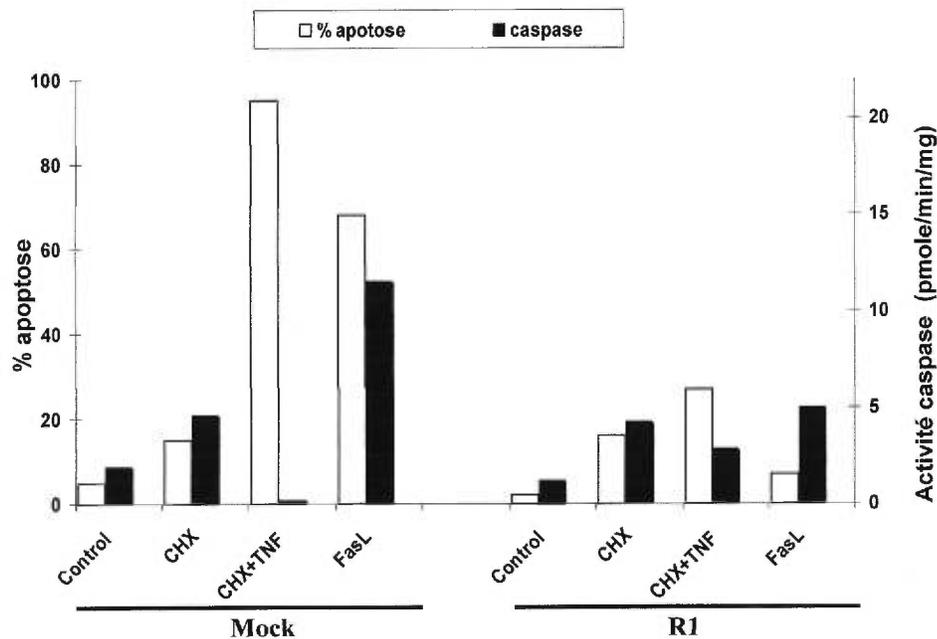


Figure 11 : Essai d'activité caspase.

L'essai a été fait avec l'ensemble commercial ApoAlert. Les cellules ont été infectées avec AdTR5R1 avec 25 p.f.u. par cellule pour une période de 7 h. Les cellules ont par la suite été traitées avec CHX, CHX + TNF ou FasL pour une période de 8 h ou de 16 h avant la récolte.

3.7.3 Effet de la R1 sur la caspase 8 active

Suite aux résultats obtenus avec l'essai d'activité caspase, nous avons voulu évaluer la possibilité d'une interaction de la R1 avec la caspase 8 active. En effet, la R1 pourrait interagir avec la caspase 8 active, empêchant cette dernière d'activer d'autres pro-caspases 8, et empêchant ainsi une modification du ratio pro-caspase : caspase active. Un essai *in vitro* a été fait en mettant de la protéine R1 purifiée en présence de caspase 8 active. Les résultats de la figure 12 démontrent que la R1 n'a pas d'effet sur l'activité de cette dernière.

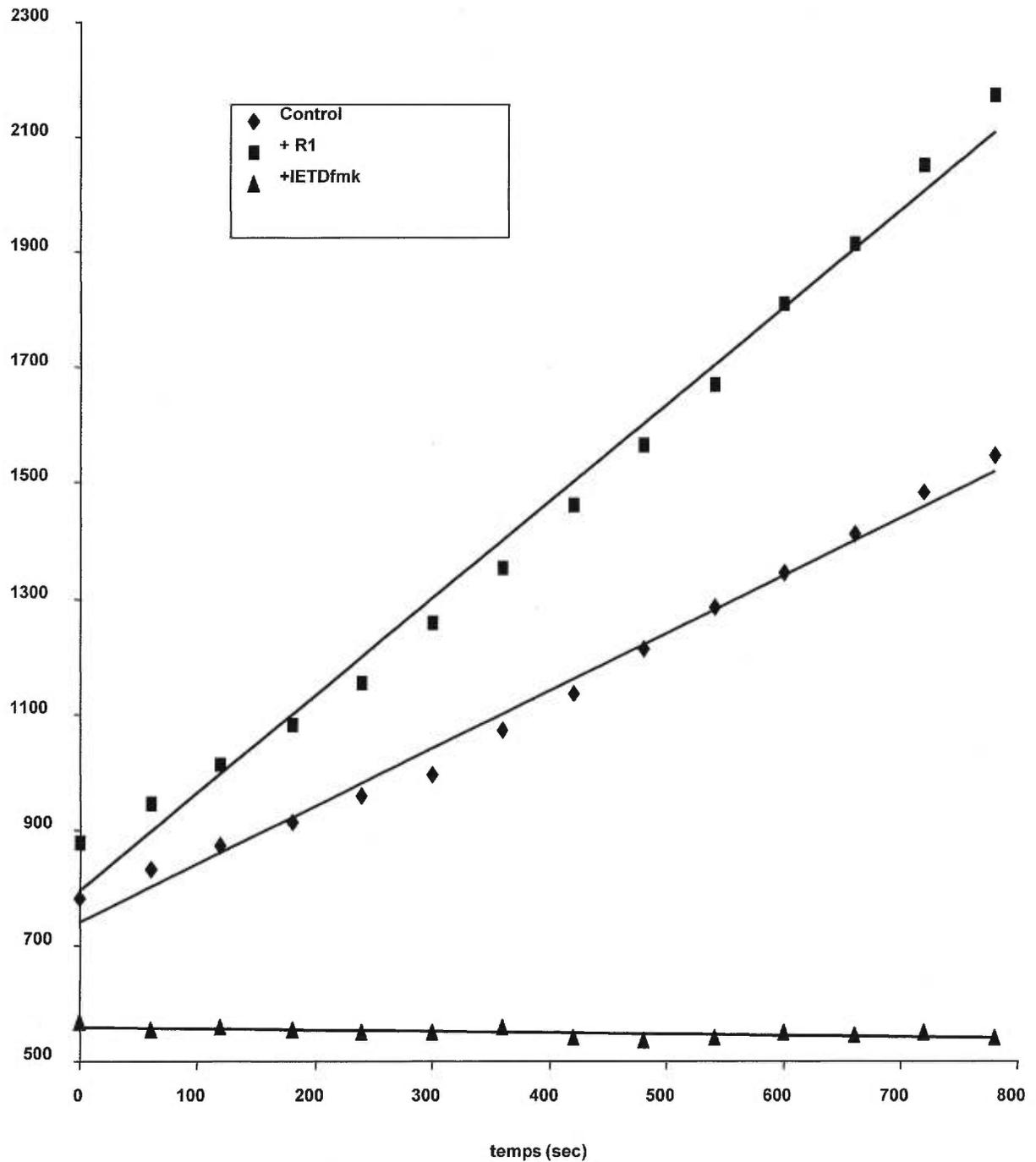
La R1 n'a pas d'effet inhibiteur sur la caspase 8 active

Figure 12 : La R1 n'a pas d'effet inhibiteur sur la caspase 8 active.
L'essai in vitro a été fait en mettant de la protéine R1 en présence de caspase 8 active.

Section IV

Discussion

Section IV

Discussion

4.1 Protection contre l'apoptose par la R1

Les premières séries d'expériences ont démontré la protection de la R1 contre l'apoptose induite par le TNF et par FasL. L'utilisation d'un vecteur adénovirus pourrait créer le doute que certaines protéines de l'adénovirus sont responsables de la protection contre l'apoptose, même si leur niveau d'expression est très faible dans les cellules non permissives. L'ajout de doxycycline au milieu de culture permet d'assurer que la protection contre l'apoptose est due à la R1 et non à l'expression de certaines protéines du vecteur adénovirus. En effet, dans les cellules infectées avec AdTR5R1, et où l'expression de la protéine R1 est inhibée par l'ajout de doxycycline, le taux d'apoptose est aussi élevé que dans le contrôle suite au traitement avec FasL. De plus, les protéines anti-apoptotiques de l'adénovirus sont situées dans les régions E1 et E3 (Dimitrov et al., 1997), lesquelles sont délétées des vecteurs utilisés.

La détection de Parp par immunobuvardage a été utilisée comme marqueur de l'apoptose. Parp (Poly (ADP-ribose) polymerase) est une protéine nucléaire impliquée dans la réparation de l'ADN (Duriez et Shaw, 1997). Le clivage de Parp lors du processus apoptotique est un des premiers événements détectables de dégradation protéique se produisant après la fragmentation de la chromatine, mais avant la fragmentation internucléosomale. (Greidinger et al., 1997). Parp est une protéine de 113 kDa. Son

clivage, lors du processus apoptotique génère un fragment de 89 kDa détectable par immunobuvardage. Le fragment de 89 kDa peut également être présent lors d'une mort cellulaire par nécrose, mais en très faible quantité, la majorité de la protéine se retrouvant sous forme non clivée (Duriez et Shaw, 1997).

4.2 Protection contre l'apoptose par NH₂GFP, NH₂ A et NH₂ C

Parce que les expériences de protection avec la R1 ont démontré ses propriétés anti-apoptotiques, et que l'expression de la R1 Δ (2-357) causait l'apoptose des cellules, il a été supposé que la région responsable de l'activité anti-apoptotique se trouvait à l'intérieur du domaine NH₂ (357 a.a. N-terminaux). NH₂GFP est une protéine de fusion formée des 357 a.a. N-terminaux de la R1 fusionnés au N-terminal de la GFP. Les expériences ont démontré que NH₂GFP n'offrait aucune protection contre l'apoptose induite par le TNF, la R1 Δ ou FasL. Les expériences faites avec NH₂ A et NH₂ C ont donné les mêmes résultats. Les immunobuvardages faits par la suite avec les extraits protéiques ont bien démontré que l'absence de protection n'était pas due à une expression inadéquate des protéines, l'intensité des bandes étant au moins égale à celle de la R1. Un contrôle supplémentaire a été fait par immunofluorescence et a démontré que NH₂ A et NH₂ C avaient une localisation semblable à la R1. Ce contrôle supplémentaire a permis d'assurer que l'expression de courts fragments protéiques comme NH₂ A et NH₂ C ne résultait pas en leur agrégation, ou en une localisation inadéquate.

Un rôle du domaine NH₂ dans la protection des cellules contre l'apoptose demeure valide. La R1 se retrouve sous forme de dimère dans la cellule et possède deux sites de dimérisation aux a.a. 591 et 636 (Atta et.al., 1993). Lors de la dimérisation de deux sous-unités R1, le domaine NH₂ se retrouve dans une conformation particulière, vers l'extérieur de la protéine (Atta et.al., 1993). L'expression des protéines NH₂GFP, NH₂ A et NH₂ C ne permet pas la dimérisation des sous-unités, ces sites étant absents. Il est possible que sous forme de monomère, la conformation de la protéine ne permet pas l'interaction avec les protéines cellulaires cibles, ce qui empêcherait d'obtenir une protection contre l'apoptose.

A cause des propriétés uniques du domaine NH₂ de la R1 des HSV-1 et HSV-2, plusieurs études ont été faites pour tenter d'identifier sa fonction. Il a été rapporté que la R1 des HSV-1 et HSV-2 possédait une activité serine/thréonine kinase située à l'intérieur des 310 acides aminés N-terminaux de la sous-unité (Hossain et.al., 1997) (Smith et.al., 1996) (Ali, 1995) (Conner et.al., 1992). Des études subséquentes ont toutefois démontré que la R1 des HSV-1 et HSV-2 ne possédait pas d'activité kinase, mais qu'elle était un substrat d'une protéine de la cellule hôte, la caséine kinase 2 (Langelier et.al., 1998) (Conner et.al., 1999). En effet, il a été démontré que la R1 était un excellent substrat pour la CK2, et que les sites de phosphorylation se trouvaient entre les acides aminés 1 et 245. Il a été avancé que la phosphorylation par la CK2 pourrait réguler l'activité du domaine NH₂ in vivo. (Conner et.al., 1999).

4.3 Mécanisme d'action

Les travaux sur le mécanisme d'action ont démontré que lors de l'induction de l'apoptose par le TNF ou par FasL, la R1 empêche l'activation de la caspase 8. Lors de l'induction de l'apoptose par ces ligands, la caspase 8 est la première caspase activée de la cascade (Ashkenazi et Dixit, 1998). Le mécanisme d'action n'a pas encore été déterminé avec précision. Nos travaux ont toutefois démontré que la R1 n'a aucun effet sur la caspase 8 active, et qu'en présence de R1, la pro-caspase 8 n'est pas clivée en sa forme active. Ces résultats laissent donc supposer que la R1 pourrait interagir directement avec la pro-caspase 8, empêchant son activation, ou avec les diverses molécules adaptatrices du récepteur TNF ou Fas.

Plusieurs virus sont capables de moduler l'apoptose induite par un récepteur par interaction avec différentes protéines de la cascade. Dans le cas de l'apoptose induite par Fas, la liaison du ligand à son récepteur amène la trimérisation du récepteur, suivie du recrutement de FADD par l'interaction de son DD (*Death Domain*) au DD de Fas. FADD se lie par la suite à la caspase 8 par une interaction de leurs DED (*Death Effector Domain*) respectifs (Ashkenazi et Dixit, 1998). La caspase 8 activera par la suite les caspases effectrices (Ashkenazi et Dixit, 1998). L'interférence des protéines virales dans la cascade apoptotique peut se faire à plusieurs niveaux. Il peut y avoir une interaction ligand-récepteur. Le myxoma virus code pour un homologue de TNFR-2, qui est une glycoprotéine sécrétée capable de bloquer l'activité du TNF (Schreiber et al., 1997). Cette glycoprotéine agit comme antagoniste de la liaison du TNF à son récepteur. La

protéine E3-14.7K, et l'hétérodimère E3-10.4K/14.5K de l'adénovirus peuvent empêcher l'apoptose induite par FasL en provoquant l'internalisation du récepteur Fas (Dimitrov et.al., 1997). Un autre type d'interaction est celle de FADD-Caspase 8 (flice) (Ashkenazi et Dixit, 1998). Les FLIPs (*flice inhibitory proteins*) des HHV-8, EHV-2, HVS et poxvirus contiennent deux DEDs et peuvent s'associer au DED de FADD et de la caspase 8, bloquant l'apoptose induite par FasL et par le TNF (Thome et.al., 1997). Une interaction peut également se faire directement avec la caspase 8. CrmA (*Cytokine response modifier A*) du cowpox virus possède une forte homologie aux serpins, une famille d'inhibiteurs des sérine protéases (Zhou et.al., 1997). CrmA empêche l'activation de la caspase 8 et de la caspase 1, et plus faiblement, d'autres caspases (Zhou et.al., 1997). L'activation des caspases peut aussi être une cible des protéines virales. IAP (*Inhibitor of Apoptosis*) du baculovirus est une protéine possédant deux ou trois séquences IAP répétées, les BIR (*baculovirus IAP repeats*) à son extrémité N-terminale (Bump et.al., 1995). Les IAP peuvent empêcher l'apoptose en se liant aux caspases activées par une interaction BIR-caspase (Tschopp et.al., 1998).

Les stratégies développées par les virus pour permettre un taux de réplication élevé sont très variées, les possibilités d'interaction de la R1 avec les molécules du complexe TNFR ou Fas sont donc nombreuses.

5.0 Perspectives

Il a été démontré que la R1 des HSV-1 et HSV-2 possède une activité anti-apoptotique contre le TNF et FasL. La ou les parties de la protéine responsable(s) de cette activité reste(nt) toutefois à déterminer. Une approche possible serait d'exprimer une protéine R1 constituée des 636 a.a. N-terminaux. Ce segment ne posséderait pas d'activité réductase, mais la présence des sites de dimérisation permettrait d'exprimer une protéine ayant une conformation plus rapprochée de la forme native. Cette approche permettrait de déterminer si la formation d'un dimère est nécessaire à l'activité anti-apoptotique de la R1. Une seconde approche consisterait à faire des études de structure-activité avec la R1 entière, en procédant à des délétions des régions du domaine NH₂ qui sont hautement conservées chez HSV-1 et HSV-2.

Au niveau du mécanisme d'action, les cibles possibles de la R1 sont nombreuses et l'utilisation du système à double-hybride permettra de déterminer les molécules avec lesquelles la R1 interagit dans la cellule.

Références

- Adams J.M., Corey S., *The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival*, Science, 281, 1322-1325, 1998.
- Ali M.A., *The 140-kDa RR Protein from Both HSV-1 and HSV-2 Contains an Intrinsic Protein Kinase Activity Capable of Autophosphorylation but it is Transphosphorylation Defective*, Virology, 10;207(2) 409-16, 1995.
- Araki T., Enokido Y., Inamura N., Aizawa S., Reed J.C., Hatanaka H., *Changes in c-Jun but not Bcl-2 Family Proteins in p53-dependent apoptosis of Mouse cerebellar granule Neurons Induced by DNA damaging Agent Bleomycin*, Elsevier, 794, 239-247, 1998.
- Ashkenazi A., Dixit V.M., *Death Receptors : Signaling and Modulations*, Science, 281, 1305-1308, 1998.
- Atta M., Lamarche N., Battioni J.P., Massie B., Langelier Y., Mansuy D., Fontecave M., *Escherichia coli and herpes-simplex-virus ribonucleotide reductase R2 subunit. Compared reactivities of the redox centres*, Biochemistry Journal, 15;290, 807-810, 1993.
- Averett D.R., Lubbers C., Elion G.B., Spector T., *Ribonucleotide Reductase Induced by Herpes Simplex Type I Virus*, The Journal of Biological Chemistry, 258;16, 9831-9838, 1983.
- Aurelian L., *Herpes Simplex Virus Type II: Unique Biological Properties Include Neoplastic Potential Mediated by the PK Domain of the Large Subunit of Ribonucleotide Reductase*, Frontiers in Bioscience, 3, 237-249, 1998.
- Averett D.R., Lubbers C., Elion G.B., Spector T., *Ribonucleotide Reductase Induced by Herpes Simplex Type I Virus*, Journal of Biological Chemistry, 258;16, 9831-9838, 1983.
- Blanchette-Mackie L.R., Ladisch S., *Induction of Endocytic vesicles by exogenous C(6)-ceramide*, Journal of Biological Chemistry, 23;274(30), 21121-21127, 1999.
- Boldin M.P., Goncharov T., Goltsev Y., Wallach D., *Involvement of MACH, a Novel MORT/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1 and TNF Receptor Induced cell Death*, Cell, 85(6), 803-815, 1996.
- Boldin M.P., Varfolomeev E.E., Pancer Z., Mett I.L., Camonis J.H. Wallach D., *A Novel Protein that interacts with the Death Domain of Fas/Apo1 contains a sequence motif Related to the Death Domain*, Journal of Biological Chemistry, 270, 7795-7798, 1995.
- Bump N.J., Hackett M., Hugunin M., Seshagiri S., Brady K., Chen P., Ferenz C., Franklin S., Ghayur S., Li P., *Inhibition of ICI family Proteases by Baculovirus Antiapoptotic Protein p36*, Science, 269, 1885-1888, 1995.
- Cambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., *Molecular Cloning Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., 2e edition, 1989.

Conner J., *The Unique N-Terminus of Herpes Simplex Type I Ribonucleotide Reductase Large Subunit is Phosphorylated by Casein Kinase II which May Have an Homologue in E. Coli*, *Journal of General Virology*, 80, 1471-1476, 1999.

Daikoku T.L., Yamamoto N., Maeno K., Nishiyama Y., *Role of Viral Ribonucleotide Reductase in the Increase of dTTP Pool Size in Herpes Simplex Virus-Infected Vero Cells*, *Journal of General Virology*, 72, 1441-1444, 1991.

Darnay B.G., Aggarwal B.B., *Early Events in TNF Signaling: History of Associations and Dissociations*, *Journal of Leukocyte Biology*, 61, 559-566, 1997.

Devereaux Q.L., Takahashi R., Salvesen G.S., Reed J.C., *X-linked IAP is a Direct Inhibitor of Cell-death Proteases*, *Nature*, 388, 300-304, 1997.

Dimitrov T., Krajcsi P., Hermiston T.W., Tollefson A.E., Hannik M., Wold W.S.M., *Adenovirus E3-10.4k/14.5k Protein Complex Inhibits Tumor Necrosis Factor-induced Translocation of cytosolic Phospholipase A₂ to Membranes*, *Journal of Virology*, 71, 2830-2837, 1997.

Duriez P.J., Shah G.M., *Cleavage of Poly (ADP-Ribose) Polymerase: A Sensitive Parameter to Study Cell Death*, *Biochemical Cellular Biology*, 75, 337-349, 1997.

Editorial, *The Molecular Genetics of Herpes Simplex Virus Latency and Pathogenesis: A Puzzle with Many Pieces still Missing*, *Journal of Neurovirology*, 2, 225-229, 1996.

Engstrom Y., Eriksson S., Jokdevik I., Skog S., Thelander L., Tribukait B., *Cell cycle-Dependent Regulation of Mammalian Ribonucleotide Reductase. The S phase-correlated Increase in Subunit M2 is Regulated by de novo Protein Ssynthesis*, *Journal of Biological Chemistry*. 259, 11695-700, 1984.

Eriksson M., Uhlin U., Ramaswamy S., Ekberg M., Regnstrom K., Sjoberg B.M., Eklund H., *Binding of Allosteric Effectors to Ribonucleotide Reductase Protein R1: Reduction of Active-Site Cysteines Promotes Substrate Binding*, *Structure*, 15;5(8), 1077-92, 1997.

Evan G., Littlewood T., *A Matter of Life and Cell Death*, *Science*, 281, 1317-1321, 1998.

Feldmann G., *Autour de l'apoptose*, *Annual Pharmacological*, 57, 291-308, 1999.

Ferrari D., Stepczynska A., Los M., Wesselborg S., Schulze-Osthoff K., *Differential Regulation and ATP Requirement for Caspase-8 and Caspase-3 Activation during CD-95 and Anticancer Drug-induced Apoptosis*, *Journal of Experimental Medecine*, 188;5, 979-984, 1998.

- Galvan V., Roizman B., *Herpes Simplex Virus I Induces and Blocks Apoptosis at Multiple Steps During Infection and Protects Cells from Exogenous Inducers in a Cell-Type Dependant Manner*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 95, 3931-3936, 1998.
- Goldstein D.J., Weller S.K., *Factors Present in Herpes Simplex Virus Type I-Infected Cells can Compensate for the Large Subunit of the Viral Ribonucleotide Reductase. Characterization of an ICP-6 Deletion Mutant*, Virology, 166, 41-51, 1988.
- Goldstein D.J., Weller S.K., *Herpes Simplex Virus Type I Induce Ribonucleotide Reductase Activity is Dispensable for Virus Growth and DNA Synthesis: Isolation and Characterization of ICP-6 Lac-Z Insertion Mutant*, Journal of Virology, 62;1, 196-205, 1988.
- Green D.R., Reed J.C., *Mitochondria and Apoptosis*, Science, 281, 1309-1311, 1998.
- Greidinger, E.L., Miller D.K., Yamin T.T., Casciola-Rosen L., Rosen A., *Sequential Activation of Three Distinct ICE-Like Activities in Fas-Ligated Jurkat Cells*, FEBS 390, 299-303, 1997.
- Han J., Sabbatini P., Perez D., Rao L., Modha D., White E., *The E1B 19K protein Blocks Apoptosis by Interacting with and Inhibiting the p53-inducible and Death-promoting Bax protein*, Genes & Development, 10, 461-477, 1996.
- Heiden V., Mathew G., Chandel N.S., Williamson E.K., Schumacker P.T., Thompson C.B., *Bcl-X_L Regulates the Membrane Potential and Volume Homeostasis of Mitochondria*, Cell, 91, 627-637, Nov. 1997.
- Henderson S., Huen D., Rowe M., Dawson C., Johnson G., Rickinson A., *Epstein-Barr Virus-coded BHRF1 protein, a Viral Homologue of Bcl-2, Protects Human B cells from Programmed Cell Death*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 90, 8479-8483, 1993.
- Hengartner M., *Death by Crowd Control*, Science, 281, 1298-1299, 1998.
- Hitoshi Y., Lorens J., Kitada S.I., Fisher J., LaBarge M., Ring H.Z., *Toso, a Cell Surface, Specific Regulator of Fas-Induced Apoptosis in T Cells*, Immunity, 4, 461-71, 1998.
- Hofmann K., *The Modular Nature of Apoptotic Signaling proteins*, Cellular Molecular Life Science, 55, 1113-1128, 1999.
- Hsu H., Shu H.B., Pan M.G., Goeddel D.V., *TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 Signaling Transduction pathways*, Cell, 84, 299-308, 1996.

- Huang D.C.S., Cory S., Strasser A., *Bcl-2, Bcl-xL and adenovirus Protein E1B19k are Functionally Equivalent in their Ability to Inhibit Cell Death*, *Oncogene*, 14, 405-414, 1997.
- Idowu A.D., Fraser-Smith E.B., Poffenberger K.L., Herman R.C., *Deletion of the Herpes Simplex Virus Type I Ribonucleotide Reductase Gene Alters Virulence and Latency in Vivo*, *Antiviral Research*, 17, 145-156, 1992.
- Jacobson J.G., Leib D.A., Goldstein D.J., Bogard C.L., Schaffer P.A., Weller S.K., Coen D.M., *An Herpes Simplex Virus Ribonucleotide Reductase Deletion Mutant is Defective for Productive Acute and Reactivable Latent Infections of Mice and for Replication in Mouse Cells*, *Journal of Virology*, 176, 276-283, 1989.
- Jerome K.R., Tait J.F., Koella D.M., Corey L., *Herpes Simplex Virus Type I Renders Infected Cells Resistant to Cytotoxic T-Lymphocyte-Induced Apoptosis*, *Journal of Virology*, 71;1, 436-441, 1998.
- Jordan A., Reichard P., *Ribonucleotide Reductases*, *Annual Review of Biochemistry*, 67, 71-98, 1998.
- Kawanishi M., *Epstein-Barr virus BHRF1 protein protects intestine 407 Epithelial Cells from Apoptosis Induced by Tumor Necrosis Factor Alpha and anti-Fas Antibody*, *Journal of Virology*, 71, 3319-3322, 1997.
- Kennedy P.G.E., Steiner I., *A Molecular and Cellular Model to Explain the Differences in Reactivation from Latency by Herpes Simplex and Varicella-Zoster Viruses*, *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 20, 368-374, 1994.
- Kischkel F.C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer P.H., Peter M.E., *Cytotoxicity-dependent APO-1-associated proteins form a death-inducing signalling complex (DISC) with the receptor*, *EMBO Journal*, 14, 5579-5588, 1995.
- Konopleva M., Zhao S., Xie Z., Segall H., Younes A., Claxton D., Estrov Z., Kornblau S.M., Andreeff M., *Apoptosis, Molecules and Mechanisms*, *Advances in Experimental Medical Biology*, 457, 217-236, 1999.
- Kristie T.M., Vogel J.L., Sears A.E., *Nuclear Localization of the C1 Factor (Host Cell Factor) of Herpes Simplex Virus from Latency*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 1229-1233, 1999.
- Kwon B., *Functions of newly identified members of the Tumor Necrosis Factor Receptor-Ligand Super-families in Lymphocytes*, *Current Opinions in Immunology*, 11, 340-345, 1999.

Lachmann R.H., Sadarangani M., Atkinson H., Efstathiou S., *An Analysis of Herpes Simplex Virus Gene Expression during Latency Establishment and Reactivation*, Journal of General Virology, 80, 1271-1282, 1999.

Lamarche N. et Langelier Y., *Observations non publiées*, 1993.

Langelier Y., Champoux L., Hamel M., Guilbault C., Lamarche N., Gaudreau P., *The R1 Subunit of Herpes Simplex Virus Ribonucleotide Reductase is a Good Substrate for Host Cell Protein Kinases but is not Itself a protein Kinase*, Journal of Biological Chemistry, 273;3, 1435-43, 1998.

Langelier Y., Bergeron S., Lippens J., Gervais A., Guilbeault C, Denis S, Mosser D.D., Massie B., *The R1 Subunit of Herpes Simplex Virus Ribonucleotide Reductase Protects Cells Against Apoptosis Induced by TNF- α and Fas-L*, soumis pour publication, 2000.

Ledgerwood E.C., Pober J.S., Bradley J.R., *Recent Advances in the Molecular Basis of TNF Signal Transduction*, Laboratory Investigation, 79;9, 1041-1050, 1999.

Lee S.Y. Choi S., *Traf-interacting protein (TRIP): a novel Component of the Tumor Necrosis Factor Receptor (TNFR) and CD-30-TRAF Signaling complexes that Inhibits TRAF2-mediated NF- κ B activation*, Journal of experimental Medecine 185, 1275-1285, 1997.

Levine A.J., *p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division*, Cell, 88, 323-331, 1997.

Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S., Wang X., *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/capase 9 complex Initiates an Apoptotic protease Cascade*, Cell, 14;91(4), 479-89, 1997.

Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., Wang X., *Bid, a Bcl2 Interacting protein, mediates Cyochrome c Release from Mitochondria in Response to Activation of Cell Surface Death Receptors*, Cell, 94, 481-490, 1998.

Malek N.P. et.al., *Molecular Mechanisms of TNF Receptor-Mediated Signaling*, Recent Results In Cancer Research, 147, 97-106, 1998.

Malinin N.L., Boldin M.P., Kovalenko A.V., Wallach D., *MAP3K-related Kinase Involved in NF- κ B Induction by TNF, CD95 and IL-1*, Nature, 385, 540-544, 1997.

Massie B., Lamarche N., Dionne J., Fleurent J., Langelier Y., *Improved Adenovirus Vector Provides Herpes Simplex Virus Ribonucleotide Reductase R1 and R2 Subunits Very Efficiently*, Biotechnology, 13, 602-607, 1993.

Meikrantz W., Bergom M.A., Memishoglu A., Samson L., *O⁶-Alkylguanine DNA lesions trigger Apoptosis*, Carcinogenesis, 19;2, 369-372, 1998.

- Miller L.J., Marx J., *Apoptosis*, Science, 281, 1301-1302, 1998.
- Nava V.E., Cheng E.H., Veluona M., Zou S., Clem R.J., Mayer M.L., Hardwich J.M., *Herpesvirus saimiri Encodes a Functional Homolog of the Human bcl-2 Oncogene*, Journal of Virology, 71, 4118-4122, 1997.
- Natoli G et.al., *Apoptotic, Non-Apoptotic, and Anti-Apoptotic Pathways of Tumor Necrosis Factor Signaling*, Biochemical Pharmacology, 56, 915-920, 1998.
- Oliver B., *Biochemical Pathways of Caspase Activation During Apoptosis*, Annual Review of Cell Development Biology, 15, 269-290, 1999.
- Perng G.C., Jones C., Ciacci-Zanella J., Stone M., Henderson G., Yukht A., Slanina S.M., Hofman F.M., Ghiasi H., Nesburn A.B., Wechsler S.L., *Virus-Induced Neuronal Apoptosis Blocked by the Herpes Simplex Virus Latency-Associated Transcript*, Science 2000, 25;287(5457),1500-1503, 2000.
- Rothe M., Pan M.G., Henzel W.J., Ares T.M., Goeddel D.V., *The TNFR-2-TRAF signalling Complex Contains two Novel Proteins Related to Baculoviral Inhibitor of Apoptosis Proteins*, Cell, 83, 1243-1252, 1995.
- Scaffidi C., Medema J.P., Krammer P.H., Peter M.E., *FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b*, Journal of Biological Chemistry, 272(43), 26953-26958, 1997.
- Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., Friesen C., Li F., Tomaselli K.J., Debatin K.M., Krammer P.H., Peter M.E., *Two CD95 (APO-1/Fas) signalling pathways*, EMBO Journal, 17, 1675-7687, 1998.
- Schreiber M., Sedger L., G., *Distinct Domains of M-T2, the Myxoma Virus Tomor Necrosis Factor (TNF) Receptor Homolog, mediate Extracellular TNF Binding and Intracellular Apoptosis Inhibition*, Journal of Virology, 71, 2171-2181, 1997.
- Shimeld C., Whiteland J.L., Williams N.A., Easty D.L., Hill T.J., *Reactivation of Herpes Simplex Type I in the Mouse Trigeminal Ganglion: and In Vivo Study of Virus Antigen and Immune Cell Infiltration*, Journal of General Virology, 77, 2583-2590, 1996.
- Smith C.C., Peng T., Kulka M., Aurelian L., *The PK Domain of the Large Subunit of Herpes Simplex Virus Type II Ribonucleotide Reductase (ICP-10) is Required for Immediate-Early Gene Expression and Virus Growth*, Journal of Virology, 72;11, 9131-9141, 1998.
- Smith C.C., Aurelian L., *The Large Subunit of Herpes Simplex Virus Type 2 Ribonucleotide Reductase (ICP10) is Associated with the Virion Tegument and Has PK Activity*, Virology, 4;234(2), 235-42, 1997.

Smith C.C., Luo J.H., Aurelian L., *The Proteing Kinase Activity of the Large Subunit of Herpes Simplex Virus Type 2 Ribonucleotide Reductase (ICP10) Fused to the Extracellular Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor is Ligand-Inducible*, *Virology*, 15;217(2), 425-34, 1996.

Steiner I., Kennedy P.G.E., *Molecular Biology of Herpes Simplex Virus Type I Latency in the Nervous System*, *Molecular Neurobiology*, 7, 137-158, 1993.

Steiner I., Spivack J.G., Deshmane S.L., Ace C.I., Preston C.M., Fraser N.W., *A Herpes Simplex Virus Type I Mutant Containing a Non Transducing Vmw65 Protein Establishes Latent Infection In Vivo in the Absence of Viral Replication and Reactivates Efficiently from Explanted Trigeminal Ganglia*, *Journal of Virology*, 64, 1630-1638, 1990.

Stevens J.G., *Human Herpesviruses: A Consideration of the Latent State*, *Microbiology*, 53, 318-322, 1989.

Subak-Sharpe J.H., Dargan D.J., *HSV Molecular Biology: General Aspects of Herpes Simplex Virus Molecular Biology*, *Virus Genes*, 16;3, 239-251, 1998.

Teodoro J., Branton P., *Regulation of Apoptosis by Viral Gene Products*, *Journal of Virology*, 71;3, 1739-1746, 1997.

Thome M., Schneider P., Hofmann K., Fickenscher H., Meini E., Neipel F., Mattmann C., Burns K., Bodmer J.L., Schroter M., *Viral FLICE-inhibitory Proteins (FLIPs) prevent Apoptosis Induced by Death Receptors*, *Nature*, 386, 517-521, 1997.

Thornberry N.A., Rano T.A., Peterson E.P., Rasper D.M., Timkey T., Garcia-Calvo M., Houtzager V.M., Nordstrom P.A., Roy S., Vaillancourt J.P., Chapman K.T., Nicholson D.W., *A combinatorial Approach defines Specificities of Members of the Caspase Family and Granzyme B. Functional Relationships established for Key Mediators of Apoptosis*, *Journal of Biological Chemistry*, 18;272(29), 17907-17911, 1997.

Thornberry N.A., Lazebnik Y., *Caspases: Enemies Within*, *Science*, 281, 1312-1316, 1998.

Tschopp J.L., Thome M., Hofmann K., Meini E., *The Fight of Viruses Against Apoptosis*, *Current Opinion in Genetics & Development*, 8, 82-87, 1998.

Uren A.G., Coulson E.J., Vaux D.L., *Conservation of Baculovirus Inhibitor of Apoptosis repeat Proteins (BIRPs) in viruses, nematodes, Vertebrates and Yeasts*, *Trends in Biochemical Science*, 23;5, 159-62, 1998.

Valyi-Nagy T., Deshmane S., Dillner A., Fraser N.W., *Induction of Cellular Transcription Factors in Trigeminal Ganglia of Mice by Corneal Scarification, Herpes Simplex Virus Type I Infection, and Explantation of Trigeminal Ganglia*, *Journal of Virology*, 65, 4142-4152, 1991.

- Van Antwerp D.J., *Suppression of TNF- α induced apoptosis by NF- κ B*, Science, 274, 787-789, 1996.
- Wallach D., Varfolomeev E., Malinin N.L., Goltsev Y.V., Kovalenko A.V., Boldin M.P., *Tumor Necrosis Factor Receptor and Fas Signaling Mechanisms*, Annual Review in Immunology, 17, 331-367, 1999.
- Yamada Y., Kimura H., Morishima T., Daikoku T., Maeno K., *The Pathogenicity of Ribonucleotide Reductase-Null Mutants of Herpes Simplex Virus Type I in Mice*, The Journal of Infectious Diseases, 164, 1091-1097, 1991.
- Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C.N., Ibrado A.M., Cai J., Peng T.I., Jones D.P., Wang X., *Prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked*, Science, 275, 1129-1132, 1997.
- Zhou Q., Snipas S., Orth K., Muzio M., Dixit V.M., Salvesen G.S., *Target Protease Specificity of the Viral Serpin CrmA. Analysis of Five Caspases*, Journal of Biological Chemistry, 272, 7797-7800, 1997.