

2 m 11. 2902. 1

Université de Montréal

Une délétion du domaine NH₂ de la R1 de la ribonucléotide réductase
des HSV produit une protéine agrégée et proapoptotique

par

Sonia Chiasson

Programme de biologie moléculaire
Faculté des études supérieures

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



Avril 2001

© Sonia Chiasson 2001

QH
506
N54
2001
N.017

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire de maîtrise intitulé :

Une délétion du domaine NH₂ de la R1 de la ribonucléotide réductase
des HSV produit une protéine agrégée et proapoptotique

présenté par
Sonia Chiasson

à été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Richard Bertrand: président rapporteur

Dr. Carolina Alfieri: membre du jury

Dr. Yves Langelier: directeur

Mémoire accepté le :

Sommaire

La ribonucléotide réductase (RR) est une enzyme qui catalyse la réduction des ribonucléotides (NDPs) en leurs désoxyribonucléotides (dNDPs) correspondants. La sous-unité R1 de la RR des HSV a la particularité, si on la compare avec la R1 de d'autres espèces (Fig. 1), d'avoir une extension d'environ 350 a.a. à l'extrémité NH₂ non-essentielle à l'activité réductase de l'enzyme. Des travaux réalisés dans le laboratoire par mes prédécesseurs ont révélé qu'une délétion de ce domaine NH₂ (du 2^o au 357^o a.a.) dans la sous-unité R1 de HSV-2 génère une protéine R1(Δ 2-357) qui induit l'apoptose dans les cellules A549tTA (Massie *et al.*, 1998). Ils ont également confirmé que la R1 pleine longueur inhibe l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) et celle induite par le Fas-L et le TNF- α (Bergeron, 1998). Le principal but de cette étude fut d'élucider le mécanisme par lequel la R1(Δ 2-357) induit l'apoptose et comprendre comment la R1 protège de l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357), le Fas-L et le TNF- α .

Dans le présent document, nous présentons des évidences que la R1(Δ 2-357) est une protéine agrégée (formation de grandes inclusions cytoplasmiques, insolubilité) laissant ainsi suggérer que la délétion du domaine NH₂ expose des sites hydrophobes normalement maintenus à l'intérieur de la structure de la R1 et affecte ainsi la capacité de la protéine à se replier correctement. Cependant, l'étude de la toxicité et de la solubilité de protéines R1 Δ s plus courtes (délétion du 2^o a.a. jusqu'à la position 398 et 496) a permis de constater qu'il n'y a pas de corrélation entre l'insolubilité des R1 Δ s et leur toxicité.

Nous avons également observé que la carence en sérum et l'addition de cycloheximide sensibilisent les cellules A549tTA à l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) tandis que la protéine antiapoptotique adénovirale E3-14.7kDa protège de l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357). Un choc thermique et la surexpression de la protéine HSP70 seul ne diminue pas l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357). L'augmentation de l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) en présence de clasto-lactacystine- β -lactone soulève l'hypothèse que les agrégats ou les intermédiaires de repliement de R1 Δ s pourraient agir comme inhibiteurs compétitifs du protéasome 26S

ce qui affecterait la dégradation de protéines régulatrices impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire ou de l'apoptose comme p53, p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, Bax, Bik et la cycline B (Pagano *et al.*, 1995; Yaglom *et al.*, 1995; Deshaies *et al.*, 1995; Scheffner *et al.*, 1993; Seufert *et al.*, 1995; Li et Dou, 2000; Marshansky *et al.*, 2001).

L'ensemble des résultats de cette étude nous permettent d'affirmer qu'il n'y a pas de corrélation directe entre la capacité de la R1(Δ 2-357) à former des agrégats et sa toxicité. La formation de grandes inclusions serait un phénomène général dû à l'accumulation de protéines agrégées. Il est même possible que la formation d'inclusions protège les cellules de l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) en empêchant la dispersion de la protéine agrégée. En effet, les inclusions de R1(Δ 2-357) sont observées dans les cellules qui survivent à l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357). En plus, la R1(Δ 2-357) stimule l'activation de la caspase 8 et l'apoptose avant que les agrégats de R1(Δ 2-357) ne soient observables par microscopie à l'immunofluorescence.

L'étude de l'activation des caspases par les R1 Δ s nous a permis de conclure qu'il n'y a pas de cascade d'activation des caspases commune à ces protéines agrégées. Cependant, il y a activation et relocalisation de la caspase 8 au niveau des inclusions de R1(Δ 2-357). En plus d'interférer dans la localisation de la R1(Δ 2-357), le potentiel antiapoptotique de la R1 se manifeste en empêchant l'activation des caspases par les R1 Δ s et le recrutement de la caspase 8 au niveau des inclusions de R1(Δ 2-357). La découverte récente par notre laboratoire que la R1 possède une région homologue au domaine α -crystallin des SHSPs (petites protéines chaperonnes induites par un choc thermique) ouvrent de nouvelles possibilités pour expliquer le potentiel antiapoptotique de la R1.

Table des matières

	page
Sommaire.....	i
Table des matières.....	iii
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux.....	x
Liste des sigles et abréviations.....	xi
Avant-propos.....	xiv
1. Introduction.....	1
1.1 Les virus Herpes simplex	2
1.2 La ribonucléotide réductase.....	3
1.2.1 Caractéristiques et fonction de l'enzyme.....	3
1.2.2 La RR des virus herpes simplex.....	3
1.2.3 Le domaine NH ₂	5
1.3 L'apoptose.....	5
1.3.1 Régulation de l'apoptose.....	6
1.3.2 Les caspases.....	6
1.3.3 Les phases de l'apoptose.....	7
1.3.4 Les récepteurs de mort cellulaire.....	7
1.3.5 Les protéines adénovirales antiapoptotiques	8
1.4 L'agrégation des protéines.....	9
1.4.1 Maladies associées à l'agrégation de protéines.....	10
1.4.1.1 Maladies associées aux répétitions CAG.....	10
1.4.1.2 Recrutement des chaperonnes et constituants du protéasome.....	11
1.4.1.3 Inclusions de protéines agrégées et apoptose.....	11
1.4.2 Le protéasome.....	12
1.4.2.1 Description et fonction.....	12

1.4.2.2 Les inhibiteurs de protéasomes.....	13
1.4.3 Les protéines chaperonnes induites par un choc thermique (HSPs).....	14
1.4.3.1 Les différentes classes de HSPs.....	14
1.4.4 Les petites protéines chaperonnes induites par un choc thermique (SHSPs).....	15
1.4.4.1 Fonctions et caractéristiques des SHSPs.....	15
1.4.4.2 La structure moléculaire.....	16
1.4.4.3 L'activité chaperonne des SHSPs.....	17
1.5 Description du projet.....	18
2. Matériel et méthodes.....	21
2.1 Cellules.....	22
2.2 Vecteurs adénovirus.....	22
2.3 Vecteurs pour les transfections.....	23
2.4 Transfections.....	23
2.5 Détermination des pourcentages de transfection.....	24
2.6 Infections.....	24
2.7 Quantification de l'apoptose.....	25
2.8 Quantification des protéines R1 et R1Δs.....	27
2.8.1 Récolte des cellules.....	27
2.8.2 Séparation des protéines sur gel SDS-Page et immunodétection.....	28
2.8.3 Quantification des protéines.....	29
2.9 Immunofluorescence.....	29
2.10 Microscopie électronique.....	30
2.11 Carence de sérum.....	31
2.12 Traitement avec cycloheximide.....	31
2.13 Choc thermique.....	31
2.14 Traitement avec la clasto-lactacystine-β-lactone.....	32
2.15 Essais caspases.....	32
2.16 Immunodétection de la procaspase 8 et de FADD.....	33

2.17 Ubiquitination des protéines.....	33
3. Résultats.....	34
3.1 L'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) n'implique pas des protéines de l'adénovirus.....	35
3.2 Effet de la carence en sérum et l'addition de cycloheximide sur l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) dans les cellules A549tTA.....	40
3.3 Etude du potentiel proapoptotique des protéines R1(Δ 2-357), R1(Δ 2-399) et R1(Δ 2-496) et de l'effet antiapoptotique de la R1.....	44
3.4 Localisation des protéines R1 et R1(Δ 2-357) à l'immunofluorescence et en microscopie électronique.....	49
3.5 Solubilité de la protéine R1 et des R1 Δ s.....	54
3.6 Effet de la clasto-lactacystine- β -lactone sur l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) et ubiquitination des protéines R1 Δ s.....	59
3.7 Effet du choc thermique et de l'expression de la protéine HSP70 ou de la protéine antiapoptotique adénovirale E3-14.7kDa sur l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357).....	63
3.8 Effet des R1 Δ s et de la R1 sur l'activation des caspases.....	68
3.9 Mécanisme d'induction de l'apoptose de la R1(Δ 2-357).....	75
4. Discussion.....	77
4.1 Étude du potentiel proapoptotique de la R1(Δ 2-357).....	78
4.1.1 La mortalité induite par la R1(Δ 2-357) n'implique pas des protéines de l'adénovirus.....	79
4.1.2 Hypothèse du domaine proapoptotique.....	79
4.1.3 Hypothèse de l'agrégation de protéines.....	80
4.1.4 Création de protéines R1 Δ s plus courtes.....	80
4.1.5 Les R1 Δ s sont des protéines agrégées.....	81
4.1.6 Relation entre l'agrégation de R1(Δ 2-357) et l'apoptose.....	82
4.1.7 Constitution des agrégats de R1(Δ 2-357).....	83

4.1.8	Effet d'un choc thermique moyen et de la surexpression de HSP70 sur l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357).....	84
4.1.9	Effet de la carence en sérum, de la cycloheximide et de la protéine adénovirale E3-14.7kDa sur l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357).....	85
4.2	Mécanisme d'induction de l'apoptose par les R1 Δ s.....	86
4.2.1	Activation des caspases par les R1 Δ s.....	86
4.2.2	Recrutement de la procaspase 8 au niveau des inclusions de R1(Δ 2-357).....	86
4.2.3	Modèle de saturation du protéasome par la R1(Δ 2-357).....	87
4.3	Mécanisme de protection de la R1.....	89
4.3.1	La R1 empêche l'activation et la relocalisation de la caspase 8 au niveau des inclusions de R1(Δ 2-357).....	89
4.3.2	Modèle du domaine α -cristallin.....	89
4.4	Perspectives et conclusions.....	91
5.	Bibliographie.....	95

Liste des figures

	Page
Figure 1 La R1 des HSV-1 et -2 possède un domaine NH ₂ unique.....	4
Figure 2 Délétions effectuées sur la sous-unité R1 de HSV-2.....	20
Figure 3 L'expression de la R1(Δ 2-357) suite à des transfections induit l'apoptose dans les cellules HelatTA.....	38
Figure 4 L'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) augmente dans les cellules A549tTA carencées en sérum.....	42
Figure 5 La cycloheximide augmente l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) dans les cellules A549tTA.....	43
Figure 6 Quantification des R1 Δ s par immunodétection.....	47
Figure 7 Étude du potentiel antiapoptotique de la R1 contre l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357), R1(Δ 2-398) et la R1(Δ 2-496) dans les cellules A549tTA.....	48
Figure 8 Localisation des protéines R1 et R1(Δ 2-357) à l'immunofluorescence....	51
Figure 9 Localisation des protéines R1 et R1(Δ 2-357) en microscopie électronique.....	52
Figure 10 Quantification de la R1 et des R1 Δ s au bleu de Coomassie.....	56

Figure 11	Quantification de la R1 et des R1Δs par immunodétection.....	57
Figure 12	La clasto-lactacystine-β-lactone augmente l'apoptose induite par la R1(Δ2-357).....	61
Figure 13	Les protéines R1(Δ2-357), R1(Δ2-398) et R1(Δ2-496) sont des protéines ubiquitinées	62
Figure 14	Un choc thermique moyen ne diminue pas l'apoptose induite par la R1(Δ2-357) dans les cellules A549tTA.....	65
Figure 15	La surexpression de HSP70 ne protège pas les cellules A549tTA de l'apoptose induite par la R1(Δ2-357).....	66
Figure 16	Effet de la protéine adévirale antiapoptotique E3-14.7kDa sur l'apoptose induite par la R1(Δ2-357) et Fas-L.....	67
Figure 17	La R1(Δ2-357) mène au clivage de la procaspase 8.....	71
Figure 18	Effet de la R1 et des protéines agrégées R1(Δ2-357), R1(Δ2-398) et R1(Δ2-496) sur l'activation des caspases 3, 8 et 6/9 dans les cellules A549tTA.	72
Figure 19	Pourcentages d'activités caspases maximales dans les extraits de R1(Δ2-357).....	74
Figure 20	Recrutement de la procaspase 8 et de FADD par les agrégats de R1(Δ2-357).....	76

Figure 21 Alignement des protéines R1 de HSV-1 et -2 et des domaines α -crystallin des SHSPs HsHSP27, HsH11, HsALP-A-CRYS, HsALP-B-CRYS et MJHSP16.5.....	94
--	----

Liste des tableaux

	Page
Tableau I Résumé des quantifications réalisées par immunodétection et au bleu de Coomassie des protéines R1 et R1Δs lors des infections simples et des coinfections avec Ad5TR5-R1.....	58

Liste des sigles et abréviations

a.a.	: acides aminés
ADN	: acide désoxyribonucléique
ADP	: adénosine 5'-diphosphate
BSA	: albumine de sérum bovin ("bovine serum albumine")
<i>C. elegans</i>	: le nématode <i>Caenorhabditis elegans</i>
CFTR	: protéine transmembranaire impliquée dans la fibrose kystique ("cystic fibrosis transmembrane conductance regulator")
CMH	: complexe majeur d'histocompatibilité
DD	: domaine de mort cellulaire ("death domain")
DED	: domaine effecteur de mort cellulaire ("death effector domain")
DISC	: complexe de mort cellulaire ("death inducing signal complex")
DMEM	: "Dulbeco's minimum essential medium"
dNDPs	: désoxyribonucléotides
DRM	: myopathie reliée à la desmine ("desmin related myopathy")
DRPLA	: atrophie dentatorubrale et pallidoluysiane ("dentatorubral and pallidoluysian atrophy")
DTT	: 1,4-dithiotréitol
EBV	: virus Epstein-Barr
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
Fas-L	: ligand du récepteur Fas
GFP	: protéine verte fluorescente ("green fluorescent protein")
GST	: glutathione-S-transférase
h	: heure
HD	: maladie d'Huntington (Huntington's disease)
HEPES	: N-[hydroxyéthyle] pipérazine-N'-[acide 2-éthanesulfonique]
hrp	: peroxydase de raifort ("horse radish peroxydase")
HSPs	: protéines chaperonnes induites par un choc thermique ("heat shock protein")

HSV	: virus Herpes simplex
IP	: inhibiteurs de protéasomes
JNK	: kinase de stress N-terminale à c-Jun ("c-Jun N-terminal kinase")
kDa	: kilodalton
l	: litre
LAT	: transcripts associés à la latence ("latency-associated transcripts")
Lc	: clasto-lactacystine- β -lactone
mA	: milliampères
min	: minutes
ml	: millilitre
mm	: millimètre
mM	: millimolaire
MDa	: mégadalton
MOI	: multiplicité d'infection ("multiplicity of infection")
MTOC	: centre organisateur des microtubules (" <u>m</u> icro <u>t</u> ubule- <u>o</u> rganizing center")
μ g	: microgramme
μ l	: microlitre
NDPs	: ribonucléotides
PARP	: poly(ADP-ribose) polymérase
PBS	: tampon phosphate salin ("Phosphate buffered saline")
PCT	: protéines cellulaires totales
PFU	: unité formant une plaque ("plaque forming unit")
p.i.	: post-infection
PK	: phosphate kinase
p.t.	: post-transfection
R1	: grande sous-unité de la RNR de HSV-2
R1(Δ 2-357)	: grande sous-unité délétée des a.a. 2 à 357
R1(Δ 2-399)	: grande sous-unité délétée des a.a. 2 à 399
R1(Δ 2-496)	: grande sous-unité délétée des a.a. 2 à 497
R2	: petite sous-unité de la RNR

RE	: réticulum endoplasmique
ROS	: ("reactive-oxygen species")
RR	: ribonucléotide réductase
rpm	: révolution par minute
SBMA	: l'atrophie musculaire spinale bulbare ("spinal bulbar muscular atrophy")
SCA	: ataxie spinocérébelleaire ("spinocerebellar ataxia")
SDS	: dodécyle sulfate de sodium
SDS-Page	: électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
sec	: secondes
SHSPs	: petites protéines chaperonnes induites par un choc thermique ("small heat shock proteins")
sng	: surnageant
SVF	: sérum de veau fétal
T°	: température
TNF	: "tumor necrosis factor"
tTA	: "tetracycline trans-activator"
TRIS	: tri(hydroxyméthyle) aminométhane
U.V.	: ultra violet
V	: volt
VZV	: virus de la varicelle et du zona

Avant-propos

Plusieurs études ont démontré que les virus herpes simplex peuvent à la fois induire ou inhiber l'apoptose (Shen et Shek, Rev. 1995; Leopardi et Roizman, 1996; Koyama et Miwa, 1997). Au moins trois produits de gènes viraux (ICP27, ICP4 et U_S3) sont connus pour protéger certaines cellules contre l'apoptose (Aubert et Blaho, 1999; Leopardi et Roizman, 1996; Leopardi *et al.*, 1997). La découverte récente par notre laboratoire que la R1 de la ribonucléotide réductase de HSV-2 protège les cellules A549tTA de l'apoptose induite par le Fas-L et le TNF- α (Langelier *et al.*, 2001), suggère que cette protéine permettrait à des cellules infectées par HSV d'échapper à la surveillance du système immunitaire.

La R1 de la RR de HSV-1 et -2 se distingue de la R1 de d'autres espèces (Fig. 1) par une extension unique de 350 a.a. à l'extrémité NH₂. En procédant à une délétion de cette extension (du 2^e au 357^e a.a.), nous avons constaté que la protéine ainsi générée R1(Δ 2-357) induisait l'apoptose dans les cellules A549tTA. Nos premières expériences ont ensuite démontré que la protéine R1(Δ 2-357) formait de grandes inclusions cytoplasmiques tandis que la R1 est localisée de manière diffuse dans le cytoplasme.

Ces structures de protéines R1(Δ 2-357) agrégées rappellent la formation d'inclusions intracellulaires de protéines ubiquitinées observées dans les maladies associées aux répétitions de polyglutamines. En effet, les maladies associées aux répétitions de polyglutamines comme la maladie d'Huntington, l'ataxie spinocérébelleaire et l'atrophie musculaire spinale bulbaire se caractérisent par l'atrophie et la perte de populations neuronales spécifiques par apoptose et par la formation d'inclusions contenant la protéine mutante polyglutamines (Skinner *et al.*, 1997; Mangiarini *et al.*, 1997). De plus, il y a une redistribution des protéines chaperonnes et des constituants du protéasome dans ces inclusions (Cummings *et al.*, 1998; Stenoien *et al.*, 1999).

L'agrégation des protéines a été associée à plusieurs autres pathologies comme les maladies de neurodégénérescence incluant le Parkinson, l'Alzheimer, les maladies associées aux prions, la fibrose kystique, la formation de cataractes et la

myopathie reliée à la desmine (Renkawek *et al.*, 1999; Carrol et Lomas, 1997; Radford et Dobson, 1999; Wigley *et al.*, 1998; Litt *et al.*, 1998; Quinlan et Van Den Ijssel, 1999). Toutes ces pathologies se caractérisent aussi par l'accumulation d'une protéine mal repliée dans le noyau ou le cytoplasme des cellules (Kaytor et Warren, 1999). Le mécanisme par lequel l'agrégation de protéines pourrait tuer les cellules ou encore être responsable de ces maladies, reste encore très controversé.

1. Introduction

1.1 Les virus Herpes simplex

Les virus herpes simplex 1 et 2 (HSV-1 et -2) sont des virus à ADN bicaténaire linéaire enveloppés (Kieff *et al.*, 1971). Ils infectent préférentiellement les cellules épithéliales de la région labiale (HSV-1) ou génitale (HSV-2) pour s'y répliquer. La mort subséquente des cellules infectées se manifeste par l'apparition de lésions vésiculeuses. Les virus ainsi produits dans les lésions primaires vont ensuite infecter les terminaisons nerveuses et voyager jusqu'au noyau des neurones où ils peuvent entrer dans un état de latence (Cook et Stevens, 1973). Les génomes viraux persistent alors dans les neurones sous une forme circulaire ou concatamérique (Stevens, 1989). L'expression de tous les gènes viraux est réprimée lors de l'infection latente sauf dans la région codant pour les transcrits associés à la latence (LATs) qui est encore active (García-Blanco *et al.*, 1991).

Des études ont démontré que les LATs sont essentiels pour une réactivation efficace des virus herpes dans les neurones (Perng *et al.*, 1994; Perng *et al.*, 1999). Les LATs pourraient ainsi protéger ces cellules de l'apoptose induite par l'infection avec HSV-1, permettant ainsi aux virus d'entrer en latence dans plusieurs neurones. Au moins trois autres produits de gènes viraux, ICP27 (Aubert et Blaho, 1999), ICP4 (Leopardi et Roizman, 1996) et U_S3 (Leopardi *et al.*, 1997), sont connus pour protéger certaines cellules contre l'apoptose. Plusieurs études ont aussi démontré que les virus herpes simplex peuvent à la fois induire ou inhiber l'apoptose (Shen et Shenk, 1995; Leopardi et Roizman, 1996; Koyama et Miwa, 1997; Mastino *et al.*, 1997; Galvan et Roizman, 1998). Nous savons notamment que plusieurs lignées cellulaires manifestent des caractéristiques de l'apoptose telle la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine lorsqu'elles sont infectées avec un virus HSV-1 mutant délété pour les gènes U_S3 et α 4 (Leopardi et Roizman, 1996; Galvan et Roizman, 1998). Ces mêmes lignées cellulaires ne manifestent pas de signes d'apoptose lorsqu'elles sont infectées avec HSV-1 WT. En plus, il a été démontré qu'une infection avec HSV-1 WT protège certaines lignées cellulaires de l'apoptose induite par l'anticorps anti-Fas, le TNF- α , le sorbitol et/ou un choc thermique (Galvan et Roizman, 1998; Mastino *et al.*, 1997). Des études (Galvan et Roizman,

1998; Zhou et Roizman, 2000) ont aussi suggéré que les HSV pourraient induire l'apoptose à plusieurs niveaux. Les HSV auraient donc développé différents mécanismes afin de bloquer l'apoptose et assurer la production de nouveaux virus. La découverte récente par notre laboratoire que la R1 protège les cellules A549tTA de l'apoptose induite par le Fas-L et le TNF- α (Langelier *et al.*, 2001), suggère que cette protéine permettrait à des cellules infectées par HSV d'échapper à la surveillance du système immunitaire.

1.2 La ribonucléotide réductase

1.2.1 Caractéristiques et fonction de l'enzyme

La ribonucléotide réductase (RR) est une enzyme essentielle à la synthèse de l'ADN. Elle catalyse la réduction des ribonucléotides (NDPs) en leurs désoxyribonucléotides (dNDPs) correspondants (Fontecave, Review 1998). La RR de classe I retrouvée chez les mammifères, *E. coli*, et quelques virus à ADN comme certains herpesviridae (HSV, EBV, VZV), est une holoenzyme de type $\alpha_2\beta_2$ formée par l'association de deux sous-unités non-identiques nommées R1 et R2 (Fontecave *et al.*, Review 1992). La grande sous-unité R1 contient le site catalytique composé de cystéines tandis que la petite sous-unité R2 contient deux centres ferriques dinucléaires essentiels pour la formation de radicaux tyrosyl libres (Elledge *et al.*, Review, 1992; Uhlin et Eklund, 1994). La réduction du ribose nécessite un transfert de radicaux libres de la R2 au site catalytique. Les électrons nécessaires pour la réduction du ribose sont fournis par les cystéines du site catalytique (Jordan et Reichard, Review 1998; Uhlin et Eklund, 1994). Les cystéines ainsi oxydées sont ensuite réduites par des donneurs d'hydrogène, la thiorédoxine et la glutarédoxine (Holmgren, Review 1985 et 1989).

1.2.2 La RR des virus herpes simplex

La RR des virus herpes simplex de type 1 et 2 (HSV-1 et -2) est aussi constituée de deux sous-unités nommées R1 et R2 qui doivent s'associer pour former

l'holoenzyme active (Boehmer et Lehman, Review 1997; Elledge *et al.*, 1992). Des études ont démontré que la RR est essentielle pour la réplication de l'ADN viral dans les cellules non en division et nécessaire pour une réactivation efficace dans les neurones (Jacobson *et al.*, 1989; Yamada *et al.*, 1991). La RR des HSV-1 et -2 n'est pas régulée allostériquement contrairement à la RR des mammifères et de *E. coli* (Fontecave, Review 1998). Bien qu'elle possède des homologies plus ou moins grandes avec la R1 de VZV (Nikas *et al.*, 1986), EBV (Baer *et al.*, 1984; Gibson *et al.*, 1984) et *E. coli* (Carlson *et al.*, 1984; Sjöberg *et al.*, 1985), la sous-unité R1 de la RR de HSV-1 et -2 se distingue par une extension d'environ 350 a.a. à l'extrémité NH₂ (Fig. 1) qui est non-essentielle pour l'activité réductase (Conner, MacFarlane *et al.*, 1992). En comparant les R1 de HSV-1 et -2, on remarque qu'il y a environ 38% d'homologies dans la région du domaine NH₂ et environ 90% d'homologies dans le domaine réductase (Swain et Galloway, 1986). La limite entre le domaine réductase et le domaine NH₂ n'est pas bien précisée (Conner *et al.*, 1993).

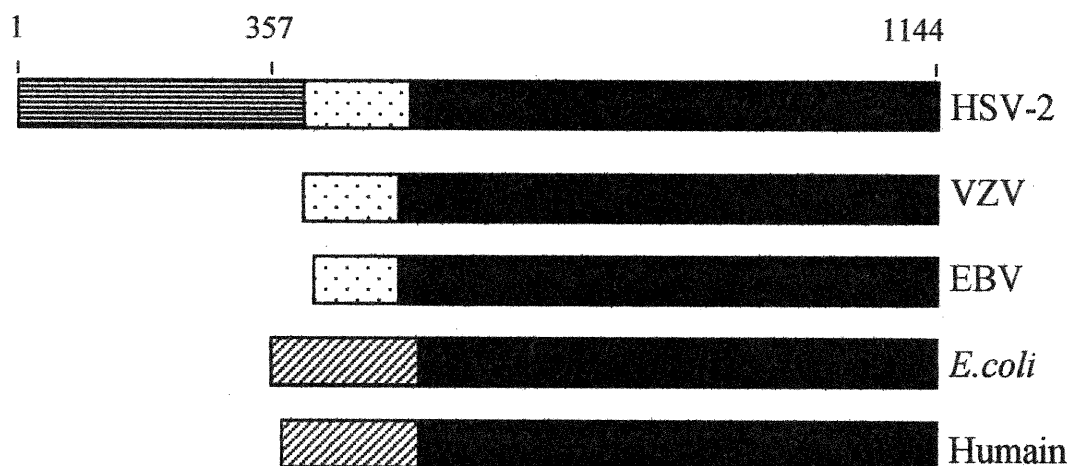


Figure 1: La R1 des HSV-1 et -2 possède un domaine NH₂ unique. Illustration de la sous-unité R1 de la ribonucléotide réductase de virus de la famille des herpesviridae comme le virus de la varicelle et du zona (VZV), le virus Epstein-Barr (EBV) et le virus herpes simplex de type 2 (HSV-2), ainsi que la R1 de *E. coli* et humaine. La région en noire représente le domaine réductase; la région rayée à l'horizontale est le domaine NH₂ de HSV-2; la région en pointillée représente la région d'homologies entre les R1 de trois herpesviridae (HSV-2, EBV et VZV) tandis que la région rayée en diagonale est la région d'homologies entre la R1 de *E. coli* et humaine.

1.2.3 Le domaine NH₂

Le domaine NH₂ de la sous-unité R1 de la RR de HSV a souvent été rapporté comme ayant une activité sérine/thréonine kinase (Paradis *et al.*, 1991; Conner, Cooper *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1998). La possibilité de se débarrasser de protéines kinases contaminantes a cependant été démontrée. En effet, la phosphorylation de la R1 entre les a.a. 1 et 245, serait plutôt le résultat de l'activité kinase de la caséine kinase 2 (CK2), une protéine copurifiant avec la R1 de HSV-2 (Langelier *et al.*, 1998).

Le rôle du domaine NH₂ dans la réplication et la pathogénèse de HSV n'a pas encore été déterminé. Cependant, plusieurs observations laissent suggérer que la R1 pourrait jouer un rôle important au tout début de l'infection, autre que son implication dans l'activité réductase de l'enzyme (Conner, 1999). Par exemple, nous savons que les deux sous-unités de la RR de HSV ont différentes cinétiques d'expression. La R2 est une protéine précoce et son pic d'expression est situé 6 à 12 h post-infection (p.i.) tandis que la R1 est une protéine très précoce, synthétisée à partir de 2 h p.i. (Clements *et al.*, 1977; Wymer *et al.*, 1989). En plus, nous savons que la localisation intracellulaire de la R1 est distincte de celle de l'enzyme active (Conner *et al.*, 1995). Récemment, notre laboratoire a observé que la R1 de la RR de HSV a un potentiel antiapoptotique (Langelier *et al.*, 2001). Le domaine réductase et le domaine NH₂ unique de la R1 de la RR de HSV sont essentiels pour son activité antiapoptotique.

1.3 L'apoptose

Deux modes de mort cellulaire sont connus: la nécrose et l'apoptose. L'apoptose est une mort cellulaire programmée qui est génétiquement conservée parmi les espèces et qui se distingue de la nécrose notamment par la formation de corps apoptotiques, la perte de volume cellulaire, la perte d'adhésion cellulaire, la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN (Jacobson, Review 1997; Raff, Review 1992). Pour ce qui est de la nécrose, elle se caractérise par l'augmentation du volume cellulaire suivi de la lyse de la cellule et de la dégradation

aléatoire de l'ADN (Kroemer *et al.*, Review 1997). Les voies de l'apoptose doivent être très bien régulées afin de maintenir l'homéostasie entre le nombre de cellules qui meurent par apoptose et le nombre de cellules qui sont produites par la multiplication cellulaire. Des problèmes peuvent survenir quand un déséquilibre se produit; c'est le cas du cancer, où il y a une prolifération cellulaire incontrôlée et des maladies de neurodégénérescence, où de nombreux neurones sont détruits par apoptose (Thompson, Review 1995; Stefanis *et al.*, Review 1997; Willie, Review 1999).

1.3.1 Régulation de l'apoptose

Les mécanismes moléculaires de base de l'apoptose ont d'abord été identifiés chez *C. elegans* où quatre gènes contrôlent le programme général de l'apoptose: Ced-9, Ced-4, Ced-3 et Egl-1 (Yuan et Horvitz, 1990 et 1992; Hengartner *et al.*, 1992). La protéine antiapoptotique Ced-9 est localisée au niveau de la mitochondrie. Elle trappe le complexe Ced-4 et Ced-3 et l'inactive. Si la protéine Egl-1 (proapoptotique) interagit avec la protéine Ced-9, le complexe Ced-4 et Ced-3 se trouve libéré dans le cytoplasme (Conradt et Horvitz, 1998). La caspase Ced-3 va alors s'autoactiver et mener à l'apoptose (Kroemer *et al.*, Review 1997). Chez les mammifères des homologues de ces protéines ont également été identifiés démontrant que ce phénomène est hautement conservé parmi les espèces animales. Par exemple, Bcl-2 et Bcl-XL sont des homologues de Ced-9 antiapoptotiques tandis que Bax et Bak sont des homologues de Ced-9 proapoptotiques (Lutz, Review 2000). Pour ce qui est des homologues de Egl-1 proapoptotiques, Bid et Bad constituent de bons exemples (Lutz, Review 2000). La protéine Apaf-1 est un homologue de Ced-4 à avoir été identifié chez l'humain (Zou *et al.*, 1997).

1.3.2 Les caspases

Pour ce qui est des homologues de Ced-3, il en existe 12 chez l'humain. Ce sont des caspases, c'est-à-dire des cystéines protéases synthétisées sous la forme de pro-enzymes qui doivent être clivées à au moins deux endroits (des résidus

aspartiques) pour être actives. L'enzyme active est un tétramère constitué de deux grosses sous-unités et de deux petites sous-unités (Stennicke et Salvesen, Review 1999). Les caspases dites activatrices (ex. caspases 8 et 9) ont des pro-domaines (DED ou CARD) à l'extrémité NH₂ ce qui permet aux caspases d'être recrutées. Les caspases effectrices (ex. caspases 3 et 7) n'ont pas de tels pro-domaines (Chang et Yang, Review 2000; Stennicke et Salvesen, Review 1999).

1.3.3 Les phases de l'apoptose

L'apoptose est constituée de trois phases. La première, la phase d'initiation, correspond à ce qui déclenche l'apoptose comme un ligand pour un récepteur de mort cellulaire ou un dommage à l'ADN. La deuxième phase est celle d'engagement ou d'activation. Durant cette phase des molécules comme Bcl-2, Bax et Bcl-XL sont impliquées dans la décision de la cellule à mourir ou à survivre. Dans le cas où l'apoptose serait déclenchée, les caspases activatrices se trouvent alors clivées. Ensuite vient la phase d'exécution où la cellule entre vraiment en apoptose. Les caspases effectrices sont activées et elles vont digérer leurs substrats cellulaires qui sont soit cytoplasmiques, nucléaires ou organelles (Kroemer *et al.*, Review 1997; Jacobson, Review 1997).

1.3.4 Les récepteurs de mort cellulaire

Plusieurs voies peuvent mener à l'apoptose comme celle qu'emprunte l'activation des récepteurs de mort cellulaire. Les récepteurs les mieux connus sont ceux de Fas et du TNF. Quand le récepteur Fas est activé par la liaison de son ligand FasL, il y a trimérisation du récepteur et recrutement de la protéine FADD au niveau du domaine de mort (DD) du récepteur (Singh *et al.*, Review 1998). La protéine FADD qui a également un DD et un DED ("death effector domain") peut ensuite recruter la caspase 8 grâce à son DED (Muzio *et al.*, 1996). Une fois la caspase 8 liée et activée, elle peut cliver et activer des caspases effectrices comme les caspases 3, 6 et 7 (Srinivasula *et al.*, 1996).

Pour ce qui est du récepteur TNF, son principe d'activation est sensiblement le même que celui du récepteur Fas. Dans ce cas-ci, le ligand est le TNF- α et une fois le récepteur dimérisé, il y aura recrutement et activation des protéines TRADD, suivi de RIP, RAIDD/CRADD et finalement de la caspase 2 ou encore de TRADD/FADD et de la caspase 8 (Ahmad *et al.*, 1997; Singh *et al.*, Review 1998). L'activation du récepteur TNF initie l'apoptose et active simultanément le facteur de transcription NF- κ B qui supprime l'apoptose en induisant l'expression de la protéine Bcl-X_L (Glasgow *et al.*, 2001; Mori *et al.*, 2001). NF- κ B est aussi impliqué dans la réponse inflammatoire en activant la transcription de plusieurs gènes (Baker et Reddy, Review 1998; Santoro, Review 1999).

1.3.5 Les protéines adénovirales antiapoptotiques

L'adénovirus code pour plusieurs protéines qui protègent de l'apoptose induite par le TNF- α comme E1B-19kDa, E3-14.7kDa et E3-10.4kDa/14.5kDa (Barry et McFadden, Review 1998). Jusqu'à maintenant des études suggèrent que le potentiel antiapoptotique de E1B-19kDa se manifeste d'une manière similaire aux protéines Bcl-X_L et Bcl-2 (Huang *et al.*, 1997; Barry et McFadden, Review 1998). En effet, E1B-19kDa interagit avec différentes protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2 comme Bax et Bik (Farrow *et al.*, 1995; Barry et McFadden, Review 1998). La localisation de E1B-19kDa au niveau des membranes du noyau et du réticulum endoplasmique semble nécessaire pour que E1B-19kDa manifeste son effet antiapoptotique (Rao *et al.*, 1997).

La protéine adénovirale E3-14.7kDa est reconnue comme étant capable de protéger de l'apoptose induite par une surexpression de Fas-L, de FADD ou de caspase 8 (Wold, Review 1993; Chen *et al.*, 1998). Jusqu'à maintenant, nous savons que la protéine E3-14.7kDa interagit avec la procaspase 8, FIP-1 (une petite protéine qui lie le GTP) et FIP-2, une nouvelle protéine avec de multiple domaines leucine-zipper (Chen *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1997), ce qui suggère que le potentiel antiapoptotique de E3-14.7kDa se manifeste en agissant au niveau de ces protéines pour empêcher l'activation subséquente des caspases effectrices menant à l'apoptose.

Pour ce qui est des protéines adénovirales 10.4k et 14.5k, nous savons que la coexpression de ces deux protéines est nécessaire pour qu'elles soient capables de protéger de l'apoptose induite par le TNF- α et le Fas-L (Shisler *et al.*, 1997; Wold, 1993). Cette interdépendance entre les deux protéines laisse suggérer qu'elles exercent leur pouvoir antiapoptotique en agissant sous la forme d'un complexe (Tollefson *et al.*, 1991). Le complexe 10.4k-14.5k induit l'internalisation et la dégradation du récepteur Fas par les endosomes ou les lysosomes (Elsing et Burgert, 1998). Par contre, il n'est pas clair si le complexe interagit directement avec le récepteur Fas ou de manière indirecte via une molécule adaptatrice associée au récepteur. Il n'est cependant pas démontré si ce complexe peut faire de même avec le récepteur du TNF- α (Elsing et Burgert, 1998).

1.4 L'agrégation des protéines

L'accumulation de protéines mal repliées peut survenir suite à plusieurs phénomènes comme un stress thermique (Vidair *et al.*, 1996), osmotique ou oxydatif (Buchner, 1996). D'autres facteurs comme une mutation dans la protéine (Wetzel, Review 1994) ou l'inhibition spécifique de la dégradation des protéines peuvent également mener à l'accumulation de protéines mal repliées qui ont le potentiel de former des agrégats (Ellis et Hartl, Review 1999; Dobson et Ellis, 1998). Les protéines mal repliées exposent à leur surface des sites hydrophobes qui sont normalement maintenus à l'intérieur de la structure de la protéine ou à l'interface avec d'autres sous-unités (Wetzel, Review 1994). L'exposition de ces sites hydrophobes dans un environnement aqueux amène les protéines à adopter des conformations alternatives non-natives, et augmente la force d'attraction entre les molécules (Clark et Muchowski, Review 2000). Ces protéines mal repliées peuvent alors interagir entre elles pour former des agrégats qui sont souvent très difficiles à dégrader ou à déplier (Clark et Muchowski, Review 2000).

1.4.1 Maladies associées à l'agrégation de protéines

Jusqu'à maintenant, l'agrégation des protéines a été associée à plusieurs pathologies comme les maladies de neurodégénérescence incluant les maladies d'Huntington (Reddy *et al.*, 1999), Parkinson (Renkawek *et al.*, 1999), Alzheimer et Creutzfeldt-Jakob (Carroll et Lomas, Review 1997); les maladies associées aux prions (Radford et Dobson, 1999), la fibrose kystique (Wigley *et al.*, 1998), la formation de cataractes (Litt *et al.*, 1998) et la myopathie reliée à la desmine (DRM) (Quinlan et Van Den Ijssel, 1999). Toutes ces maladies se caractérisent par l'accumulation d'une protéine mal repliée dans le noyau (ex. maladie d'Huntington) ou le cytoplasme (ex. Parkinson) des cellules (Kaytor et Warren, Review 1999).

1.4.1.1 Maladies associées aux répétitions CAG

Parmi ces maladies, huit d'entre elles (incluant la maladie d'Huntington (HD), l'ataxie spinocérébelleuse (SCA-1), l'atrophie musculaire spinale bulbaire (SBMA) et l'atrophie dentatorubrale et pallidoluisienne (DRPLA) sont causées par l'expansion d'une répétition de trois nucléotides (CAG) menant à la synthèse d'une protéine mutée contenant une extension de polyglutamines (Persichetti *et al.*, 1995; Orr *et al.*, 1993; Becher *et al.*, Review 1997; Stenoien *et al.*, 1999). Par exemple, lorsque le nombre de répétitions CAG excède 35 pour le gène huntingtine, celui-ci code pour une protéine menant à la maladie d'Huntington (Persichetti *et al.*, 1995). Malgré le fait que les gènes responsables et les symptômes soient différents pour chacune de ces pathologies, celles-ci possèdent plusieurs caractéristiques en commun. L'expression des protéines contenant des polyglutamines mène notamment à l'atrophie et en la perte de populations neuronales spécifiques par apoptose ainsi qu'à la formation d'inclusions contenant la protéine mutante (Skinner *et al.*, 1997; Mangiarini *et al.*, 1997).

1.4.1.2 Recrutement des chaperonnes et constituants du protéasome

Plusieurs observations suggèrent qu'au cours de ces pathologies, il y aurait une distribution différente des protéines chaperonnes et des constituants du protéasome. Les inclusions de protéines ARQ48 (récepteur androgénique responsable de la SBMA) accumulent les chaperonnes HSP70, HSP90 et HDJ-2/HSDJ (Stenoien *et al.*, 1999). En plus, les agrégats associés aux pathologies SCA1, SCA3 (ataxie spinocérébelleuse de type 1 et 3) contiennent également des molécules chaperonnes comme HSP70 et des constituants du protéasome, suggérant ainsi que le repliement anormal de ces protéines mènerait à leur agrégation et au recrutement des constituants du protéasome (Cummings *et al.*, 1998). L'importance du système ubiquitine-protéasome dans les maladies de neurodégénérescence a récemment été démontré. En effet, des mutations affectant ce système, cause ou empire des maladies de neurodégénérescence (Cummings *et al.*, 1999; Leroy *et al.*, 1998; Saigoh *et al.*, 1999). En plus, une mutation dans une petite protéine chaperonne (SHSP) a aussi été rapportée comme étant responsable de la DRM (Quinlan et Van Den Ijssel, 1999) et de la formation de cataractes (Litt *et al.*, 1998).

1.4.1.3 Inclusions de protéines agrégées et apoptose

En effet, le mécanisme par lequel l'agrégation de protéines pourrait tuer les cellules ou encore être responsable de ces maladies, reste encore très obscur (Clark et Muchowski, Review 2000). Bien que la formation d'inclusions intracellulaires de protéines ubiquitinées est une caractéristique importante des maladies à polyglutamines, des études suggèrent que ceux-ci ne soient pas responsables de la maladie et de l'apoptose. La formation d'inclusions serait une tentative de la cellule d'empêcher l'effet toxique de la protéine mutée (Saudou *et al.*, 1998; Klement *et al.*, 1998; Klement *et al.*, 1999; Cummings *et al.*, 1999). Par contre une autre étude, celle-ci portant sur la formation d'agrégats d'huntingtine dans le cas de la maladie d'Huntington, a été associée à l'apoptose et à l'activation de la caspase 8 (Sánchez *et al.*, 1999). Étant donné la toxicité de ces agrégats, les cellules possèdent des

mécanismes pour prévenir ou éliminer leur formation comme les protéasomes et les protéines chaperonnes.

1.4.2 Le protéasome

1.4.2.1 Description et fonction

Le protéasome 26S catalyse la dégradation des protéines endommagées ou mal repliées, des protéines régulatrices de courte demi-vie comme celles impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire et la signalisation et la génération de peptides antigéniques destinés à la présentation par les CMH de classe 1 (Coux *et al.*, Review 1996; Hochstrasser, Review 1996). Le protéasome 26S est constitué de 2 sous-complexes majeurs, le protéasome 20S et le complexe régulateur (PA700 et/ou PA28) (Baumeister *et al.*, Review 1998). Le protéasome 20S est un cylindre creux de 700 kDa qui constitue le noyau catalytique de la protéase tandis que PA700, aussi appelé 19S, est un complexe régulateur de 700 kDa composé de 20 sous-unités qui s'associent aux extrémités du protéasome 20S (Coux *et al.*, Review 1996). Les sites catalytiques sont donc situés à l'intérieur du cylindre, et il faut y accéder par les deux étroites ouvertures situées aux extrémités du cylindre qui sont gardées par les sous-unités régulatrices (Wenzel et Baumeister, 1995).

La dégradation des substrats par le protéasome nécessite la conjugaison d'ubiquitine à la protéine mal repliée, réaction qui est réalisée à l'aide de trois enzymes (Ciechanover, Review 1994). La chaîne polyubiquitine sert alors de signal pour la reconnaissance du peptide destiné à être dégradé par le protéasome. PA700 reconnaît, lie et clive les chaînes polyubiquitines et fonctionne pour augmenter la dégradation des protéines, probablement en dépliant ou en transloquant les substrats dans la cavité centrale du protéasome (Hochstrasser, Review 1996).

Il existe aussi un autre complexe régulateur appelé PA28 ou 11S. Celui-ci est un complexe hétérohexamérique qui a la forme d'un anneau et qui lie le protéasome dans une orientation similaire à PA700 (Gray *et al.*, 1994). PA28 n'a pas besoin de substrat ubiquitiné car il fonctionne pour augmenter la présentation au protéasome des courts peptides plutôt que des grosses protéines, ce qui explique son rôle dans la

production et la présentation des antigènes (Dick *et al.*, 1996). Bien que la majorité des protéines destinées à être dégradées par le protéasome sont généralement multiubiquitinées, il existe également des protéines dégradées par le protéasome de manière ubiquitine-indépendante. (Ciechanover, Review 1994; Roberts, 1997; Bercovich *et al.*, 1989).

1.4.2.2 Les inhibiteurs de protéasomes

La lactacystine est l'inhibiteur de protéasome le plus spécifique. Elle inhibe trois des cinq activités peptidases majeures du protéasome (Fenteany *et al.*, 1995). Les inhibiteurs de protéasomes (IP) induisent l'apoptose dans certaines lignées cellulaires et l'inhibent dans d'autres (Grimm *et al.*, 1996; Drexler, 1997, Meriin *et al.*, 1998). Nous savons maintenant que les IP activent la voie des kinases de stress JNK ("c-Jun N-terminal Kinase") menant à l'apoptose et, en même temps, induisent l'expression des protéines chaperonnes HSP70 et HSP72 qui suppriment l'activation de la voie JNK (Meriin *et al.*, 1998). La décision de mort par apoptose réside donc dans la fine balance entre les signaux proapoptotiques et antiapoptotiques. Un choc thermique, un stress oxydatif ou les UV induisent aussi l'apoptose par l'activation des JNK (Kyriakis et Avruch, Review 1996; Denhardt, Review 1996) mais l'apoptose induite par le Fas-L et le TNF- α est JNK-indépendante (Liu *et al.*, 1996).

Étant donné que le protéasome assure la dégradation d'importantes protéines régulatrices comme la cycline B, p53, p21^{Cip1} et p27^{Kip1}, Bik et Bax (Pagano *et al.*, 1995; Yaglom *et al.*, 1995; Deshaies *et al.*, 1995; Scheffner *et al.*, 1993; Seufert *et al.*, 1995; Li et Dou, 2000; Marshansky *et al.*, 2001), il a été suggéré que l'accumulation de ces protéines en présence d'IP serait responsable de l'apoptose. Bien que certaines études (Grimm *et al.*, 1996; Meriin *et al.*, 1998) démontrent qu'il n'y a pas d'accumulation de l'ensemble des protéines de courtes demi-vie ou de la protéine p53, en présence de concentrations d'IP qui induisent l'activation des JNK, d'autres expériences (Lopes *et al.*, 1997) au contraire, démontrent qu'il y a bien une accumulation de p53 en présence d'IP. Par contre, nous savons que certaines protéines très instables comme I- κ B, l'inhibiteur de NF- κ B, s'accumulent en présence

d'IP (Meriin *et al.*, 1998). Le protéasome semble impliqué directement dans la régulation de la transcription en dégradant les protéines NF- κ B et I- κ B et les facteurs de transcription c-Fos et c-Jun (Palombella *et al.*, 1994; Treier *et al.*, 1994; Stancovski *et al.*, 1995).

1.4.3 Les protéines chaperonnes induites par un choc thermique (HSPs)

Les protéines HSPs jouent un rôle important dans la prévention de l'agrégation des protéines en favorisant leur repliement. Certaines de ces HSPs sont exprimées de manière constitutive dans les conditions normales de croissance cellulaire car elles sont impliquées dans l'assemblage, le repliement et la translocation de protéines cellulaires tandis que d'autres HSPs sont surtout synthétisées dans des conditions de stress. Les HSPs sont particulièrement impliquées dans la thermotolérance (Santoro, Review 2000; Morrimoto *et al.*, 1994). Les HSPs peuvent également favoriser la dégradation des protéines agrégées par le protéasome. En effet, l'ubiquitination de certaines protéines comme CFTR (Yang *et al.*, 1993; Bercovich *et al.*, 1997) dépendrait de HSP70. Les HSPs qui ont une activité chaperonne sont divisées en six classes selon leur poids moléculaire: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 et les SHSPs (Santoro, Review 1999).

1.4.3.1 Les différentes classes de HSPs

Les HSPs70 ont toutes la capacité de lier l'ATP et leur synthèse est augmentée lors d'un choc thermique, tout particulièrement celle de HSP72 (Moseley, Review 2000). La HSP73 est exprimée de manière constitutive et est très abondante dans le cytoplasme et le noyau (Moseley, Review 2000; Beere et Green, Review 2001). Elle est impliquée dans la reformation des vésicules de clathrine (Beere et Green, Review 2001). HSP60 est l'homologue mammalien de la protéine GroEL chez les bactéries (Morrimoto *et al.*, 1994). HSP90 est très abondante dans le cytoplasme et forme notamment une association transitoire avec la tyrosine kinase (Morrimoto *et al.*, 1994; Koyasu *et al.*, 1986). Pour ce qui est de HSP100, elle est constitutivement

exprimée mais sa synthèse augmente de 5 fois lors d'un choc thermique. HSP100 peut se lier aux filaments d'actine tout comme HSP90 (Koyasu *et al.*, 1986).

Finalement, il y a les SHSPs qui préviennent également l'agrégation et stabilise les protéines non-natives. Les SHSPs sont très efficaces pour prévenir l'agrégation de protéines à cause de leur haute capacité de liaison (plus qu'une molécule de substrat par sous-unité SHSP) (Lee *et al.*, 1997). Par contre, on ne sait toujours pas comment le substrat se lie à la chaperonne; probablement par des sites de liaison partiellement exposés à la surface étant donné que le volume à l'intérieur de la sphère est trop petit pour la quantité de protéines contenues dans les autres HSPs (Saibil, Review 2000).

1.4.4 Les petites protéines chaperones induites par un choc thermique (SHSPs)

1.4.4.1 Fonctions et caractéristiques des SHSPs

Les SHSPs ont été décrites comme étant des molécules chaperonnes qui ont plusieurs propriétés. Elles peuvent stabiliser les microtubules, moduler l'assemblage de l'actine et des filaments intermédiaires (Miron *et al.*, 1991; Nicholl et Quinlan, 1994), stabiliser des ARN (Nover *et al.*, 1989) et elles augmentent les chances de survie au stress oxydatif ou thermique (Landry *et al.*, 1989; Mehlen *et al.*, 1995). Elles peuvent également diminuer la production des ROS ("reactive-oxygen species") et augmenter le contenu cellulaire de glutathione antioxydant (Mehlen *et al.*, 1996).

Les SHSPs sont des protéines abondantes et ubiquitaires dont le poids moléculaire varie de 12 à 43 kDa (MacRae, Review 2000). Elles sont trouvées en larges complexes de 200 à 800 kDa et partagent une séquence d'environ 100 résidues qui est très conservée parmi les espèces. Cette séquence d'abord trouvée dans la protéine α -crystallin des vertébrés a ainsi été nommée le domaine α -crystallin ou domaine des SHSPs. Ce domaine est situé dans la région C-terminale des SHSPs (Clark et Muchowski, Review 2000; MacRae, Review 2000).

1.4.4.2 La structure moléculaire

Le domaine C-terminal α -cristallin des SHSPs est largement composé de brins β disposés en deux feuillets qui contribuent à l'interface de dimérisation tandis que le domaine N-terminal est très peu conservé. Le domaine α -cristallin est suivi d'une extension C-terminale flexible de séquence et de longueur variable (Berengian *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1998). La seule structure moléculaire de SHSP qui a été déterminée par cristallographie aux rayons X est celle de la protéine MjHSP16.5 (Kim *et al.*, 1998). Celle-ci est constituée d'un complexe sphérique creux de 24 sous-unités avec huit fenêtres triangulaires et six fenêtres carrées. Ces fenêtres sont assez larges pour permettre à de petites molécules et même à des chaînes peptidiques assez longues de rentrer à l'intérieur de la sphère (Kim *et al.*, 1998; Clark et Muchowski, Review 2000). Cette structure de coquille sphérique semble être conservée parmi les différents membres de la famille; par exemple, la protéine α -cristallin humaine serait constituée d'une sphère creuse de 32-mers (Haley *et al.*, 1998) tandis que la protéine HSP25 est le plus souvent retrouvée sous la forme oligomérique de 16-mers (Ehrnsperger *et al.*, 1999).

La stabilité et la structure oligomérique des SHSPs ont été bien étudiées chez la protéine chaperonne HSP25, révélant ainsi que les structures tertiaires et quaternaires de HSP25 formant des structures hexadécamériques sont rapidement perdues de façon réversible tandis que la structure secondaire demeure très stable. Ces oligomères formés de tétramères sont en équilibre concentration-dépendante avec les dimères, indiquant que les dimères sont l'unité de base pour la formation des oligomères (Ehrnsperger *et al.*, 1999).

À de fortes températures, les oligomères de HSP25 augmentent en masse moléculaire (Ehrnsperger *et al.*, 1999). Ces complexes cytoplasmiques d'environ 1,3 MDa déjà rapportés dans la littérature (Arrigo *et al.*, 1988; Collier *et al.*, 1988; Lavoie *et al.*, 1995) se redistribuent au noyau ou à l'espace périnucléaire durant un choc thermique. La formation d'oligomères et la relocalisation de ceux-ci au cours d'un choc thermique semble être très répandu parmi les différents membres de la famille SHSPs et, dans tous les cas, c'est un phénomène réversible (Ehrnsperger *et al.*, 1999).

De récentes études laissent suggérer que l'assemblage des dimères, trimères, et tétramères de SHSPs dépend de la structure secondaire des éléments conservés dans le domaine α -cristallin (Liu et Welsh, 1999; Boelens *et al.*, 1998) tandis que l'assemblage des sous-unités en oligomères dépend de la partie N-terminale (Leroux, Melki *et al.*, 1997; Leroux, Ma *et al.*, 1997). En effet, le domaine α -cristallin serait nécessaire pour l'oligomérisation des SHSPs en favorisant l'interaction monomère-monomère tandis que le domaine N-terminal permettrait aux monomères d'interagir ensemble pour former une cavité centrale (Leroux, Melki *et al.*, 1997). Le domaine α -cristallin étant un motif commun nécessaire pour l'assemblage des multimères, cela expliquerait la possibilité de former des oligomères hétérogènes provenant d'espèces différentes de SHSPs (Zantema *et al.*, 1992). Ces hétéro-oligomères peuvent se dissocier à de très fortes températures et se réassembler après dénaturation (Merck *et al.*, 1993).

1.4.4.3 L'activité chaperonne des SHSPs

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer comment les SHSPs peuvent protéger d'autres protéines de la dénaturation. Il a d'abord été proposé que des protéines pourraient être emprisonnées sur ou dans la sphère au cours de l'assemblage des sphères creuses (Kim *et al.*, 1998). D'autres chercheurs ont également suggéré que les SHSPs auraient comme rôle de se lier aux protéines mal repliées pour ainsi bloquer leur précipitation et permettre leur renaturation avec l'assistance de d'autres chaperonnes (MacRae, Review 2000).

Nous savons maintenant que l'oligomérisation est un prérequis pour l'activité chaperonne maximale des SHSPs (Haley *et al.*, 1998; Leroux, Ma *et al.*, 1997). Des études récentes suggèrent que les SHSPs se lieraient hydrophobiquement avec leurs protéines cibles via le domaine α -cristallin (Sharma *et al.*, 1998). En effet, ces sites hydrophobes probablement situés dans les crevasses de l'oligomère se trouveraient davantage exposés à la surface de l'oligomère sous l'action de la chaleur permettant ainsi aux protéines cibles de s'y lier (Raman *et al.*, 1995; Das et Surewicz, 1995; Raman et Rao, 1997). La dénaturation partielle des SHSPs est déjà connue pour

provoquer des changements de conformation de celles-ci et augmenter par le fait même leur activité chaperonne. Certains stress comme la chaleur pourrait ainsi causer des réarrangements, des transitions dans la structure quaternaire des SHSPs augmentant ainsi leur activité chaperonne (Raman *et al.*, 1995; Das et Surewicz, 1995; Raman et Rao, 1997).

1.5 Description du projet

En comparant la structure de la sous-unité R1 de la RR chez différentes espèces (Fig. 1), nous constatons que la R1 de HSV-1 et -2 se distingue par une extension unique de 350 a.a. à l'extrémité NH₂ (Nikas *et al.*, 1986; Baer *et al.*, 1984; Gibson *et al.*, 1984; Carlson *et al.*, 1984; Sjöberg *et al.*, 1985). Cette extrémité NH₂ est non-essentielle pour l'activité réductase de l'enzyme (Conner, MacFarlane *et al.*, 1992). Afin de déterminer la fonction de ce domaine NH₂, notre laboratoire (Massie *et al.*, 1998) a procédé à une délétion de cette extension du 2^e au 357^e a.a. en se basant sur les régions d'homologies des différentes R1 (Fig. 2). Les premières tentatives en vue d'exprimer la R1 tronquée à l'aide de recombinants adénovirus standards ont échoué laissant suggérer que cette protéine pouvait être toxique pour les cellules. En utilisant des recombinants adénovirus inductibles grâce au système de régulation par la tétracycline, nous avons constaté qu'une délétion de cette élongation génère une protéine R1(Δ 2-357) qui induit l'apoptose dans des cellules A549tTA (Massie *et al.*, 1998). De plus, il a été démontré que la R1 pleine longueur inhibe l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) et celle induite par le Fas-L et le TNF- α (Langelier *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent que, en plus de sa fonction réductase essentielle à la réplication du virus, la sous-unité R1 pourrait contribuer à la propagation virale en prévenant l'apoptose induite par le système immunitaire.

Nos premières expériences en vue de caractériser les protéines R1 et R1(Δ 2-357) ont démontré que la protéine R1(Δ 2-357) formait de grosses inclusions cytoplasmiques tandis que la R1 est localisée de manière diffuse dans le cytoplasme. Cette observation laissaient suggérer que la R1(Δ 2-357) était une protéine insoluble et que l'accumulation de protéines mal repliées dans les cellules pouvait être

responsable de l'apoptose. Mon projet consistait donc à vérifier la validité de cette hypothèse et élucider le mécanisme par lequel la R1(Δ 2-357) induit l'apoptose.

Nous avons créé des protéines R1 portant des délétions jusqu'aux positions 398 et 496 (Fig. 2) et vérifier si ces protéines R1 Δ auraient un meilleur repliement et par conséquent seraient moins proapoptotiques que la R1(Δ 2-357). Nous pouvons finalement conclure que les protéines R1(Δ 2-357), R1(Δ 2-398) et R1(Δ 2-496) sont des protéines agrégées et ubiquitinées mais il n'y a pas de corrélation entre leur insolubilité et leur toxicité. Nous avons également constaté que l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) n'impliquait pas de protéines de l'adénovirus. La carence en sérum, l'addition de cycloheximide ou de clasto-lactacystine- β -lactone augmente l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) dans les cellules A549tTA tandis que la protéine antiapoptotique adénovirale E3-14.7kDa protège de l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357). Un choc thermique et la surexpression de la protéine HSP70 ne diminue pas l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357). En étudiant le mécanisme d'induction de l'apoptose des protéines R1 Δ s, nous avons constaté qu'il n'y a pas de cascade d'activation des caspases commune à ces protéines agrégées. Par contre, il y a activation et recrutement de la caspase 8 au niveau des inclusions de R1(Δ 2-357). La R1 a un potentiel antiapoptotique en empêchant l'activation des caspases par les R1 Δ s et la relocalisation de la caspase 8 dans les inclusions de R1(Δ 2-357).

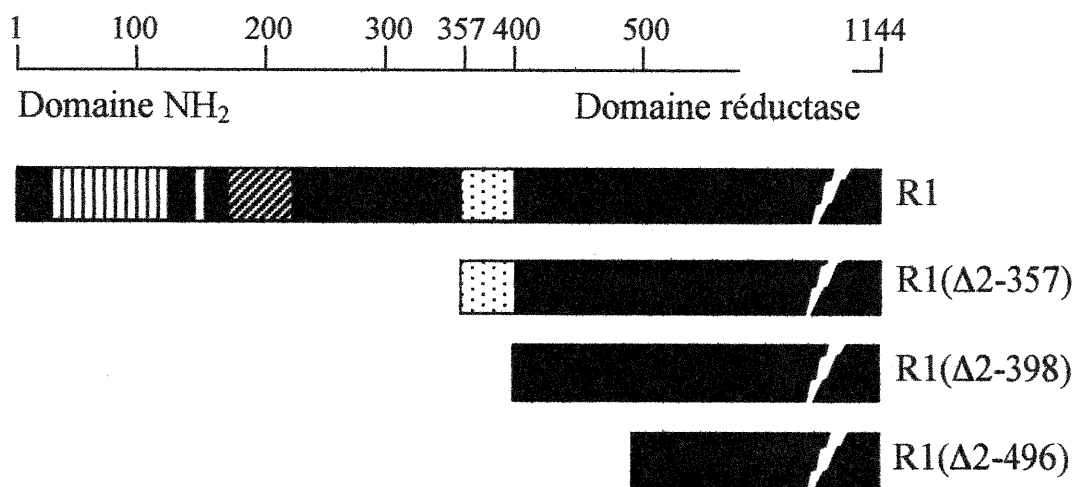


Figure 2: Délétions effectuées sur la sous-unité R1 de HSV-2.

Illustration des différentes délétions réalisées sur la sous-unité R1 de la RR de HSV-2 en vue de construire différents recombinants adénovirus exprimant des domaines réductases (en noir) de la sous-unité R1 de différentes longueurs. Les délétions ont été effectuées à partir du 2^e a.a. jusqu'à la position 357 (R1(Δ 2-357)), 398 (R1(Δ 2-398)) ou 496 (R1(Δ 2-496)). La région en pointillée représente la région limite entre le domaine réductase et le domaine NH₂ (entre les a.a. 368 et 402) qui reste à être précisée. La région rayée à la verticale représente le domaine hydrophobe de la R1, la région blanche est riche en proline ("P box") et la région rayée en diagonale est riche en sites phosphorylés par la caséine kinase 2 (CK2).

2. Matériel et méthodes

2.1 Cellules

La majorité des expériences ont été effectuées avec les cellules A549tTA, une lignée de cellules épithéliales humaines dérivées de poumons, tandis que les transfections ont été réalisées avec la lignée cellulaire de carcinome cervical humain HeLatTA. Ces deux lignées cellulaires, gracieusement fournies par le Dr Bernard Massie de l'Institut de recherche en biotechnologies (IRB), ont intégré le plasmide codant pour la protéine hybride tTA (tétracycline Trans-Activateur), un transactivateur formé par la fusion du domaine d'activation de la protéine VP16 de HSV et le répresseur tet de *E.coli* (Gossen *et al.*, 1994). Cette protéine tTA peut en absence de tétracycline, se lier aux éléments de réponse à la tétracycline en amont du promoteur CMV minimal et ainsi réguler l'expression de notre gène d'intérêt (Gossen *et al.*, 1994).

Les passages de cellules HeLatTA étaient effectués dans des boîtes de Pétri de 150 mm (Sarstedt ou Falcon), à une densité de 1×10^6 cellules dans 20 ml de milieu DMEM (Dulbecco's minimum essential medium) (Cellgro) + 10% de sérum de veau fœtal (SVF) "Tet System Approved" (Clontech) avec 350 µg/ml de Geneticine (Life Technologies). Les passages de cellules A549tTA étaient également effectués dans des boîtes de 160 mm, mais à une densité de 2×10^6 cellules dans 20 ml de milieu DMEM (Cellgro) + 8% SVF "Tet System Approved" (Clontech) avec 30 µg/ml de phléomycine (Sigma). Les lignées cellulaires étaient incubées à 37°C avec 5% CO₂. Le repiquage était réalisé avec 5 ml de trypsine-EDTA (Gibco BRL) deux fois par semaine pour les cellules HeLatTA et A549tTA.

2.2 Vecteurs adénovirus

Les vecteurs Ad5TR5 code pour une protéine d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur TR5 qui a les éléments de réponse à la tétracycline tandis que les vecteurs Ad5TR5-K7-GFP_Q sont des doubles cassettes, c'est-à-dire qu'ils ont en plus du promoteur TR5 qui contrôle l'expression de la protéine d'intérêt, un deuxième promoteur CMV qui exprime de manière constitutive la protéine GFP. Les vecteurs

AdCMV5 exprime de manière constitutive la protéine d'intérêt. Dans ce travail, 7 adénovirus recombinants différents ont été utilisés: Ad5TR5-R1, codant pour la sous-unité R1 de la ribonucléotide réductase de HSV-2; Ad5TR5-R1(Δ 2-357) codant pour la R1 délétée à partir du 2^e jusqu'au 357^e acide aminé [R1(Δ 2-357)]; Ad5TR5-R1(Δ 2-398)-K7-GFP_Q codant pour la R1 délétée pour les a.a. 2 à 398 [R1(Δ 2-398)]; Ad5TR5R1(Δ 2-496)-K7-GFP_Q codant pour la R1 délétée pour les a.a. 2 à 496 [R1(Δ 2-496)]; Ad5TR5-Hsp70 codant pour la protéine chaperonne Hsp70; AdCMV5-Fas-L codant pour le ligand du récepteur Fas et finalement AdCMV5-14.7k codant pour la protéine de l'adénovirus E3-14.7kDa. Les vecteurs adénovirus Ad5TR5-Hsp70, AdCMV5-Fas-L et AdCMV5-14.7k ont été construits dans le laboratoire du Dr Bernard Massie de l'IRB. Les autres vecteurs adénovirus ont été construits dans notre laboratoire dont Ad5TR5-R1 et Ad5TR5-R1(Δ 2-357) l'ont été en collaboration avec le laboratoire du Dr Bernard Massie (Massie *et al.*, 1998).

2.3 Vecteurs pour les transfections

Les vecteurs qui ont été utilisés pour les transfections sont les suivants: pAdCMV5-R1(Δ 2-357) exprimant de façon constitutive la protéine (R1(Δ 2-357)); pAdCMV5-GFP_Q exprimant de manière constitutive la protéine GFP (Green Fluorescent Protein); pAdTR5-R1(Δ 2-357) codant pour la protéine R1(Δ 2-357) sous le contrôle d'un promoteur qui a les éléments de réponse à la tétracycline; pAdTR5-GFP_Q codant pour la protéine GFP sous le contrôle d'un promoteur régulé par la tétracycline. Tout ces vecteurs ont été construits dans le laboratoire du Dr Bernard Massie de l'IRB.

2.4 Transfections

Les cellules HeLa^TA furentensemencées dans des plaques de 6 puits (Falcon) à une densité de $1,5 \times 10^5$ /puits dans 2 ml de milieu DMEM (Cellgro) 10% SVF "Tet System Approved" (Clontech). Le lendemain de l'ensemencement 1 h avant la transfection, le milieu fut aspiré et remplacé par du milieu frais DMEM +

10% SVF. Le mélange pour la transfection était composé de l'ajout successif de 94 μ l de milieu DMEM (Cellgro) sans SVF, 6 μ l de FuGENE 6 (Roche) et 2 μ g d'ADN. Après une incubation de 20 min, la doxycycline (Sigma) était ajoutée si nécessaire pour avoir une concentration finale de 30 ng/ml. Le mélange fut ensuite déposé par petites gouttes sur les cellules. Après une incubation de 5 h à 37°C avec 5% CO₂, le milieu fut aspiré et remplacé par 2 ml de milieu frais DMEM + 10% SVF.

2.5 Détermination des pourcentages de transfactions

Pour déterminer les pourcentages de transfactions, nous avons utilisé les vecteurs pAdCMV5-GFP_Q et pAdTR5-GFP_Q qui expriment la GFP (Green Fluorescent Protein). Il était ainsi possible de détecter les cellules HelatTA transfectées qui étaient vertes lorsqu'observées à la fluorescence. Les comptes de cellules vertes étaient réalisés au microscope à fluorescence dans trois champs différents par boîte de Pétri. Au moins cent cellules étaient comptées par champs. Les pourcentages de transfection ont été déterminés en utilisant l'équation suivante:

$$\text{Pourcentage de transfection} = \frac{\text{Nombre de cellules vertes}}{\text{Nombre de cellules totales}} \times 100$$

2.6 Infections

Expérience de l'effet de la R1 sur l'apoptose induite par les R1Δs.

Les cellules A549tTA étaientensemencées dans des plaques de 6 puits à une densité de 2 x 10⁵ cellules/puits dans 2 ml de milieu DMEM (Cellgro) + 8% SVF "Tet System Approved" (Clontech). Une première infection avec Ad5TR5-R1 à 10 PFU/cellule a été réalisée 24 h après l'ensemencement. Le milieu fut donc aspiré et remplacé par une suspension virale de 500 μ l de milieu DMEM + 8% SVF contenant la quantité appropriée de virus. Les cellules furent ensuite incubées à 37°C avec 5% CO₂ pendant 7 h avec agitation pour permettre l'adsorption virale. 7 h plus tard, les cellules furent réinfectées à une MOI de 10 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1(Δ2-357), ou à une MOI de 250 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1(Δ2-398)-K7-GFP_Q ou Ad5TR5-

R1(Δ 2-496)-K7-GFP_Q. Après une période d'adsorption de 7 h, 1 ml de milieu DMEM + 8% SVF fut ajouté par puits et les cellules furent réincubées pendant 17 h dans les mêmes conditions mais sans agitation.

Expérience de solubilité des protéines R1 et R1 Δ s

Les cellules A549tTA furentensemencées dans des boîtes de Pétri de 100 mm (Sarstedt) à 2×10^6 cellules/boîte dans 10 ml de milieu DMEM + 8% SVF. 24 h après l'ensemencement, le milieu fut aspiré et remplacé par soit 2 ml de milieu frais ou une suspension virale constituée de 2 ml de milieu DMEM + 8% SVF et d'une quantité de virus Ad5TR5-R1 pour avoir une MOI de 10 PFU/cellule. Après 7 h d'incubation à 37°C avec 5% CO₂ et avec agitation, le milieu fut aspiré et remplacé par du milieu frais ou des suspensions virales contenant 2 ml de milieu + 8% SVF et différentes quantités de virus. Le virus Ad5TR5-R1(Δ 2-357) fut utilisé à une MOI de 10 PFU/cellule tandis que les virus Ad5TR5-R1(Δ 2-398)-K7-GFP_Q et Ad5TR5-R1(Δ 2-496)-K7-GFP_Q furent utilisés à une MOI de 250 PFU/cellule. Les cellules furent ensuite réincubées dans les mêmes conditions et 17 h plus tard, 3 ml de milieu DMEM + 8% SVF fut ajouté dans chaque boîte de Pétri.

Expérience avec Ad5TR5-Hsp70 et avec AdCMV5-14.7k

Les cellules A549tTA ont étéensemencées dans les mêmes conditions que l'expérience de l'apoptose induite par les R1 Δ s. Par contre, les infections furent d'abord effectuées avec Ad5TR5-Hsp70 à 10, 25 ou 100 PFU/cellule ou encore avec AdCMV5-14.7k à 10 ou 50 PFU/cellule. Après 7 h d'adsorption, les cellules ont été réinfectées avec Ad5TR5-R1(Δ 2-357) ou AdCMV5-Fas-L à 10 PFU/cellule et réincubées. 17 h plus tard, 1 ml de DMEM + 8% SVF fut ajouté dans chaque boîte.

2.7 Quantification de l'apoptose

Le compte des cellules apoptotiques et non-apoptotiques pouvait être effectué de deux manières (Langelier *et al.*, 2001): soit directement, en comptant le nombre de

cellules accolées et décollées au microscope dans trois champs différents par boîte de Pétri ou encore à l'hématimètre. Pour les comptes au microscope, les cellules HeLatTA ou A549tTA considérées comme étant apoptotiques étaient celles qui encore accolées manifestaient la formation de corps apoptotiques ou encore celles qui étaient décollées de la boîte de Pétri et flottaient dans le milieu. Au moins 100 cellules étaient comptées par champ au grossissement 40X du microscope à contraste de phase (Nikon, UFX-II).

Pour les comptes à l'hématimètre, les cellules HeLatTA ou A549tTA considérées comme étant apoptotiques étaient seulement celles qui étaient décollées de la boîte de Pétri et flottaient dans le milieu étant donné qu'il était difficile de décoller uniquement les quelques cellules arrondies qui manifestaient la formation de corps apoptotiques. Les milieux étaient donc récoltés dans des tubes de 15 ml (Sarstedt) et les boîtes de Pétri étaient rincées avec du PBS froid. Le PBS étant ajouté au milieu, les cellules apoptotiques étaient centrifugées 4 min à 1000 rpm (DAMON IEC HN-SII) et resuspendues dans 0,5 à 2 ml de milieu DMEM + 8% SVF selon la quantité de cellules afin d'obtenir des concentrations idéales pour les comptes à l'hématimètre. Pour ce qui est des cellules attachées, 2 ml de trypsine-EDTA (Gibco BRL) était ajoutée pour une boîte de Pétri de 100 mm et ensuite 2 ml de milieu DMEM + 8% SVF pour neutraliser la trypsine. Les cellules non apoptotiques (attachées) ont été récupérées dans des tubes de 15 ml. Le rinçage des boîtes de Pétri était réalisé avec 5 ml de PBS froid qui était ensuite ajouté aux tubes de 15 ml. Les cellules étaient centrifugées 4 min à 1 000 rpm (DAMON IEC HN-SII) et puis bien resuspendues dans un volume approprié (0,5 à 2 ml) de DMEM + 8% SVF de manière à avoir des concentrations de cellules adéquates pour les comptes à l'hématimètre. Une fois le nombre de cellules évalué dans les deux suspensions à l'aide d'un l'hématimètre, les pourcentages de cellules en apoptose étaient déterminés selon l'équation suivante:

$$\text{Pourcentage de cellules en apoptose} = \frac{\text{Nombre de cellules décollées}}{\text{Nombre de cellules totales (accolées + décollées)}} \times 100$$

En comparant les taux d'apoptose obtenus par les deux méthodes décrites précédemment, nous avons remarqué qu'il y avait moins de 5% de variation.

2.8 Quantification des protéines R1 et R1Δs

2.8.1 Récolte des cellules

Les cellules HeLatTA ou A549tTA ont été récoltées 24 h post-transfection ou post-infection en récupérant dans des tubes de 50 ml (Sarstedt) le milieu et les cellules trypsinées (accolées) avec 500 µl de trypsine-EDTA (Gibco BRL). Les boîtes de Pétri ont été rincées avec 5 ml de PBS froid qui a été récupéré dans les tubes de 50 ml gardés sur glace. Les tubes ont été remplis avec du PBS froid. Les cellules ont été centrifugées 4 min à 1 000 rpm (DAMON IEC HN-SII), resuspendues dans 1,5 ml de PBS froid et transférées dans des microtubes de 1,5 ml (Sarstedt). Après une centrifugation de 3 min à 4 000 rpm (Baxter Canlab Biofuge 13 EC MICROMAX), le culot a été resuspendu dans 140 µl de tampon de lyse (62,5 mM Tris pH 6,8; 6 M urée; 2% SDS). Pour ce qui est des expériences de solubilité, le culot a été resuspendu dans 500 µl de tampon de lyse (50 mM Hepes pH 8,1; 2 mM DTT). Les échantillons gardés sur glace ont été soniqués 5 x 10 sec avec arrêts de 10 sec entre chaque sonication et dosés pour évaluer la concentration de protéines ("DC protein assay", Bio-Rad).

Pour l'expérience de solubilité des protéines, les différents extraits ont ensuite été ultracentrifugés pendant 1 h, à 29 000 rpm (Beckman L-90 SERCOL 95J27, rotor SW 55 Ti (Beckman)) à 4°C. Les surnageants ont été récupérés dans des microtubes de 1,5 ml et 500 µl de tampon de lyse a été ajouté aux culots. Ces derniers ont été resoniqués 2 x 10 sec avec arrêt de 10 sec entre les deux sonications et récupérés dans des microtubes de 1,5 ml. Le dosage pour évaluer la concentration de protéines a été effectué avec le "DC protein assay" (Bio-Rad) en utilisant de la BSA comme standard.

2.8.2 Séparation des protéines sur gel SDS-Page et immunodétection

Les extraits cellulaires préparés à partir des transfections et des infections ont été mis sur gel SDS-PAGE 7,5% à raison de 10 µg de protéines pour chaque échantillon. Lors de la quantification des protéines pour déterminer leur solubilité, 150 et 300 ng de protéine R1 purifiée (BM5R1) ainsi que 50, 150 et 300 ng de R1(Δ 2-357) étaient également déposés sur gel pour servir de standard. La R1(Δ 2-357) provenait d'un extrait dont la concentration de R1(Δ 2-357) avait été estimée sur un gel coloré au bleu de Coomassie en comparant par densitométrie l'intensité de la bande de R1(Δ 2-357) par rapport à la quantité totale de protéines. Les aliquots destinés à être mis sur gel étaient au préalable dénaturés à 100°C pendant 3 min. La migration des protéines sur gel a été effectuée à 120 V pendant 1 h. Les protéines ont ensuite été transférées sur membrane de nitrocellulose (Protran) à 80 mA durant toute la nuit.

Le blocage des sites non-spécifiques a été réalisé avec du "SuperBlock[®] Blocking Buffer in PBS" (Pierce) pendant 45 min. La détection des protéines R1, R1(Δ 2-357), R1(Δ 2-398) et R1(Δ 2-496) a été effectuée à l'aide de l'anticorps polyclonal 168R1 (sérum de lapin anti-R1) dilué 1/500 (Langelier *et al.*, 1997). L'immunodétection de la protéine PARP a été réalisée avec l'anticorps monoclonal de souris anti-PARP C2-10 (Dick Mosser) dilué 1/250. Toutes les dilutions d'anticorps furent réalisées dans une solution de PBS-tween 20 (0,2%) contenant 10% de solution de blocage "SuperBlock" (Pierce). Suite à une incubation d'une heure, la membrane a été lavée 3 x 15 sec et ensuite 3 x 5 min dans du PBS-tween 20 (0,2%). L'incubation de l'anticorps secondaire anti-lapin de chèvre couplé à la peroxidase de raifort (hrp: "horse radish peroxidase") (Amersham/Pharmacia Biotech) a été réalisée pendant 1 heure à une dilution de 1/25 000. Dans le cas de la protéine PARP, l'anticorps secondaire utilisé à une dilution de 1/25 000 était un anti-souris polyclonal de chèvre couplé à la peroxidase de raifort (Santa Cruz Biotechnology). La membrane a ensuite été lavée de la même manière et la révélation a été effectuée avec le "SuperSignal[®] West Dura Extended Duration Substrate" (Pierce) dilué 1/3 dans du PBS-tween 20 (0,2%).

2.8.3 Quantification des protéines

Pour la quantification des protéines au bleu de Coomassie, on déposait 500 ng et 1 µg de R1 purifiée (BM5R1) et 250 et 500 ng de R1(Δ2-357) pour servir de standard. Après la migration des protéines, le gel était coloré au moins une demi-heure dans une solution au bleu de Coomassie (10% d'acide acétique) pour être ensuite lavé dans une solution de décoloration jusqu'à ce que les bandes de protéines soit bien apparentes.

Par densitométrie, l'intensité des bandes des différents extraits a été comparée aux standards afin de déterminer la quantité de protéines R1 ou R1Δs présentes dans chaque extrait en pourcentage de protéines cellulaires totales (% de PCT). En multipliant le % de PCT par la quantité de protéines totales contenues dans chacune des fractions (culots et surnageants), nous avons obtenu la quantité totale de R1 ou R1Δs contenues dans chacune des fractions. Étant donné que le surnageant contient les protéines solubles et le culot les protéines insolubles, le pourcentage de solubilité a pu être calculé en divisant la quantité totale de protéines R1 ou R1Δs contenues dans le surnageant par la quantité totale de R1 ou R1Δs de l'extrait (surnageant + culot) selon la formule suivante:

$$\text{Pourcentage de solubilité} = \frac{\text{Quantité totale de R1 ou R1}\Delta\text{s dans le surnageant}}{\text{Quantité totale de R1 ou R1}\Delta\text{s de l'extrait (culot + sng)}} \times 100$$

2.9 Immunofluorescence

Des lamelles 11 x 11 mm autoclavées étaient préalablement déposés dans des plaques de 6 puits à raison de 3 ou 4 par puits. Les plaques furent ensuiteensemencées avec des cellules A549tTA à 1×10^5 cellules/puit dans 2 ml de DMEM + 8% SVF. La première infection fut réalisée 24 h après l'ensemencement dans les mêmes conditions que l'expérience de toxicité des protéines R1Δs avec le virus Ad5TR5R1 à 10 PFU/cellule. 7 h plus tard, le milieu a été aspiré et remplacé par soit

500 µl de dilution virale Ad5TR5R1(Δ 2-357) à 100 PFU/cellule ou du milieu frais et les cellules ont été réincubées pendant 17 h avec agitation.

Après avoir subi deux lavages au PBS froid, les cellules ont été fixées 24 h p.i. dans 4% de paraformaldéhyde (10 min, T° pièce), lavées de nouveau au PBS pour être finalement perméabilisées au méthanol. Une fois lavées au PBS, les cellules fixées ont été incubées avec l'anticorps monoclonal de souris 932 (épitope situé dans le domaine NH₂ de la R1) ou polyclonal de lapin 168R1 (dirigé contre la protéine R1) dilué 1/100 dans du PBS. Suite à 3 lavages de 5 min au PBS, les cellules ont été incubées avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin Alexa 546 (Molecular Probes Inc.) ou avec l'anticorps de chèvre anti-souris Alexa 546 (Molecular Probes Inc.) dilué 1/100. Les cellules ont été conservées dans une goutte de PBS/glycérol et les lamelles ont ensuite été fixées sur lames avec du vernis pour être observées au microscope à fluorescence.

2.10 Microscopie électronique

L'ensemencement et l'infection des cellules A549tTA ont été effectués de la même manière que l'expérience de solubilité des protéines. Le virus Ad5TR5-R1 fut utilisé à une MOI de 10 PFU/cellule tandis que le virus Ad5TR5-R1(Δ 2-357) fut utilisé à une MOI de 100 PFU/cellule. La récolte des cellules A549tTA a été faite tout comme dans la section 2.8.2 "Récolte des cellules A549tTA pour la solubilité" sauf qu'après la première centrifugation, les cellules ont été resuspendues dans 10 ml de PBS froid, transférées dans des tubes de 15 ml et recentrifugées 4 min à 800 rpm (DAMON IEC HN-SII). Les culots de cellules étaient d'abord resuspendus dans une goutte de PBS et ensuite resuspendus dans 10 ml d'une solution de fixation contenant 4% de glutaraldéhyde. Les cellules conservées à 4°C ont été observées en microscopie électronique dans le laboratoire d'Antonio Nanci de l'Université de Montréal.

2.11 Carence en sérum

L'ensemencement a été réalisé dans des boîtes de Pétri de 60 mm à une densité de 3×10^5 cellules/boîte dans 5 ml de DMEM + 8% SVF. L'infection a été faite 24 h après l'ensemencement avec le virus Ad5TR5R1(Δ 2-357) à 25 PFU/cellule. Le milieu a été aspiré et remplacé par une suspension virale contenant soit 1 ml de milieu frais DMEM + 8% SVF ou 1 ml de milieu carencé (DMEM + 0,5% SVF). Après une incubation durant la nuit, 2 ml de milieu DMEM contenant 8% ou 0,5% de SVF ont été ajoutés dans chaque boîte.

2.12 Traitement avec cycloheximide

Les boîtes de Pétri de 100 mm furent infectées à 0,25; 0,5; 1; 5; 10; 25 et 100 PFU/cellule avec Ad5TR5R1(Δ 2-357) dans les mêmes conditions que l'expérience pour la solubilité des protéines (section 2.6). Après une adsorption virale de 6 h, 3 ml de milieu DMEM + 8% SVF contenant soit de la cycloheximide (Sigma) à une concentration de 30 μ g/ml ou de la doxycycline (Sigma) à une concentration de 30 ng/ml était ajouté dans les boîtes de Pétri.

2.13 Choc thermique

Les cellules A549tTA furentensemencées dans des boîtes de Pétri de 60 mm à 6×10^5 cellules/boîte dans 5 ml de milieu DMEM + 8% SVF. 24 h après l'ensemencement, les cellules ont subi un choc thermique de 1 h à 43°C. Le milieu avait été préalablement aspiré et remplacé par du milieu préchauffé à 43°C. Les cellules ont ensuite été infectées avec Ad5TR5R1(Δ 2-357) à 5 PFU/cellule en remplaçant le milieu par une suspension virale contenant 1 ml de milieu DMEM + 8% SVF. Après une adsorption de 6 h avec agitation, 2 ml de milieu était ajouté et les cellules furent réincubées mais sans agitation.

2.14 Traitement avec la clasto-lactacystine- β -lactone

Des plaques de 6 puits furentensemencées avec 4×10^5 cellules/puit dans 2 ml de milieu DMEM + 8% SVF. 24 h plus tard, l'infection a été faite avec Ad5TR5R1(Δ 2-357) à 10 ou 50 PFU/cellule. Au moment de l'infection, les cellules ont été traitées ou non avec de la clasto-lactacystine- β -lactone (Calbiochem), le produit actif de la lactacystine, à 10 μ M. Après une adsorption de 7 h avec agitation, 1 ml de milieu avec ou sans clasto-lactacystine- β -lactone à 10 μ M était ajouté dans chaque puits et les cellules étaient réincubées sans agitation.

2.15 Essais caspases

L'expérience a été réalisée comme l'expérience de solubilité des protéines (section 2.6) sauf que pendant la première infection avec Ad5TR5R1 à 10 PFU/cellule, l'incubation des cellules fut effectuée durant toute la nuit. Le lendemain, les cellules A549tTA furent infectées avec le virus Ad5TR5R1(Δ 2-357) à 10 PFU/cellule et les virus Ad5TR5R1(Δ 2-398)GFP_Q et Ad5TR5R1(Δ 2-496)GFP_Q à 250 PFU/cellule. Les cellules ont été ensuite réincubées pendant 7 h avec agitation avant de recevoir 3 ml de milieu DMEM + 8% SVF.

Les cellules A549tTA furent récoltées comme dans la section 2.8.2 à différents temps p.i. sauf qu'une fois récupérés dans un microtube de 1,5 ml, les culots étaient resuspendus dans 200 μ l de tampon de lyse provenant du "ApoAlert™ Caspase 8 Fluorescent Assay kit" (Clontech) et incubés pendant 10 min à 4°C. Les extraits ont été centrifugés pendant 3 min à 12 000 rpm (Baxter Canlab Biofuge 13 EC MICROMAX) à 4°C et les surnageants ont été récupérés dans des microtubes de 1,5 ml (selon la méthode décrite dans Sánchez et al. 1999). Les culots étaient resuspendus dans 200 μ l de tampon de lyse ("ApoAlert Caspase 8 assay kit", Clontech) et soniqués 5 x 10 sec. Le dosage pour évaluer la concentration de protéines a été effectué avec le "DC protein assay" (Bio-Rad). Les essais caspases ont été effectués avec 60 μ g d'extrait protéique, 5 μ l de substrat spécifique pour chacune des caspases (caspase 1, 3, 6/9 et 8) conformément au protocole provenant des

ensembles "ApoAlert™ Caspase Fluorescent assay kit" (Clontech). Les mesures de la fluorescence ont été prises avec un fluoromètre à plaque de 96 puits (Cytofluor, Perceptive Biosystem) à 450 nm pour le filtre d'excitation et à 530 nm pour le filtre d'émission.

2.16 Immunodétection de la procaspase 8 et de FADD

Les extraits utilisés furent les mêmes que ceux des essais caspases (section 2.16). La séparation des protéines sur gel SDS-Page et l'immunodétection des protéines caspase 8 et FADD ont été réalisées comme dans la section 2.8.3 sauf que les 10 µg de protéines de chaque fraction (culot et surnageant) de tous les extraits étaient déposés et migrés sur un gel SDS-Page 12%. Le transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose fut effectué à 275 mA pendant 2 h dans un tampon de transfert contenant 250 ml de méthanol pour 1 l de solution.

L'immunodétection de la procaspase 8 a été réalisée à l'aide de l'anticorps de souris anti-caspase 8 (PharMingen) dilué 1/1000 tandis que l'immunodétection de FADD a été faite avec l'anticorps de souris anti-FADD (BioSource International) dilué 1/1000. La membrane fut ensuite incubée avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris couplé à la hrp (Santa Cruz Biotechnology) pendant 1 h à une dilution de 1/25 000.

2.17 Ubiquitination des protéines

Les extraits cellulaires utilisés furent les mêmes que ceux de l'expérience de la solubilité des protéines mais non centrifugés à 100 000g (section 2.6 et 2.8.1). La séparation des protéines sur gel SDS-Page et l'immunodétection ont été réalisées dans les mêmes conditions que dans la section 2.8.2. L'immunodétection des protéines ubiquitinées a été réalisée avec l'anticorps de souris anti-ubiquitine (Zymed) dilué 1/5000. L'anticorps secondaire de chèvre était un anti-IgG de souris couplé à la hrp (Santa Cruz Biotechnology) dilué 1/10 000.

3. Résultats

3.1 L'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) n'implique pas de protéines de l'adénovirus.

Telles qu'énoncées dans l'introduction, les premières expériences effectuées en vue de caractériser l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) ont toutes été réalisées par des infections dans les cellules A549tTA avec l'adénovirus Ad5TR5R1(Δ 2-357). Malgré le fait que le niveau d'expression de gènes adénoviraux devait être extrêmement faible à cause de l'absence de répllication adénovirale et des faibles MOI utilisées, nous avons voulu nous assurer que des protéines adénovirales n'étaient pas impliquées dans le processus cytotoxique de la R1(Δ 2-357). Pour se faire, nous avons transfecté des cellules HeLatTA avec les plasmides pAdCMV5-R1(Δ 2-357) et pAdCMV5-GFP_Q exprimant de manière constitutive la protéine R1(Δ 2-357) et la GFP comme contrôle négatif, ainsi qu'avec les plasmides pAdTR5-R1(Δ 2-357) et pAdTR5-GFP_Q codant pour ces mêmes protéines mais sous le contrôle d'un promoteur régulé par la tétracycline. Les cellules HeLatTA ont été choisies car elles peuvent être transfectées environ 10 fois plus efficacement que les cellules A549tTA. Pour vérifier la toxicité des protéines recombinantes, des comptes d'apoptose ont été effectués 24 h et 48 h post-transfection en comptant le nombre de cellules décollées par rapport au nombre de cellules totales (accollées + décollées) (voir Matériel et méthodes).

En comparant les cellules transfectées avec pAdCMV5-R1(Δ 2-357) ou pAdCMV5-GFP_Q (Fig. 3A), on remarque qu'il y a une différence d'apoptose de 19,9% (24 h p.t.) et de 11% (48 h p.t.). Ce résultat indique qu'une bonne partie de la toxicité observée dans les cellules transfectées avec pAdCMV5-R1(Δ 2-357) est attribuable à l'expression de la R1(Δ 2-357). Des études dans notre laboratoire ont démontré que le taux d'apoptose obtenu avec le plasmide pAdCMV-GFP_Q était similaire à celui obtenu suite à la transfection d'un plasmide vide (résultat non montré). Bien que ce résultat ne peut pas affirmer la non-toxicité de la GFP, il suggère que la toxicité du produit utilisé (FUGENE 6) et des plasmides est en partie responsable de la mortalité (18,6% d'apoptose 24 h p.t.) observée dans les cellules transfectées avec pAdCMV5-GFP_Q. Pour ce qui est des cellules transfectées avec

pAdTR5-R1(Δ 2-357) (Fig. 3B), on dénote une diminution de la mortalité de 15,3% (24 h p.t.) et de 17,4% (48 h p.t.) quand l'expression de la protéine R1(Δ 2-357) est empêchée en présence de doxycycline. Une telle différence d'apoptose n'est pas observée dans les cellules transfectées avec pAdCMV5-GFP_Q en présence ou non de doxycycline, ce qui confirme bien la toxicité de la protéine R1(Δ 2-357).

De plus, pour bien conclure que la différence d'apoptose obtenue entre les transfections avec les vecteurs pAdCMV5-R1(Δ 2-357) et pAdCMV5-GFP_Q ainsi que pAdTR5-R1(Δ 2-357) avec ou sans doxycycline est bien attribuable à l'expression de la protéine cytotoxique R1(Δ 2-357), nous avons procédé à l'immunodétection de cette protéine (Fig. 3C). La présence de la protéine R1(Δ 2-357) est clairement observable dans les extraits de cellules transfectées avec pAdCMV5-R1(Δ 2-357) (24 h p.t.). Pour ce qui est des cellules transfectées avec pAdTR5-R1(Δ 2-357), la protéine R1(Δ 2-357) n'est pas observée, probablement parce qu'elle est produite en quantité non détectable.

Lors des infections effectuées précédemment dans le laboratoire (Lippens, 1998), nous avons constaté qu'à une quantité de R1(Δ 2-357) de 0,027% de protéines cellulaires totales (PCT); le maximum de mortalité cellulaire était encore atteint et qu'à une quantité aussi faible que 0,006% PCT, nous n'avons obtenu qu'une diminution de 50% par rapport au maximum d'apoptose induit par la R1(Δ 2-357). Des quantités non détectables de R1(Δ 2-357) (inférieures à 0,006% PCT) étaient encore capables d'induire significativement l'apoptose (Lippens, 1998).

Nous avons obtenu des taux d'apoptose similaires avec pAdTR5-R1(Δ 2-357) et pCMV5-R1(Δ 2-357) malgré le fait que la protéine R1(Δ 2-357) était non détectable dans les extraits de cellules transfectées avec pAdTR5-R1(Δ 2-357). Selon les résultats obtenus par Lippens, nous nous attendions à avoir des taux d'apoptose plus bas pour pAd5TR5-R1(Δ 2-357). Il est donc possible qu'une partie de la mortalité observée soit due à l'utilisation du produit de transfection (FUGENE 6) et du plasmide.

Afin de s'assurer de la toxicité de la protéine R1(Δ 2-357), nous avons vérifié en plus des changements morphologiques (perte d'ancrage des cellules apoptotiques)

un autre trait caractéristique de la mort cellulaire par apoptose, le clivage de la protéine PARP [poly(ADP-ribose)polymérase]. Au moment de l'induction de l'apoptose, cette protéine nucléaire de 116 kDa est clivée en ces deux fragments (89 et 24 kDa). Le produit de clivage de cette protéine (89 kDa) est clairement détecté dans les extraits cellulaires transfectés avec pAdCMV5-R1(Δ 2-357) (Fig. 3C), ce qui démontre la toxicité de la R1(Δ 2-357) comparativement à la protéine GFP. Pour ce qui est des cellules transfectées avec pAdTR5-R1(Δ 2-357), le clivage de PARP est plus évident en absence de doxycycline qu'en présence de doxycycline. L'expression de la protéine R1(Δ 2-357) est donc responsable de la différence d'apoptose observée. Par contre, une plus faible détection du produit de clivage de PARP dans les extraits cellulaires transfectés avec pAdTR5-GFP_Q avec et sans doxycycline et pAdTR5-R1(Δ 2-357) avec doxycycline reflète le fait qu'il y a une certaine toxicité associée au produit de transfection (FUGENE 6) et aux plasmides.

L'ensemble de ces résultats nous permet d'affirmer que la protéine R1(Δ 2-357) est bel et bien cytotoxique et que l'expression des protéines adénovirales n'est pas nécessaire à la toxicité de la R1(Δ 2-357).

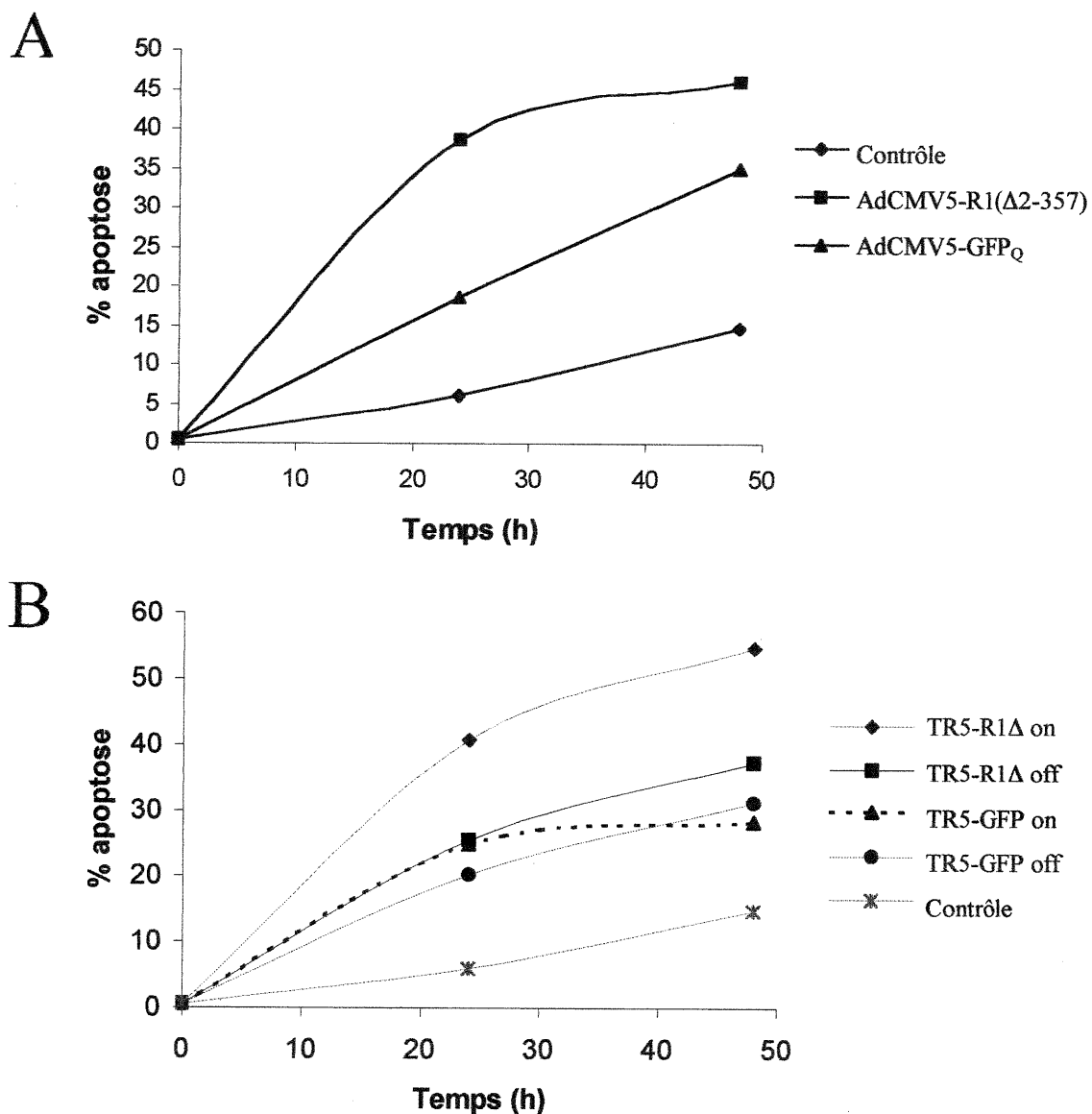
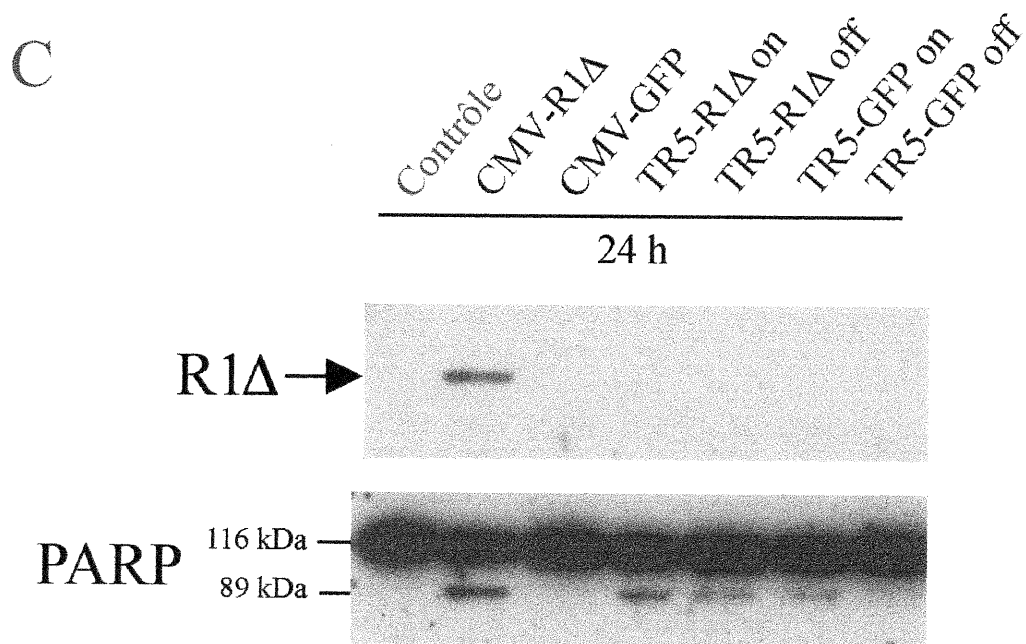


Figure 3 L'expression de la R1(Δ 2-357) suite à des transfections induit l'apoptose dans les cellules HeLatTA.

Pourcentage de cellules HeLatTA en apoptose transfectées ou non pendant 5 h avec 6 μ l de FUGENE 6 et 2 μ g de différents plasmides. Les comptes d'apoptose ont été effectués 24 et 48 h post-transfection en observant le nombre de cellules accolées et décollées sous microscope (Matériel et méthodes). Cette expérience a été effectuée trois fois en duplicata (deux boîtes de Pétri par type de transfection).

(A) Les plasmides utilisés sont AdCMV5-GFP_Q et AdCMV5-R1(Δ 2-357). Cellules non-transfectées (Contrôle).

(B) Les plasmides utilisés sont AdTR5-R1(Δ 2-357) et AdTR5-GFP_Q avec (off) ou sans doxycycline (on). Cellules non-transfectées (Contrôle).



(C) Les extraits cellulaires préparés à partir des transfections (voir figure 3A et B, 24 h p.t.) ont été mis sur gel SDS-Page 7,5% et transférés sur membrane de nitrocellulose. La détection de la protéine R1(Δ 2-357) a été effectuée par immunoblot à l'aide du sérum polyclonal de lapin 168R1 (dilution 1/500) tandis que le clivage de la protéine PARP a été détecté avec l'anticorps anti-PARP C2-10 (dilution 1/250).

3.2 Effet de la carence en sérum et de l'addition de cycloheximide sur l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) dans les cellules A549tTA.

La plupart des stimuli proapoptotiques ne déclenchent l'apoptose que dans une certaine fraction des cellules. Certains traitements comme la carence en sérum et la cycloheximide sont connus pour sensibiliser les cellules à plusieurs stimuli proapoptotiques. Étant donné que la R1(Δ 2-357) induit l'apoptose dans au maximum 50% des cellules A549tTA 24 h p.i., nous avons vérifié si la carence en sérum et la cycloheximide peuvent augmenter l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357). Les cellules A549tTA ont donc été infectées avec Ad5TR5-R1(Δ 2-357) dans un milieu carencé (0,5% sérum) ou non (8% sérum) comme décrit dans Matériel et méthodes. Les pourcentages d'apoptose ont été déterminés à différents temps post-infection en comptant au microscope le nombre de cellules accolées et décollées des boîtes de Pétri (Fig. 4). Dans les cellules A549tTA exprimant la R1(Δ 2-357), l'écart de mortalité observé entre les cellules carencées ou non était de 3,7% d'apoptose 24 h p.i. Par contre, la différence de mortalité entre les cellules carencées ou non augmentait de façon très significative (écart de 28,8% d'apoptose) 48 h p.i. Cependant, une telle différence d'apoptose n'était pas observable dans les cellules contrôles (non infectées) carencées ou non en sérum, ce qui démontre que la mortalité observée dans les cellules infectées et carencées en sérum était bien attribuable à l'effet proapoptotique de la R1(Δ 2-357). Les cellules A549tTA ainsi sensibilisées par la carence en sérum étaient donc susceptibles à l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357).

Le traitement avec la cycloheximide sensibilise aussi les cellules à l'apoptose. Nous avons donc infecté des cellules A549tTA à différentes MOI avec Ad5TR5-R1(Δ 2-357) et traité 6 h p.i. avec soit de la cycloheximide à une concentration de 30 μ g/ml ou de la doxycycline à une concentration de 30 ng/ml. La doxycycline a été utilisée dans les cellules contrôles pour inhiber la synthèse de R1(Δ 2-357) car la cycloheximide a pour effet d'inhiber la synthèse protéique. Les cellules ont donc 6 h d'expression de R1(Δ 2-357). Les pourcentages d'apoptose ont ensuite été déterminés à différents temps p.i. tels qu'illustrés à la figure 5. Les cellules contrôles A549tTA traitées seulement avec la cycloheximide obtiennent un pourcentage d'apoptose

d'environ 9% après 24 h comparativement à 1% d'apoptose dans les cellules contrôles non traitées. En comparant les cellules infectées traitées ou non avec la cycloheximide, on remarque un écart maximal à 1 PFU/cellule où l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) est trois fois plus élevée dans les cellules traitées avec la cycloheximide (32% d'apoptose) que dans les cellules traitées avec la doxycycline (9% d'apoptose). Cet écart diminue par la suite avec l'utilisation de MOI plus élevées.

Suite à ces résultats, nous pouvons affirmer que les cellules sensibilisées à l'apoptose que ce soit suite à une carence en sérum ou à un traitement avec la cycloheximide, sont plus susceptibles à l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357).

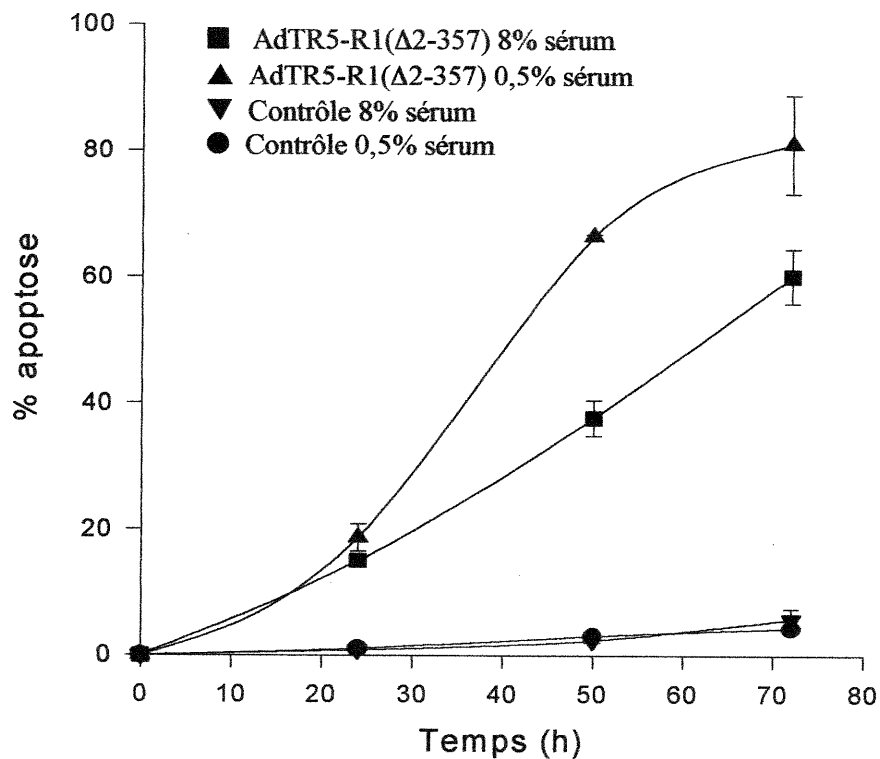


Figure 4 L'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) augmente dans les cellules A549tTA carencées en sérum.

Les cellules A549tTA ont été non infectées (Contrôle) ou infectées à 25 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1(Δ 2-357) dans un milieu 8% sérum ou un milieu 0,5 % sérum. Les pourcentages d'apoptose ont été effectués 24, 48 et 72 h p.i. en comptant le nombre de cellules d tach es de la boîte de Pétri par rapport au nombre de cellules totales (cellules accolées et décollées). Cette expérience a été effectu e deux fois en duplicata (deux boîte de Pétri par type d'infection).

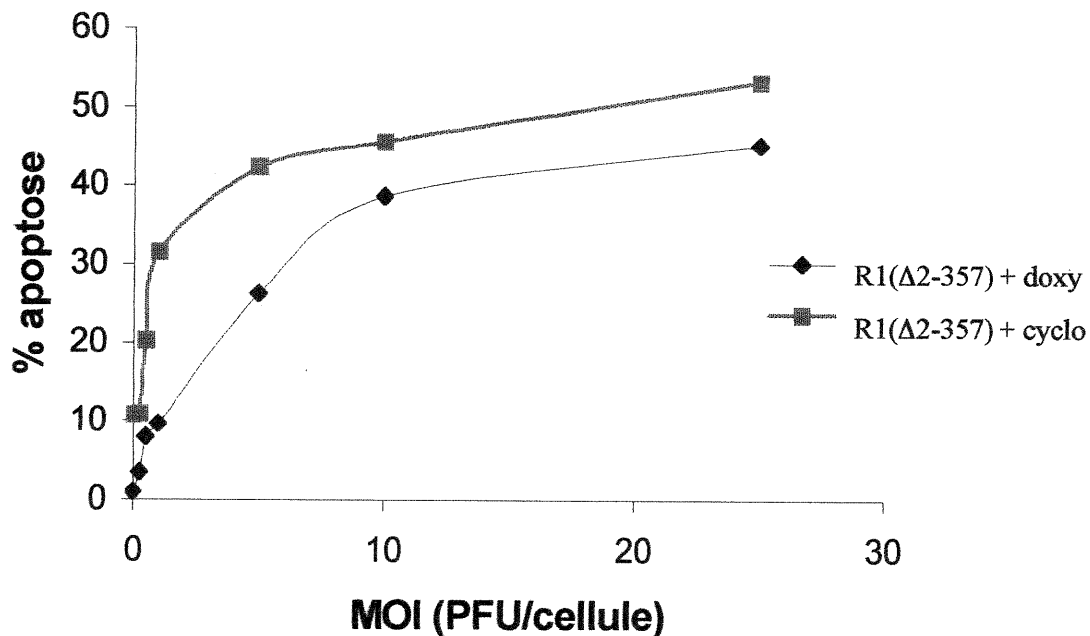


Figure 5 La cycloheximide augmente l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) dans les cellules A549tTA.

Le graphique représente les pourcentages d'apoptose dans les cellules A549tTA après une infection de 24 h avec Ad5TR5-R1(Δ 2-357) à différentes MOI (0,25; 0,5; 1; 5; 10; 25 et 100 PFU/cellule) et après avoir été traitées 6 h post-infection avec 30 μ g/ml de cycloheximide ou 30 ng/ml de doxycycline. Les comptes étaient effectués 24 h post-infection à l'hématimètre comme décrit dans "Matériel et méthodes". Cette expérience a été effectuée une fois en duplicata (deux boîtes de Pétri par type d'infection).

3.3 Etude du potentiel proapoptotique des protéines R1(Δ 2-357), R1(Δ 2-398) et R1(Δ 2-496) et de l'effet antiapoptotique de la R1.

Afin de déterminer si des protéines portant des délétions amino-terminales plus importantes démontreraient une toxicité différente de celle de la R1(Δ 2-357), nous avons construits deux nouveaux adénovirus Ad5TR5-R1(Δ 2-398)-K7-GFP_Q et Ad5TR5-R1(Δ 2-496)-K7-GFP_Q portant respectivement des délétions jusqu'aux positions 398 et 496. Nos premières expériences effectuées avec ces adénovirus, nous ont d'abord laissé croire que ces deux nouvelles protéines recombinantes pouvaient être moins cytotoxiques que la R1(Δ 2-357). Cependant, en évaluant le niveau d'expression des protéines R1 Δ s par immunodétection après une infection à des MOI similaires, nous avons constaté que la R1(Δ 2-398) et la R1(Δ 2-496) étaient produites en plus faibles quantités que la R1(Δ 2-357). Avec ces deux nouveaux adénovirus, il fallut utiliser des MOI 25 fois plus élevées pour produire des quantités de protéines R1(Δ 2-398) et R1(Δ 2-496) comparables aux quantités de R1(Δ 2-357) (Fig.6). Les causes exactes de cette plus faible production de protéines R1(Δ 2-398) et R1(Δ 2-496) sont encore inconnues.

En procédant à des infections de cellules A549tTA pour accumuler des quantités similaires de R1 Δ s (Fig. 6), soit à une MOI de 10 PFU/cellule pour Ad5TR5-R1(Δ 2-357) et à une MOI de 250 PFU/cellule pour Ad5TR5-R1(Δ 2-398)-K7-GFP_Q et Ad5TR5-R1(Δ 2-496)-K7-GFP_Q, nous remarquons que 24 h p.i., la mortalité induite par la R1(Δ 2-357) a presque atteint son maximum (généralement situé entre 25 et 50% d'apoptose) tandis que les deux autres R1 Δ s semblent être très peu toxiques (environ 5% d'apoptose) (Fig. 7). Par contre à 48 h p.i., l'apoptose induite par les protéines R1(Δ 2-398) et R1(Δ 2-496) augmente jusqu'à 22,2 et 29,2% (Fig. 7). Il semble donc y avoir un délai dans la toxicité des ces protéines comparativement à la R1(Δ 2-357). La toxicité retardée de la R1(Δ 2-398) et de la R1(Δ 2-496) est confirmée 96 h p.i. où le pourcentage de cellules en apoptose (47%) induit par la R1(Δ 2-496) rejoint le taux de mortalité induit par la R1(Δ 2-357), et où la toxicité de la R1(Δ 2-398) augmente jusqu'à 30%. Nous constatons 48 h p.i. que la

R1(Δ 2-398) semble être moins toxique que la R1(Δ 2-496) et que l'écart entre les taux de mortalité induits par ces deux protéines augmente en fonction du temps (surtout 96 h p.i.). Le niveau d'expression des protéines R1(Δ 2-398) et R1(Δ 2-496) n'a pas été évalué 96 h p.i., par conséquent, nous ne pouvons pas éliminer l'hypothèse qu'une accumulation plus importante de ces protéines serait responsable de l'augmentation de la mortalité à des temps supérieurs à 48 h p.i.

Étant donné qu'il est possible d'empêcher l'effet proapoptotique de la R1(Δ 2-357) en coexprimant la R1 pleine longueur, nous avons voulu déterminer si la R1 pouvait également prévenir l'apoptose induite par la R1(Δ 2-398) et la R1(Δ 2-496). Nous avons ainsi procédé à des infections tout d'abord avec Ad5TR5-R1 à 10 PFU/cellule suivi d'une coinfection 7 h plus tard avec AdTR5-R1(Δ 2-357) à 10 PFU/cellule ou encore avec Ad5TR5-R1(Δ 2-398)-K7-GFP_Q ou Ad5TR5-R1(Δ 2-496)-K7-GFP_Q à 250 PFU/cellule. Les pourcentages d'apoptose ont été déterminés à différents temps après la deuxième infection comme décrit dans "Matériel et méthodes". L'effet antiapoptotique de la R1 est clairement observable 24 h p.i. (Fig. 7) où les pourcentages d'apoptose obtenus lors des coinfections avec les R1 Δ s (2 à 3% de mortalité) sont comparables à ceux des cellules non infectées. La R1 protège encore 48 h p.i. contre l'effet toxique des R1 Δ s. En effet, la mortalité induite par la R1(Δ 2-357) 48 h p.i. est réduite de 34,4% en présence de R1 tandis que l'apoptose induite par la R1(Δ 2-398) et la R1(Δ 2-496) est diminuée de 13,8% et de 14,1% en présence de R1. L'effet antiapoptotique de la R1 continue de se manifester 96 h p.i. avec la R1(Δ 2-357) car la mortalité observée demeure comparable à celle des cellules non infectées. Cependant, l'apoptose induite par la R1(Δ 2-398) et la R1(Δ 2-496) 96 h p.i. ne diminue plus en présence de R1. Il est donc possible qu'il y ait une certaine toxicité associée à l'expression de protéines adénovirales lors de l'utilisation de fortes MOI à des temps supérieurs à 48 h p.i. Par contre, on ne peut pas éliminer l'hypothèse que la R1 ne puisse pas protéger contre la toxicité associée à la R1(Δ 2-398) et la R1(Δ 2-496), ou encore que l'expression de ces deux protéines R1 Δ s augmente à 96 h p.i.

L'ensemble de ces données nous démontre que les protéines R1(Δ 2-398) et R1(Δ 2-496) manifestent une mortalité plus tardive que celle induite par R1(Δ 2-357) et que la R1 pleine longueur protège efficacement de l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357).

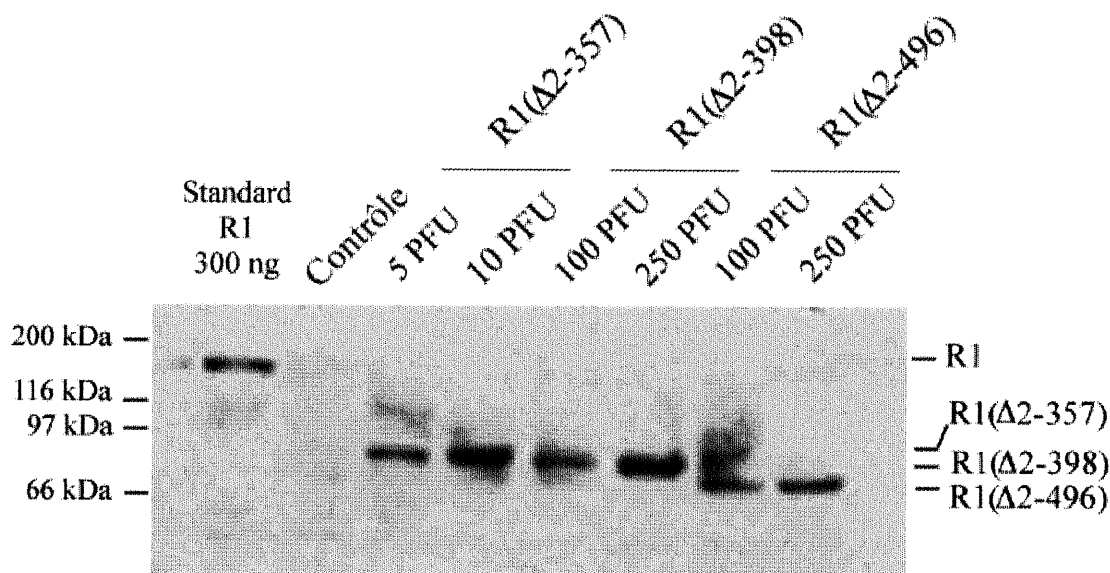


Figure 6 Quantification des R1Δs par immunodétection

Les cellules A549tTA ont été non infectées (Contrôle), infectées pendant 24 h à une MOI de 5 ou 10 PFU/cellule avec le recombinant adénovirus Ad5TR5R1(Δ2-357) [R1(Δ2-357)], ou encore infectées à 100 ou 250 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1(Δ2-398)-K7-GFP_Q [R1(Δ2-398)] ou Ad5TR5-R1(Δ2-496)-K7-GFP_Q [R1(Δ2-496)]. Les extraits cellulaires ont été préparés 24 h p.i. tel que décrit dans Matériel et méthodes. 10 μg d'extraits cellulaires ont été mis sur un gel SDS-Page 7,5% et ensuite transférés sur membrane de nitrocellulose. Les R1Δs ont été quantifiées en utilisant de la R1 de HSV-2 purifiée comme standard. L'immunodétection des protéines R1Δs a été réalisée en utilisant l'anticorps polyclonal de lapin168R1 (dilution 1/500). Cette expérience a été effectuée une fois en triplicata (trois boîtes de Pétri étaient utilisées par type d'infection).

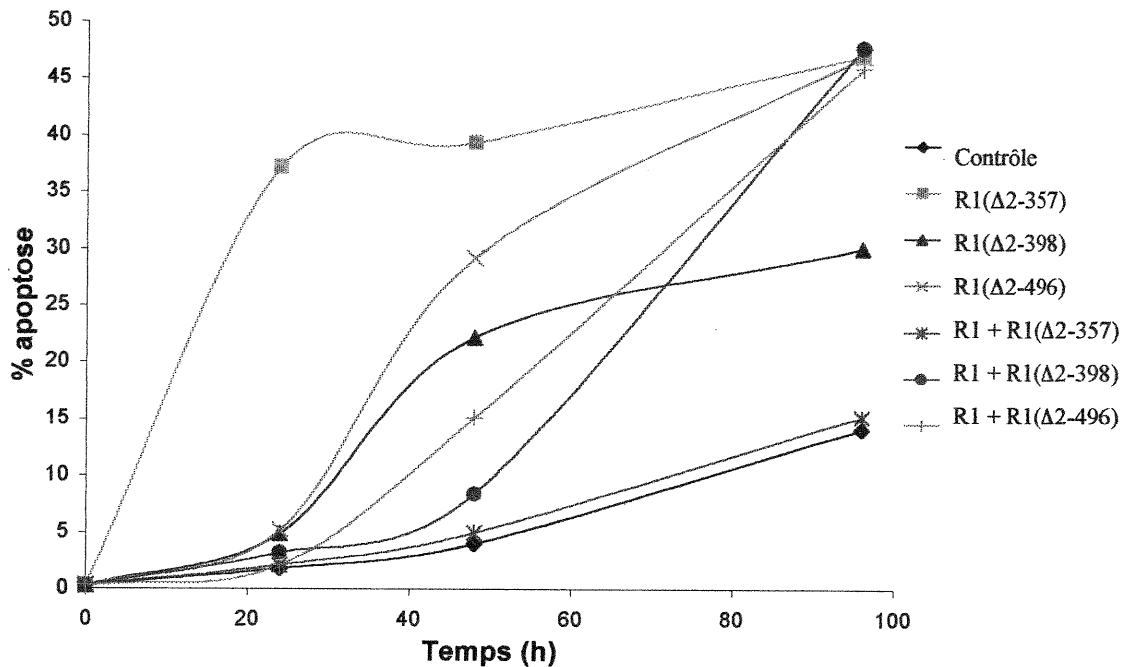


Figure 7 Étude du potentiel antiapoptotique de la R1 contre l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357), R1(Δ 2-398) et la R1(Δ 2-496) dans les cellules A549tTA.

Ce graphique représente les pourcentages d'apoptose obtenus en fonction du temps dans les cellules A549tTA lorsqu'elles sont non infectées (Contrôle), infectées pendant 17 h à 10 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1(Δ 2-357) ou à 250 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1(Δ 2-398)-K7-GFP_Q ou Ad5TR5-R1(Δ 2-496)-K7-GFP_Q, ou encore infectées à 10 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1 pendant 7 h suivi d'une infection à 10 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1(Δ 2-357) ou à 250 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1(Δ 2-398)-K7-GFP_Q ou Ad5TR5-R1(Δ 2-496)-K7-GFP_Q. Les pourcentages de mortalité ont été effectués en calculant le nombre de cellules détachées et attachées 24, 48 et 92 h après la deuxième infection (Matériel et méthodes). Cette expérience a été réalisée deux fois.

3.4 Localisation des protéines R1 et R1Δs par l'immunofluorescence et microscopie électronique.

Dans le but d'expliquer le potentiel proapoptotique de la R1(Δ2-357), nous avons d'abord étudié la localisation intracellulaire des protéines R1 et R1Δs dans les cellules A549tTA par immunofluorescence comme décrit dans Matériel et méthodes en utilisant l'anticorps monoclonal 932 (épitope situé dans le domaine NH₂ de la R1) ou l'anticorps polyclonal 168R1 (dirigé contre la protéine R1). Les cellules ont été infectées à une MOI de 100 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1(Δ2-357) comparativement à 10 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1 afin de déterminer si une quantité donnée de R1 peut protéger de l'apoptose et changer la localisation d'une quantité beaucoup plus importante de R1(Δ2-357).

Tel qu'illustré à la figure 8 pour un temp d'infection de 24 h, la R1 pleine longueur est localisée de manière diffuse dans le cytoplasme tandis que la R1(Δ2-357) forme de grosses inclusions cytoplasmiques. Ces inclusions pouvaient être clairement observées à partir de 12 h p.i. Elles sont surtout présentes en périphérie du noyau tout particulièrement 24 h p.i. (Fig. 8) et peuvent parfois être observées dans le noyau 48 h p.i. Les larges agrégats de R1(Δ2-357) étaient aussi facilement visibles en microscopie à contraste de phase (résultats non montrés). Pour ce qui est des protéines R1(Δ2-398) et R1(Δ2-496), elles forment de grosses inclusions cytoplasmiques similaires à celles produites par l'accumulation de R1(Δ2-357) à 10 PFU/cellule (résultats non montré). Ces résultats suggèrent que les R1Δs sont insolubles et que les cellules peuvent accumuler des protéines agrégées sans que ce soit toxique.

Lorsque des coinfections furent effectuées pour coexprimer la R1 et la R1(Δ2-357), nous avons remarqué par observation au microscope à contraste de phase que les gros agrégats de R1(Δ2-357) étaient répartis en plus petites inclusions cytoplasmiques (environ 5-30) (résultat non montré). La R1 pleine longueur colocalise avec ces plus petites inclusions de R1(Δ2-357) dans le cytoplasme (Fig. 8, anticorps 932). Des résultats similaires furent obtenus en coexprimant la R1 et la

R1(Δ 2-398) ou la R1(Δ 2-496). En présence de R1, les agrégats de R1(Δ 2-398) et de R1(Δ 2-496) étaient également répartis en plus petites inclusions cytoplasmiques qui colocalisent avec la R1 (résultat non montré).

Afin de mieux caractériser ces inclusions, les cellules ont aussi été observées en microscopie électronique (Fig. 9). Les gros agrégats de R1(Δ 2-357) se sont avérés être des structures différentes des agrésomes qui eux sont plus compacts (Fig. 9). Ces agrégats de R1(Δ 2-357) étaient en fait constitués de petites structures arrondies plus ou moins denses d'environ 50-100 nm de largeur (Fig. 9, flèche S). Tel qu'indiqué par la flèche (M) sur la figure 9, ces inclusions pouvaient également contenir des organelles comme des mitochondries. Les inclusions sphériques de R1 et R1(Δ 2-357) produites lors des coinfections étaient entourées par une couche épaisse de matériel dense et contenaient en leur centre du matériel peu dense (Fig. 9). Aucun organelle ou structure cellulaire n'a pu être identifié dans les inclusions de R1 et R1(Δ 2-357). Des études immuno-cytochimiques avec l'anticorps monoclonal 932 suggèrent que la R1 est présente dans la paroi épaisse des sphères et absente dans le centre peu dense.

L'ensemble de ces observations révèle que la R1(Δ 2-357), la R1(Δ 2-398) et la R1(Δ 2-496) forment des inclusions cytoplasmiques ressemblant à des agrégats de protéines insolubles. La coexpression de la R1 qui bloque l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) affecte la forme et la localisation des ces inclusions.

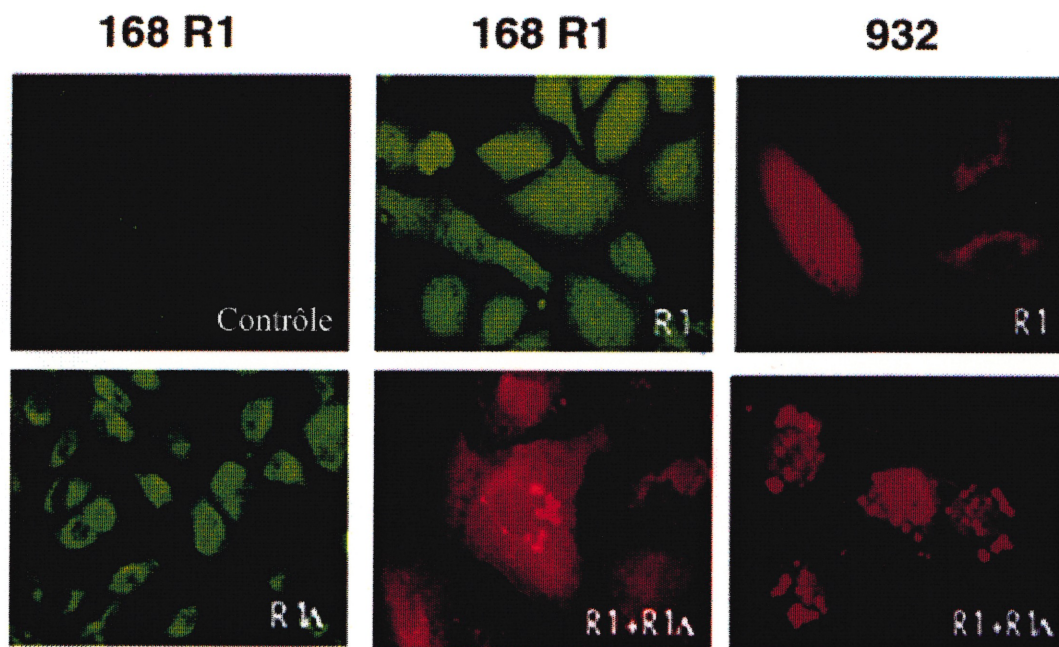


Figure 8 Localisation des protéines R1 et R1(Δ 2-357) à l'immunofluorescence. Les cellules A549tTA ont été non infectées (Contrôle), infectées pendant 24 h à 10 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1 (R1), pendant 17 h à 100 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1(Δ 2-357) (R1 Δ), ou encore infectées pendant 7 h avec Ad5TR5-R1 à 10 PFU/cellule et ensuite avec Ad5TR5-R1(Δ 2-357) pendant 17 h à 100 PFU/cellule (R1 + R1 Δ). Les cellules ont été fixées 24 h post-infection dans 4% de paraformaldéhyde et soumises à l'immunofluorescence avec l'anticorps monoclonal 932 (épitope situé dans le domaine NH₂ de la R1) ou polyclonal 168R1 (dirigé contre la protéine R1).

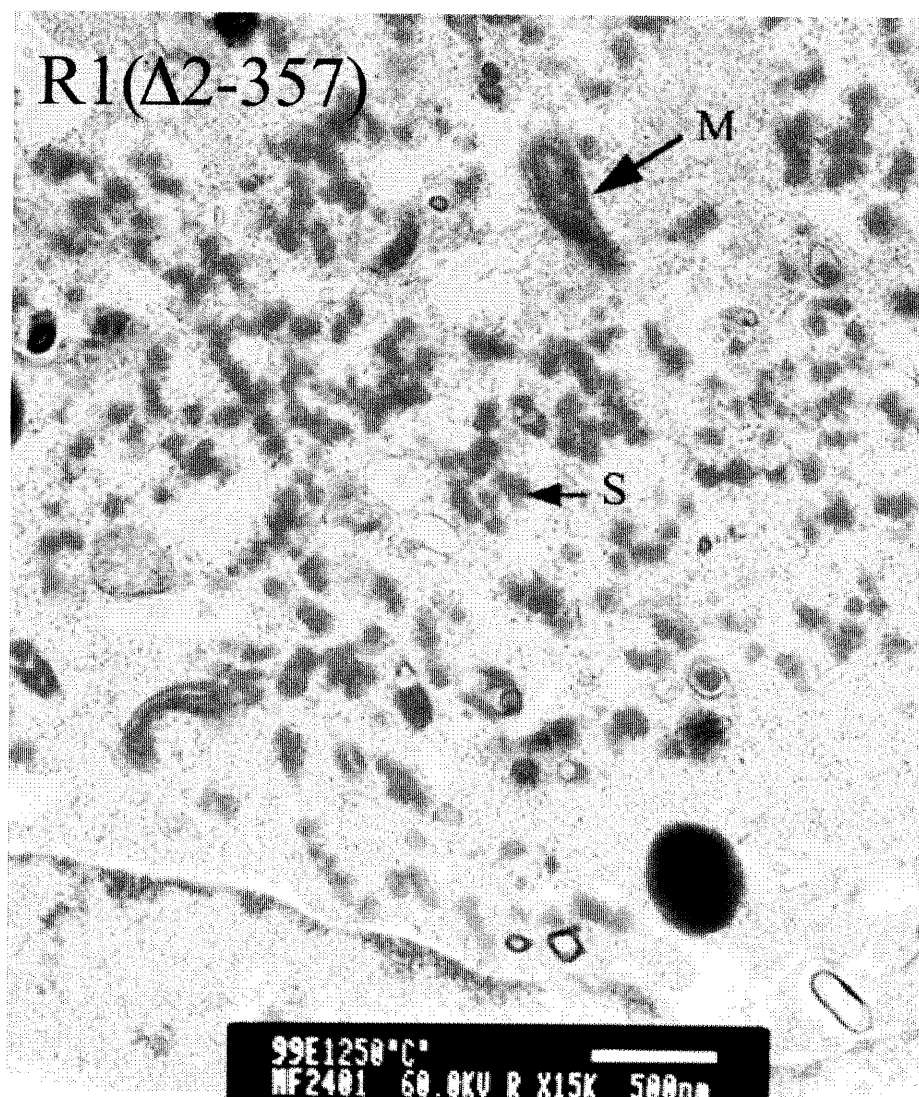
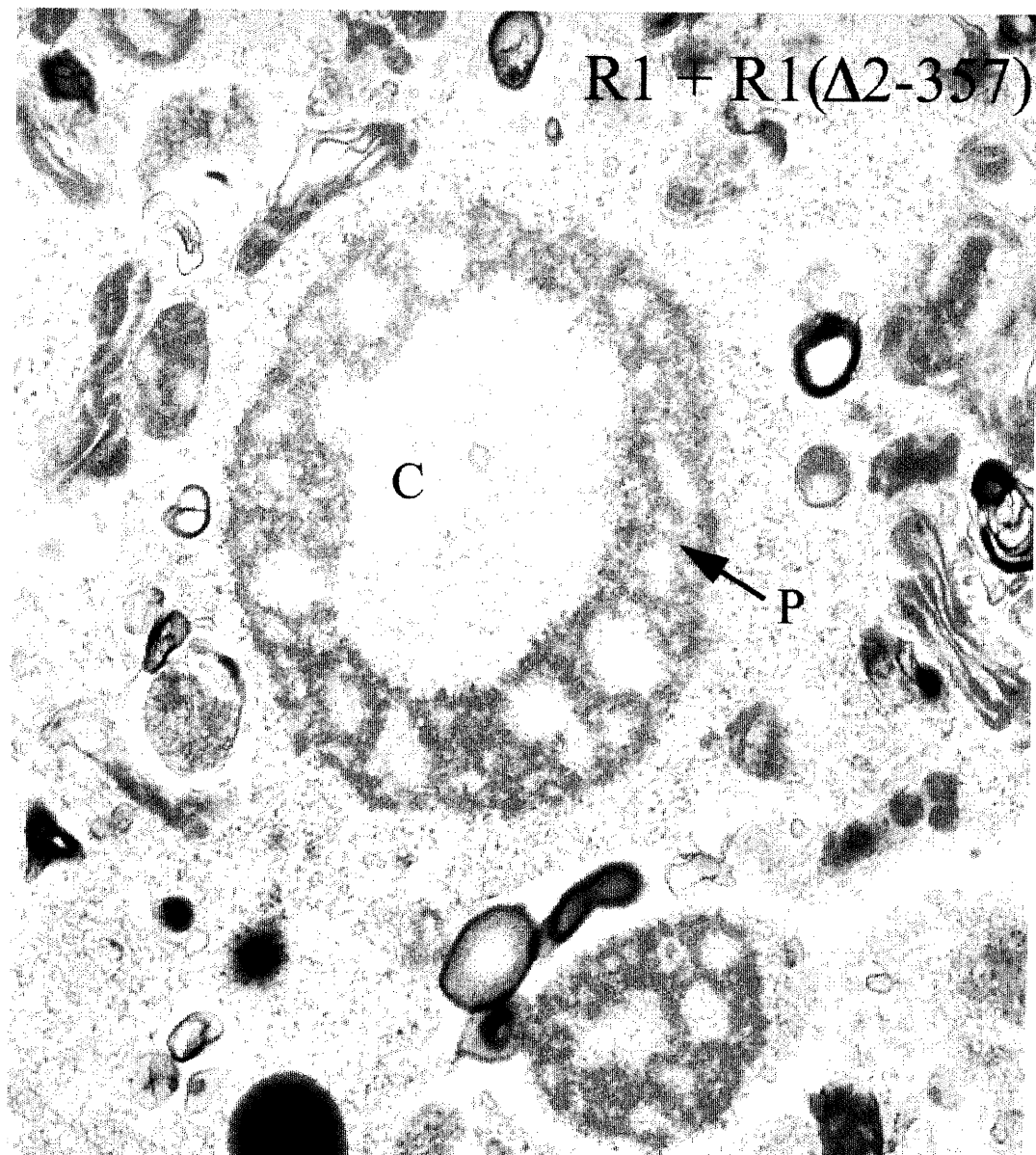


Figure 9 Localisation des protéines R1 et R1(Δ 2-357) en microscopie électronique. Les cellules A549tTA ont été infectées pendant 17 h avec AdTR5-R1(Δ 2-357) à 100 PFU/cellule [R1(Δ 2-357)], ou encore en infectées pendant 7 h avec Ad5TR5-R1 à 10 PFU/cellule et ensuite avec Ad5TR5-R1(Δ 2-357) pendant 17 h à 100 PFU/cellule [R1 + R1(Δ 2-357)]. Les cellules ont été récoltées après 24 h, fixées dans 4% de glutaraldéhyde et observées en microscopie électronique. S: Structure arrondie plus ou moins dense, M: mitochondrie, P: paroi épaisse des inclusions et C: centre peu dense des inclusions



3.5 Solubilité de la protéine R1 et des R1Δs.

Afin de vérifier l'hypothèse que la formation d'inclusions de R1(Δ2-357) serait attribuable à son agrégation, nous avons déterminé le pourcentage de solubilité de la R1 et des R1Δs. Pour ce faire, nous avons procédé à une ultracentrifugation des extraits cellulaires à 100 000g (Matériel et méthodes) pour séparer les protéines solubles contenues dans le surnageant des protéines insolubles contenues dans le culot. Le pourcentage de protéines recombinantes présentes dans chacune des fractions (culots et surnageants) ont été quantifiées au bleu de Coomassie (Fig. 10) ou par immunodétection (Fig. 11) pour calculer le pourcentage de solubilité des protéines (voir Matériel et méthodes).

Quand la R1(Δ2-357) est exprimée seule, la protéine est retrouvée presque uniquement dans le culot de l'extrait cellulaire tandis que la R1 est surtout localisée dans le surnageant (figures 10 et 11). La quantification des protéines par densitométrie (Matériel et méthodes), a révélé une faible solubilité (environ 4%) pour la R1(Δ2-357) tandis que la solubilité de la R1 est d'environ 66% (tableau I). Pour ce qui est des protéines R1(Δ2-398) et R1(Δ2-496), elles sont si insolubles qu'elles sont non détectables dans le surnageant des extraits cellulaires même lorsqu'on effectue une immunodétection (Fig. 11). Nous estimons la solubilité de ces deux protéines à moins de 0,05% étant donné qu'on devient incapable de quantifier la solubilité de manière fiable en bas de 0,05% en faisant des immunodétections. Ce résultat confirme donc l'hypothèse que la R1(Δ2-357) ainsi que les protéines R1(Δ2-398) et R1(Δ2-496) sont des protéines agrégées.

En effectuant une coexpression des protéines R1 et R1(Δ2-357), non seulement la solubilité de la R1(Δ2-357) n'est pas améliorée mais de plus, la solubilité de la R1 est réduite à 38% (figure 10 et 11, tableau I). Lors des coinfections R1 + R1(Δ2-398) et R1 + R1(Δ2-496), la présence de R1 n'améliore en rien la solubilité de ces deux protéines agrégées et en plus, la solubilité de la R1 diminue à 19% en présence de R1(Δ2-398) et à environ 2% en présence de R1(Δ2-496) (Fig. 11 et tableau I). En comparant les pourcentages de protéines cellulaires totales (% PCT), nous remarquons que la coexpression de la R1 diminue légèrement l'expression des

R1Δs (tableau I). Par contre, cette diminution n'est pas assez significative pour expliquer l'effet antiapoptotique de la R1.

L'ensemble de ces observations confirme que les R1Δs sont des protéines peu ou pas solubles. Il ne semble pas y avoir de corrélation directe entre le degré d'insolubilité et la toxicité de ces protéines recombinantes car la protéine la plus toxique R1(Δ2-357) est celle qui est la plus soluble. Ces résultats permettent également de conclure que le mécanisme par lequel la R1 protège de la cytotoxicité de la R1(Δ2-357) n'implique pas une diminution de son expression ni une augmentation de sa solubilité.

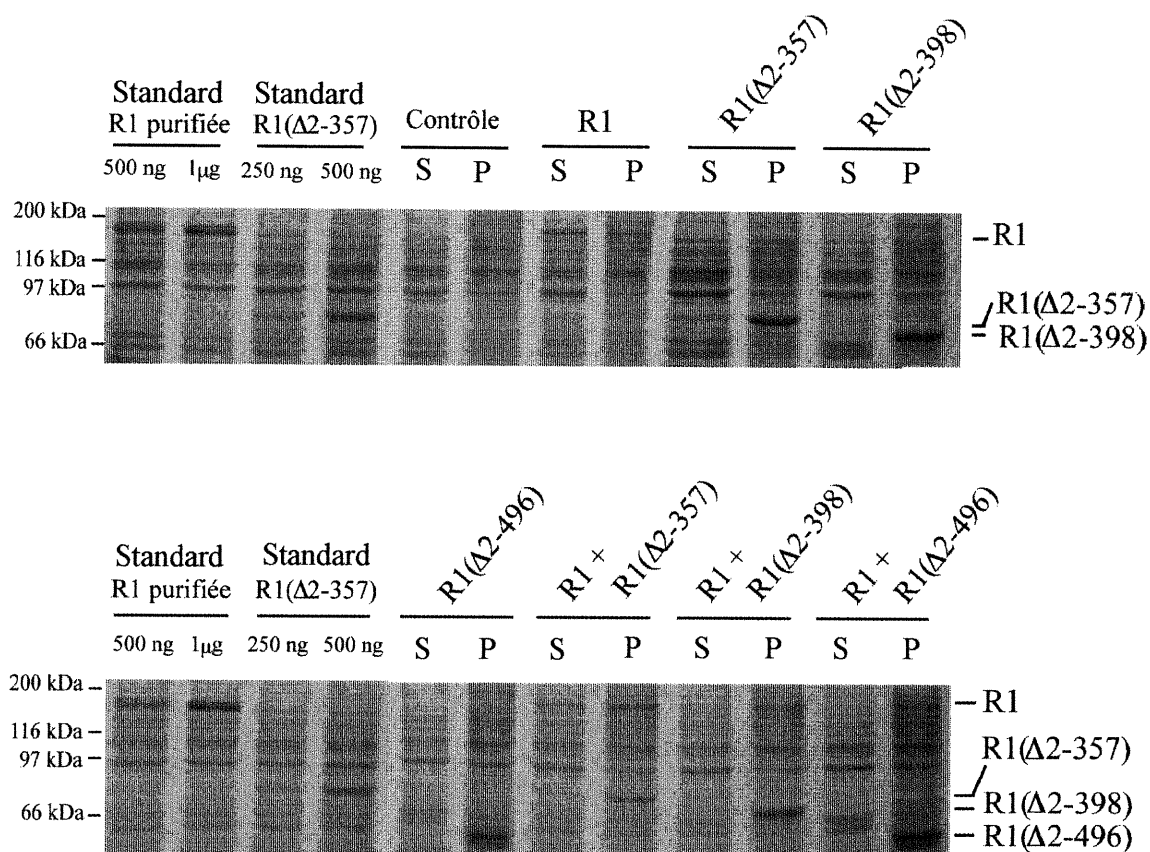


Figure 10 Quantification de la R1 et des R1Δs au bleu de Coomassie.

Les cellules A549tTA ont été non infectées (Contrôle), infectées pendant 24 h à une MOI de 10 PFU/cellule avec le recombinant adénovirus Ad5TR5-R1 (R1), infectées pendant 17 h à 10 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1(Δ2-357) (R1(Δ2-357)), infectées pendant 17 h à 250 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1(Δ2-398)-K7-GFP_Q (R1(Δ2-398)) ou Ad5TR5-R1(Δ2-496)-K7-GFP_Q (R1(Δ2-496)) ou encore infectées pendant les 7 premières heures avec Ad5TR5-R1 à 10 PFU/cellule et ensuite infectées pendant 17 h avec Ad5TR5-R1(Δ2-357) (R1 + R1(Δ2-357)), ou Ad5TR5-R1(Δ2-398)-K7-GFP_Q (R1 + R1(Δ2-398)) ou Ad5TR5-R1(Δ2-496)-K7-GFP_Q (R1 + R1(Δ2-496)). Les extraits cellulaires ont été centrifugés à 100 000g et séparés en culot (P) et surnageant (S). 10 μg d'extraits cellulaires ont été mis sur un gel SDS-Page 7,5% qui a ensuite été coloré au bleu de Coomassie. La R1 et les R1Δs ont été quantifiées dans chacune des fractions d'extraits cellulaires en utilisant de la R1 de HSV-2 purifiée comme standard ou encore des quantités connues de R1(Δ2-357) comme décrit dans Matériel et méthodes.

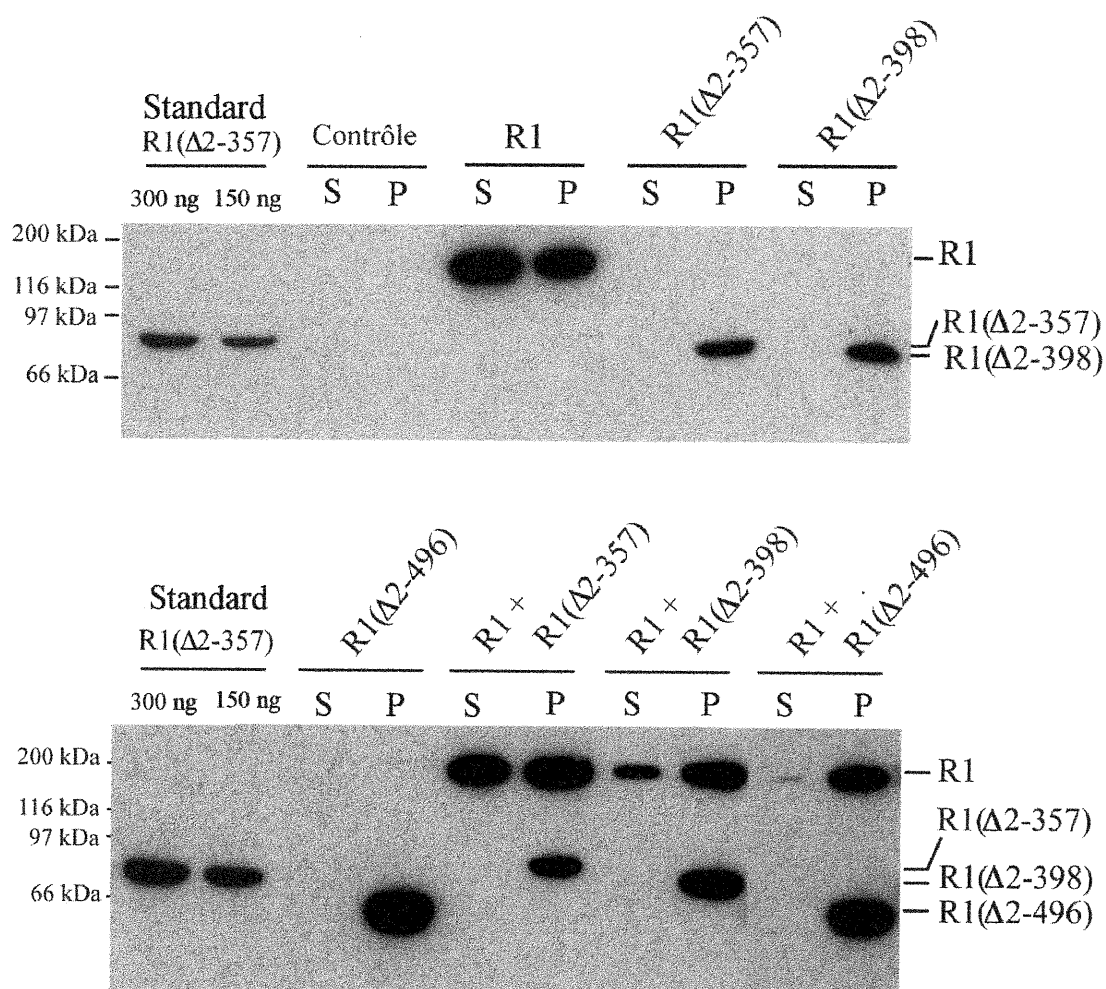


Figure 11 Quantification de la R1 et des R1Δs par immunodétection.

Les mêmes extraits cellulaires que ceux préparés à la figure 10 ont été mis sur gel SDS-Page 7,5%, à raison de 10 µg pour chaque fraction (culots et surnageants) de tous les extraits, et transférés sur membrane de nitrocellulose. La R1 et les R1Δs ont été quantifiées dans chacune des fractions d'extraits en utilisant comme standard des quantités connues d'extrait cellulaire contenant de la R1(Δ2-357) estimée au bleu de Coomassie ou encore de la R1 de HSV-2 purifiée (voir Matériel et méthodes). L'immunodétection des protéines R1 et R1Δs a été réalisée en utilisant l'anticorps polyclonal de lapin168R1 (dilution 1/500).

Tableau I Résumé des quantifications réalisées par immunodétection et au bleu de Coomassie des protéines R1 et R1Δs lors des infections simples et des coinfections avec Ad5TR5-R1.

Extraits	Protéine quantifiée	Bleu de Coomassie		Blot	
		% solubilité	% PCT	% solubilité	% PCT
R1	R1	66,18	3,05	59,56	3,23
R1(Δ2-357)	R1(Δ2-357)	N.Q.	3,65	3,67	2,20
R1(Δ2-398)	R1(Δ2-398)	N.Q.	3,85	N.D.	1,96
R1(Δ2-496)	R1(Δ2-496)	N.Q.	2,32	N.D.	2,54
R1 + R1(Δ2-357)	R1(Δ2-357)	N.Q.	2,10	5,36	1,24
R1 + R1(Δ2-357)	R1	36,13	3,20	38,33	3,10
R1 + R1(Δ2-398)	R1(Δ2-398)	N.Q.	3,07	N.D.	1,48
R1 + R1(Δ2-398)	R1	20,19	2,53	19,11	1,74
R1 + R1(Δ2-496)	R1(Δ2-496)	N.Q.	2,92	N.D.	1,94
R1 + R1(Δ2-496)	R1	N.Q.	1,70	1,89	1,61

N.D. : non détectable

N.Q. : non quantifiable

Moyenne de 3 quantifications pour chaque méthode

Deux expériences effectuées

3.6 Effet de la clasto-lactacystine- β -lactone sur l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) et ubiquitination des protéines R1 Δ s.

La R1(Δ 2-357) étant une protéine agrégée, nous avons voulu tester l'effet d'un inhibiteur de protéasome, la clasto-lactacystine- β -lactone (Lc), sur l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357). Les cellules A549tTA infectées avec Ad5TR5-R1(Δ 2-357) à 10 ou 50 PFU/cellule (Fig. 12A et B) ont été traitées ou non avec de la Lc à 10 μ M. En inhibant le fonctionnement du protéasome par la Lc, nous avons observé une augmentation significative de 14,6% et de 9,2% (24 et 48 h p.i.) de l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) lorsque l'infection avec Ad5TR5-R1(Δ 2-357) est réalisée à 10 PFU/cellule et une augmentation de 16,1% et de 15,5% quand l'infection est réalisée à 50 PFU/cellule. L'augmentation de l'apoptose dans les cellules contrôles traitées avec la Lc fut inférieure à 5%. Le protéasome étant connu comme responsable de la dégradation des protéines agrégées, il est donc possible que l'accumulation d'agrégats de R1(Δ 2-357) soit impliquée dans l'induction de l'apoptose.

Suite à cette dernière expérience, nous avons voulu déterminer si les R1 Δ s sont des protéines ubiquitinées, c'est-à-dire marquées avec une chaîne polyubiquitine en vue d'être dégradées par le protéasome. Des extraits cellulaires contenant soit de la R1, R1(Δ 2-357), R1(Δ 2-398) ou de la R1(Δ 2-496) ont été testés par immunodétection avec un anticorps anti-ubiquitine (Fig. 13). La polyubiquitination des protéines agrégées peut ainsi se visualiser sous la forme d'une échelle de bandes ("ladder") espacées par des intervalles d'environ 7 kDa ou encore par l'apparition d'une traînée de protéines de haut poids moléculaire, ce qui reflète l'attachement covalent de multiples chaînes d'ubiquitine à la protéine ciblée (Glutzer *et al.*, 1991). Dans ce cas-ci, une nouvelle bande fut détectée dans l'extrait de R1(Δ 2-357) dont le poids moléculaire correspondait à celui de la R1(Δ 2-357). Il en fut de même dans les extraits de R1(Δ 2-398) et de R1(Δ 2-496) où dans chaque extrait une nouvelle bande correspondant au poids moléculaire de la R1(Δ 2-398) et de la R1(Δ 2-496) fut détectée. En présence de R1, les trois mêmes bandes correspondant aux protéines R1(Δ 2-357), R1(Δ 2-398) ou R1(Δ 2-496) furent également observées. La

coexpression de la protéine R1 ne semblait pas affecter l'ubiquitination de ces trois protéines agrégées.

L'ensemble de ces observations laissent croire que les R1 Δ s sont des protéines ubiquitinées et que l'inhibition du protéasome augmente l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357).

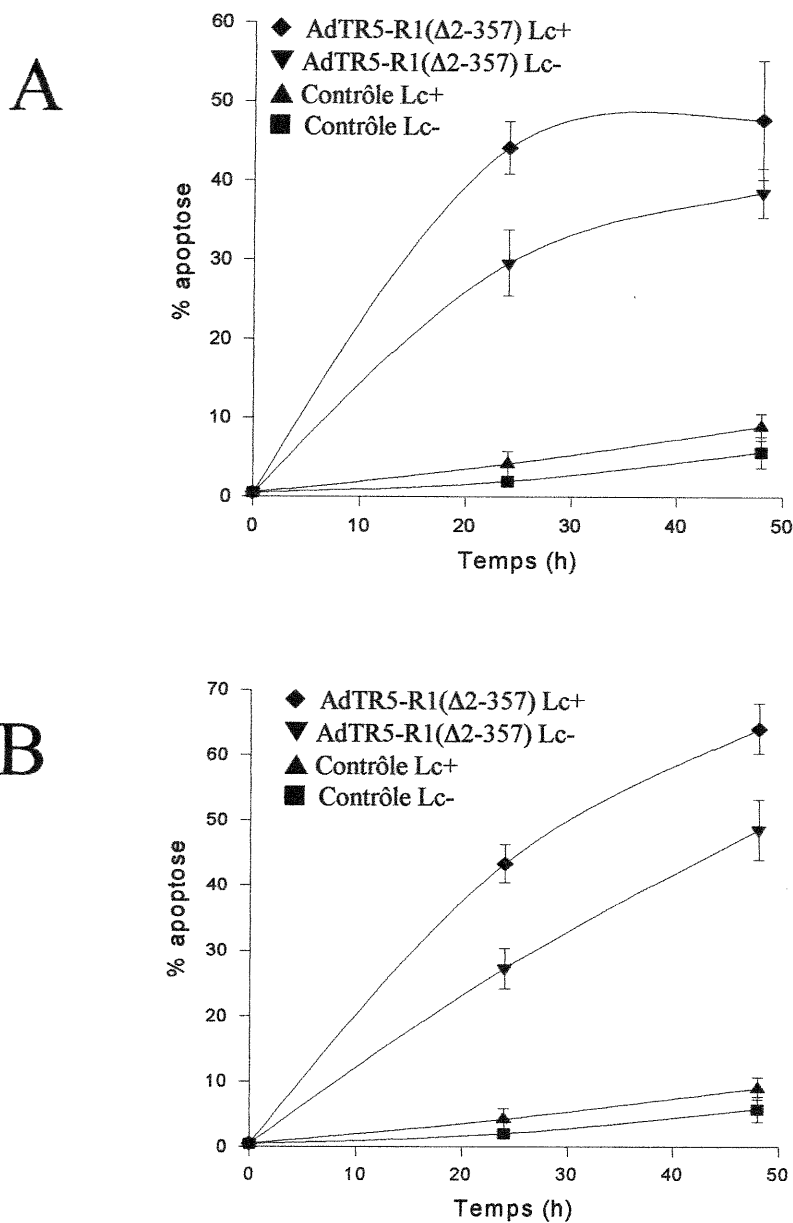


Figure 12 La clasto-lactacystine- β -lactone augmente l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357).

Les cellules A549tTA ont été non infectées (Contrôle) ou infectées avec Ad5TR5-R1(Δ 2-357) à 10 PFU/cellule (A) ou 50 PFU/cellule (B). Tout de suite après infection, les cellules ont été traitées (Lc+) ou non (Lc-) avec la clasto-lactacystine- β -lactone, le produit actif de la lactacystine à 10 μ M. Les pourcentages d'apoptose ont été évalués à 24 h et 48 h p.i. en comptant le nombre de cellules détachées de la boîte de Pétri par rapport au nombre de cellules totales (cellules attachées + cellules détachées). L'expérience a été effectuée deux fois en duplicata (deux boîtes de Pétri par type d'infection).

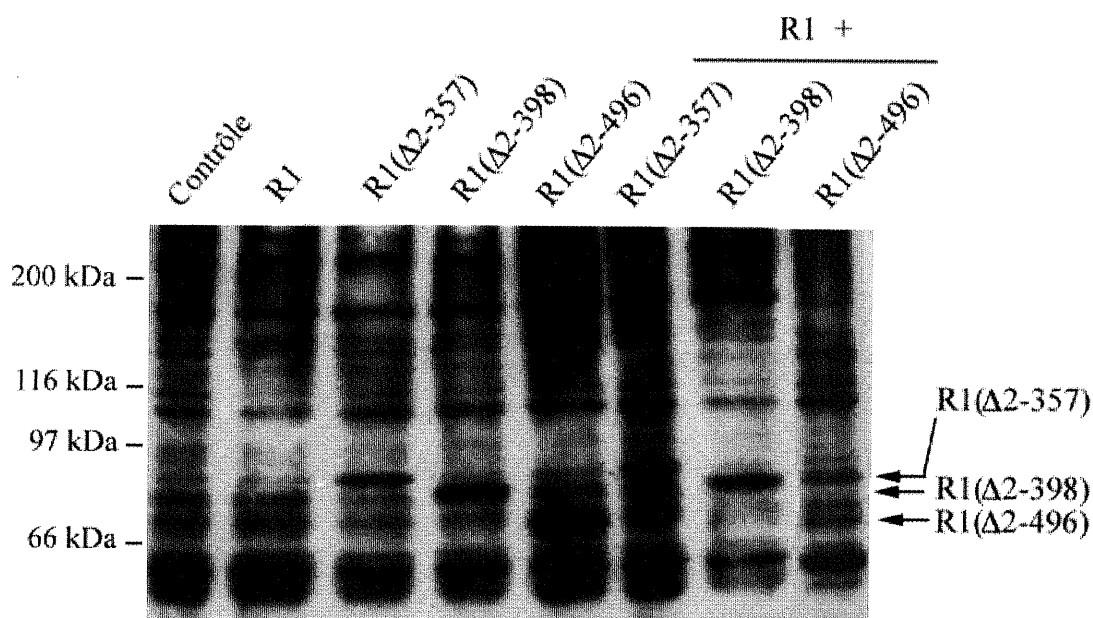


Figure 13 Les protéines R1(Δ2-357), R1(Δ2-398) et R1(Δ2-496) sont des protéines ubiquitinées.

Des cellules A549tTA ont été non infectées (Contrôle), infectées pendant 24 h à une MOI de 10 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1 (R1), infectées pendant 17 h à 10 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1(Δ2-357) (R1(Δ2-357)), infectées pendant 17 h à 250 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1(Δ2-398)-K7-GFP_Q (R1(Δ2-398)) ou Ad5TR5-R1(Δ2-496)-K7-GFP_Q (R1(Δ2-496)) ou encore infectées pendant les 7 premières heures avec Ad5TR5-R1 à 10 PFU/cellule et ensuite infectées pendant 17 h avec Ad5TR5-R1(Δ2-357) (R1 + R1(Δ2-357)), ou Ad5TR5-R1(Δ2-398)-K7-GFP_Q (R1 + R1(Δ2-398)) ou Ad5TR5-R1(Δ2-496)-K7-GFP_Q (R1 + R1(Δ2-496)). 10 μg de protéines de chaque extrait cellulaire ont été déposés sur gel SDS-Page 7,5% et transférés sur membrane de nitrocellulose. L'immunodétection des protéines ubiquitinées a été réalisée avec l'anticorps anti-ubiquitine (dilution 1/5000).

3.7 Effet du choc thermique et de l'expression de la protéine HSP70 ou de la protéine antiapoptotique adénovirale E3-14.7kDa sur l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357).

L'expérience de solubilité des protéines ayant montré que la R1(Δ 2-357) est une protéine peu soluble, nous avons émis l'hypothèse que des protéines chaperonnes comme HSP70 reconnues pour améliorer le repliement des protéines mal repliées pourraient réduire la toxicité induite par la R1(Δ 2-357) en favorisant un meilleur repliement de cette protéine. Pour ce faire, nous avons d'abord procédé à un choc thermique moyen (1 h à 43°C), c'est-à-dire suffisant pour induire la production de protéines HSPs sans induire l'apoptose (Subjeck *et al.*, 1982), des cellules A549tTA juste avant leur infection avec l'adénovirus Ad5TR5-R1(Δ 2-357) à 5 PFU/cellule (Matériel et méthodes). Les comptes d'apoptose effectués à l'hématimètre à différents temps p.i. sont illustrés à la figure 14. Les cellules contrôles A549tTA soumises ou non à un choc thermique moyen obtenaient des taux d'apoptose similaires 24 h (2 % d'apoptose) et 48 h (4% d'apoptose) après le traitement. Dans les cellules préalablement soumises à un choc thermique, l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) ne diminuait pas de façon significative par rapport aux cellules sans choc thermique (Fig. 14).

Cette dernière expérience étant peu concluante, nous nous sommes alors tournés vers l'utilisation d'adénovirus pour surexprimer la protéine chaperonne HSP70 (Fig. 15). Les cellules A549tTA ont d'abord été infectées avec Ad5TR5-HSP70 à 10, 25 ou 100 PFU/cellule et ensuite réinfectées avec Ad5TR5-R1(Δ 2-357) à 10 PFU/cellule (Matériel et méthodes). Les pourcentages d'apoptose ont été déterminés 24 h p.i. en comptant au microscope les cellules accolées et décollées (Matériel et méthodes). Les résultats révèlent que la mortalité induite par la R1(Δ 2-357) ne diminue pas avec une infection avec Ad5TR5-HSP70 à 10 PFU/cellule (42% d'apoptose dans les deux cas) et même qu'elle augmente jusqu'à 50,7 et 59,1% lors de coinfections avec l'adénovirus Ad5TR5-HSP70 utilisé à 25 et 100 PFU/cellule. Étant donné que le niveau d'expression de la protéine chaperonne HSP70 n'a pas été

vérifié dans cette expérience, nous ne pouvons pas affirmer que la surexpression de HSP70 ne peut à elle seule réduire la toxicité de la R1(Δ 2-357).

Afin de mieux explorer le potentiel proapoptotique de la R1(Δ 2-357), nous avons voulu déterminer l'effet de la protéine adénovirale antiapoptotique E3-14.7kDa sur la toxicité de la R1(Δ 2-357). Les cellules ont donc été infectées avec AdCMV5-14.7k à 10 ou 50 PFU/cellule et ensuite réinfectées 7 h plus tard à 10 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1(Δ 2-357) ou AdCMV5-Fas-L (Matériel et méthodes). La protéine antiapoptotique E3-14.7kDa protège non seulement de l'apoptose induite par le Fas-L mais aussi de celle induite par la R1(Δ 2-357) (Fig. 16). En effet, l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) passe de 38,6% à 3,3 et 2,5% quand le virus AdCMV5-14.7k est utilisé respectivement à 10 et 50 PFU/cellule.

En somme, ces observations affirment le fait qu'un choc thermique moyen ne semble pas affecter la toxicité de la protéine R1(Δ 2-357) et que la synthèse de protéines HSP70 est incapable de diminuer l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357). Il ne faudrait pas négliger pour autant la possibilité que d'autres protéines chaperonnes puissent réduire la toxicité de la R1(Δ 2-357) en améliorant son repliement. La protéine antiapoptotique de l'adénovirus E3-14.7kDa protège de l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357).

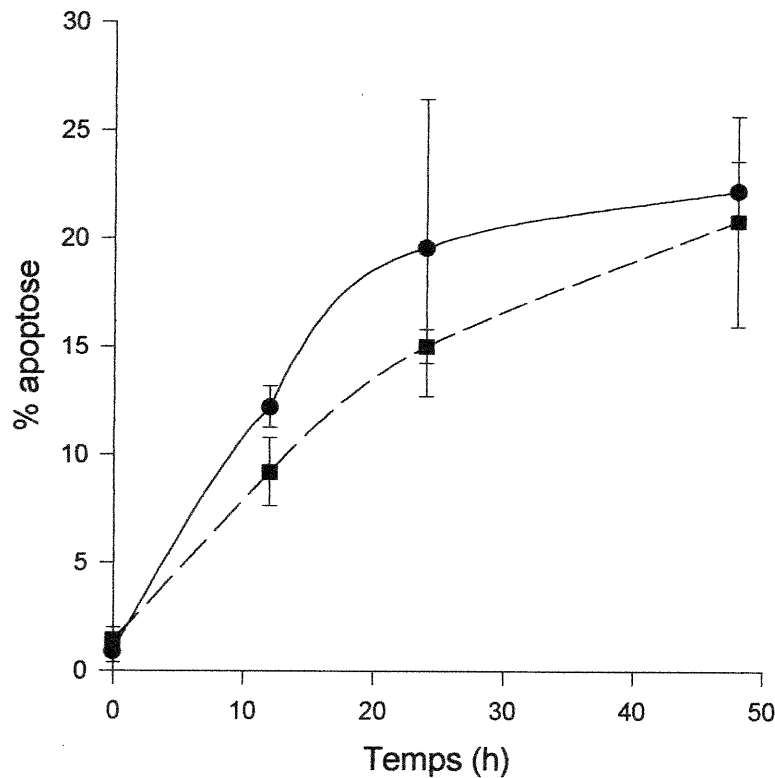


Figure 14 Un choc thermique moyen ne diminue pas l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) dans les cellules A549tTA.

Le graphique représente le pourcentage de mortalité dans les cellules A549tTA en fonction du temps lorsqu'elles ont tout d'abord subi (courbe en pointillée) ou non (courbe pleine) un choc thermique d'une heure à 43°C, suivi d'une infection avec Ad5TR5-R1(Δ 2-357) à 5 PFU/cellule. Les comptes de cellules accolées et décollées ont été effectués à l'hématimètre et les pourcentages d'apoptose ont été évalués en calculant le pourcentage de cellules décollées par rapport au nombre de cellules totales (Matériel et méthodes). L'expérience a été effectuée trois fois en duplicata (deux boîtes de Pétri par type d'infection).

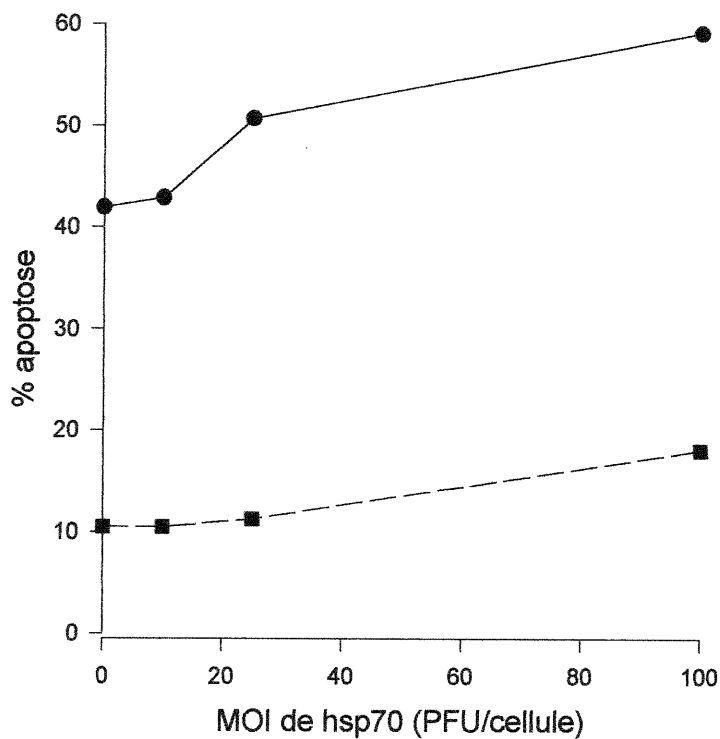


Figure 15 La surexpression de HSP70 ne protège pas les cellules A549tTA de l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357).

Le graphique représente les pourcentages d'apoptose dans les cellules A549tTA après avoir été infectées à différentes MOI (10, 25 et 100 PFU/cellule) avec Ad5TR5-HSP70 pendant 7 h et ensuite avoir été réinfectées (courbe pleine) ou non (courbe pointillée) avec Ad5TR5-R1(Δ 2-357) à 10 PFU/cellule. Les comptes de mortalité ont été évalués 24 h suivant la première infection en calculant le nombre de cellules accolées et décollées (Matériel et méthode). Cette expérience a été réalisée une seule fois.

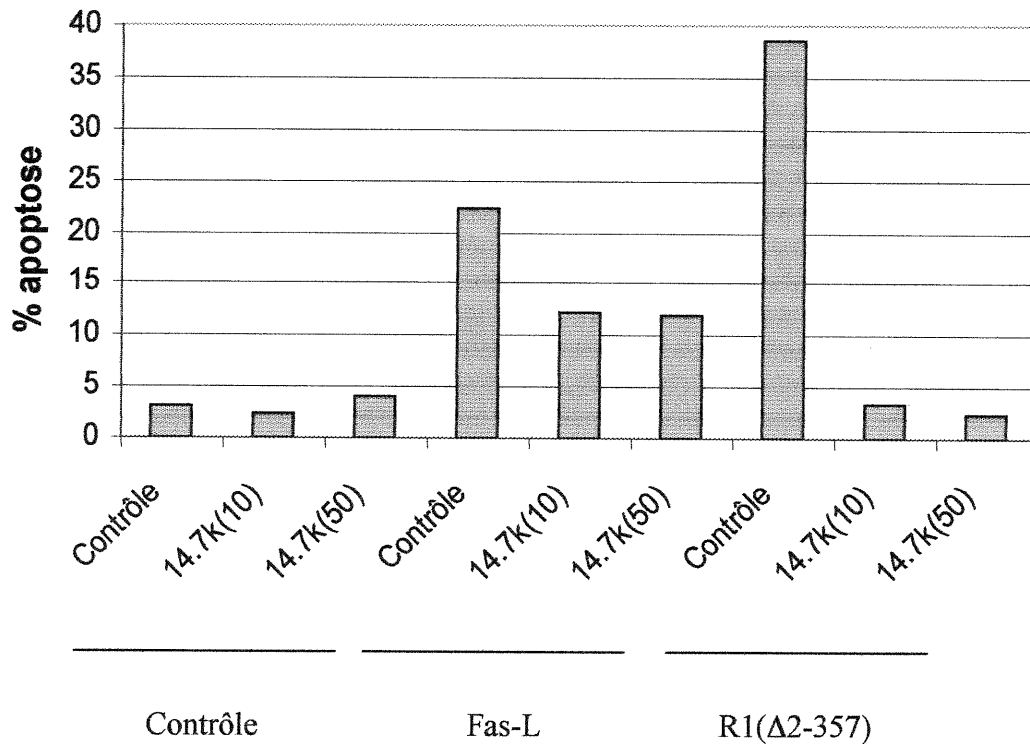


Figure 16 Effet de la protéine adénovirale antiapoptotique E3-14.7kDa sur l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) et Fas-L.

Les cellules A549tTA ont été non infectées (Contrôle) ou infectées à 10 ou 50 PFU/cellule avec AdCMV5-14.7k (14.7k) et 7 h plus tard réinfectées ou non (Contrôle) à 10 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1(Δ 2-357) (R1(Δ 2-357)) ou AdCMV5-Fas-L (Fas-L). Les comptes d'apoptose ont été effectués 24 h suivant la première infection en évaluant le nombre de cellules accolées et décollées (Matériel et méthodes). Les chiffres entre parenthèses indiquent la multiplicité d'infection utilisée. Cette expérience a été réalisée une fois en duplicata (deux boîtes de Pétri par type d'infection).

3.8 Effet des R1Δs et de la R1 sur l'activation des caspases.

Afin d'élucider le mécanisme par lequel la R1(Δ2-357) induit l'apoptose, nous avons étudié l'activation des caspases 8, 3 et 6/9. Nous avons d'abord vérifié l'activation de la caspase 8 par immunodétection dans des extraits cellulaires infectés à 25 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1(Δ2-357) (Matériel et méthodes). La disparition de la proforme inactive (55 kDa) de la caspase 8 en fonction du temps dans les cellules qui expriment la R1(Δ2-357) démontre qu'il y a clivage de la procaspase 8 (Fig. 17).

Étant donné qu'il était impossible de détecter les fragments de la caspase 8 active, nous avons utilisé un substrat fluorescent spécifique à la caspase 8, IEDT-AFC. Des cellules A549tTA ont donc été infectées à 10 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1(Δ2-357) ou encore à 250 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1(Δ2-398)-K7-GFP_Q ou Ad5TR5-R1(Δ2-496)-K7-GFP_Q. Les cellules ont été récoltées à différents temps p.i. et la réaction enzymatique a été réalisée comme décrit dans "Matériel et méthodes". Dans les extraits contenant la R1(Δ2-357), la caspase 8 active détectable à 4 h p.i. fut maximale à 12 h p.i. et diminua par la suite (Fig. 18A). Pour ce qui est des extraits exprimant la R1(Δ2-398), l'activité caspase 8 fut détectable entre 24 et 30 h p.i. mais au même niveau que les contrôles et devint absente à partir de 48 h p.i. Il ne semble pas y avoir d'activation de la caspase 8 dans ces extraits comparativement aux extraits de R1(Δ2-357) où une très forte activité caspase 8 fut détectée à 12 h p.i. L'activité caspase 8 fut indétectable dans les extraits de R1(Δ2-496) (Fig. 18A).

L'étude de l'activation de la caspase 3 a aussi été effectuée en utilisant un substrat spécifique. Les résultats présentés à la figure 18B montre que son activité est détectable à partir de 6 h p.i. dans les extraits de R1(Δ2-357), et à partir de 24 h p.i. pour la R1(Δ2-398) et la R1(Δ2-496). Elle devient maximale à 9 h p.i. pour la R1(Δ2-357), et à 36 h p.i. pour les deux autres R1Δs. Nous remarquons que le maximum d'activité caspase 3 est plus important dans les extraits de R1(Δ2-496) (992 nM/min/mg) que celui des extraits de R1(Δ2-398) (380 nM/min/mg) ou de R1(Δ2-357) (625 nM/min/mg). On peut conclure que l'apoptose induite par les R1Δs mène à l'activation de la caspase 3.

L'activation des caspases 6/9 fut détectable à partir de 9 h p.i. en présence de R1(Δ 2-357) et maximale à 12 h p.i. (Fig. 18C). Les caspases 6/9 furent également activées 24 h p.i. en présence de R1(Δ 2-398) ou de R1(Δ 2-496) et l'activation fut maximale à 36 h p.i. L'apoptose induite par les protéines R1 Δ s mène également à l'activation des caspases 6/9. Pour ce qui est de l'activité caspase 1, les fluctuations d'activation sont non significatives (résultat non montré).

Pour mieux visualiser l'ordre d'activation des caspases 8, 3 et 6/9, les données de la figure 18 ont été retracées en pourcentage de leur maximum d'activation (Fig. 19). En observant les pourcentages d'activités caspases maximales pour les extraits de R1(Δ 2-357) (Fig. 19), on remarque que l'activation de la caspase 8 (4 h p.i.) précède l'activation des caspases 3 (6 h p.i.) et 6/9 (9 h p.i.). L'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) débute donc par l'activation de la caspase 8.

L'activation des caspases 3 et 6/9 induite par les R1(Δ 2-398) et R1(Δ 2-496) était concomitante (résultat non montré). Dans les extraits de R1(Δ 2-398), l'activation de la caspase 8 précède l'activation des caspases 3 et 6/9 (à partir de 30 h p.i.). La caspase 8 n'est pas du tout impliquée dans l'apoptose induite par la R1(Δ 2-496).

Nous avons voulu déterminer l'effet de la R1 sur l'activation des caspases par les R1 Δ s. Nous avons donc procédé au préalable à une première infection de 16 h avec Ad5TR5-R1 à 10 PFU/cellule suivi des mêmes infections avec les R1 Δ s. Dans les extraits qui coexpriment la R1 et la R1(Δ 2-357), nous remarquons que l'activité caspase 8 est similaire à celle du contrôle (environ 5 pM/min/mg) (Fig. 18A). L'activité caspase 8 est complètement absente avec les coinfections R1 + R1(Δ 2-398) ou R1 + R1(Δ 2-496) (Fig. 18A). Pour ce qui est de l'activité caspase 3, elle est totalement absente dans l'extrait R1 + R1(Δ 2-357), et non significative dans l'extrait de R1 + R1(Δ 2-398) (Fig. 18B). Par contre, lors d'une coinfection avec R1 et R1(Δ 2-496), l'activité caspase 3 est détectable 30 h p.i. et continue d'augmenter jusqu'à 48 h p.i. Si l'on compare les taux d'activité caspase 1 des coinfections avec celui des cellules contrôles, nous constatons que l'activité caspase 1 est négligeable (résultat non montré). L'activité caspase 6/9 est complètement nulle pour les trois types de coinfections (Fig. 18C).

En somme, l'apoptose induite par chacune des R1 Δ s ne débute pas par les mêmes événements d'activation des caspases. Dans le cas de la R1(Δ 2-357) et de la R1(Δ 2-398), elle débute par l'activation de la caspase 8 suivi des caspases 3 et 6/9. Pour ce qui est de la R1(Δ 2-496), elle débute par les caspases 3 et 6/9. Cependant, nous pouvons affirmer que la cascade d'activation des caspases survient beaucoup plus tôt dans le cas de la R1(Δ 2-357), ce qui explique les manifestations plus précoces de l'apoptose par rapport aux deux autres protéines agrégées R1(Δ 2-398) et R1(Δ 2-496). Nous pouvons également conclure que la coexpression de la R1 dans les extraits de R1 Δ s empêche l'activation de la caspase 8 et abolit complètement celle des caspases 6/9. Bien que la présence de la R1 empêche l'activation de la caspase 3 dans les extraits de R1(Δ 2-357) et R1(Δ 2-398), celle-ci n'empêche pas l'activation de la caspase 3 dans les extraits de R1(Δ 2-496) 48 h p.i.

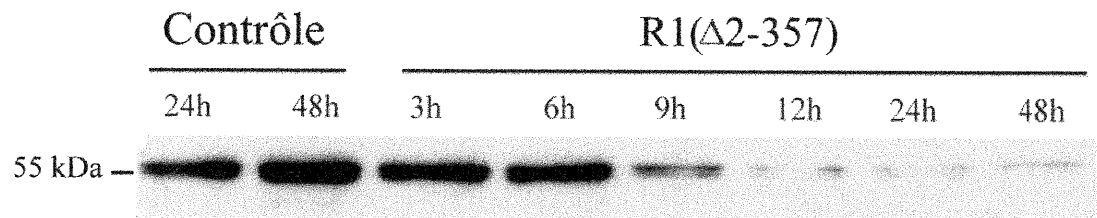


Figure 17 La R1(Δ 2-357) mène au clivage de la procaspase 8.

Des cellules A549TtA non infectées (Contrôle) ou infectées pendant 7 h avec Ad5TR5-R1(Δ 2-357) (R1(Δ 2-357)) à 25 PFU/cellule ont été récoltées à différents temps post-infection. 10 μ g d'extraits protéiques ont été déposées sur gel SDS-Page 12% puis transférés sur membrane de nitrocellulose. La disparition de la procaspase 8 (55 kDa) a été observé par immunodétection avec un anticorps anti-caspase 8 (dilution 1/1000). L'expérience a été effectuée une seule fois mais deux immunodétections ont été réalisées.

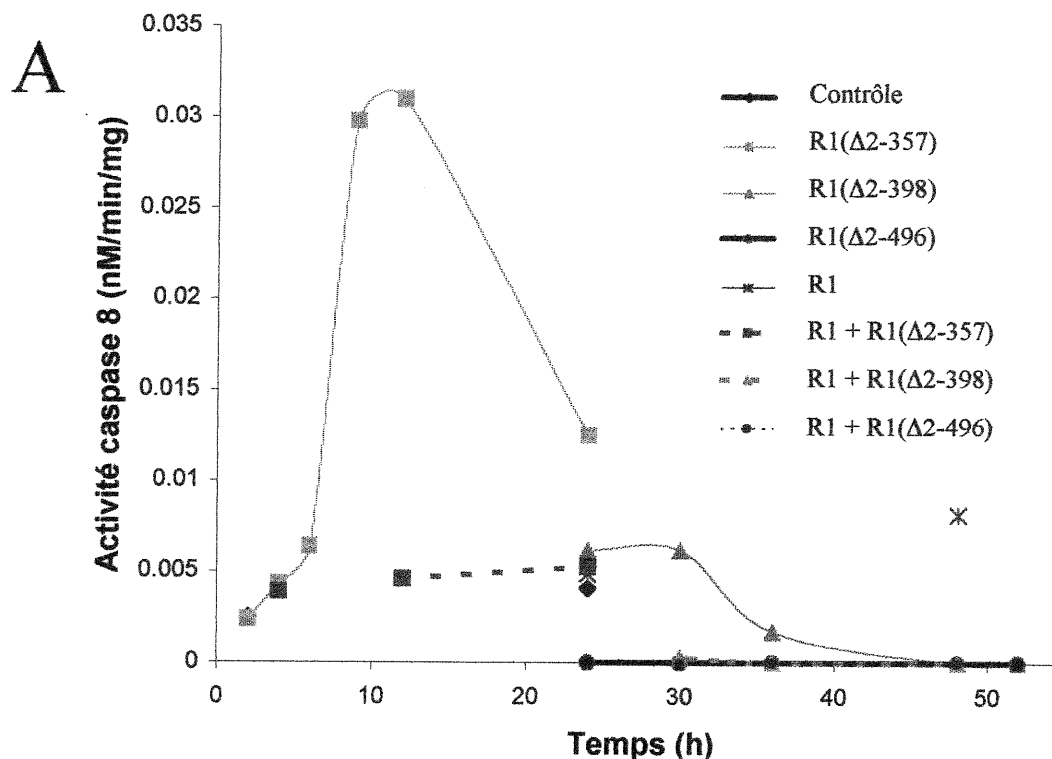
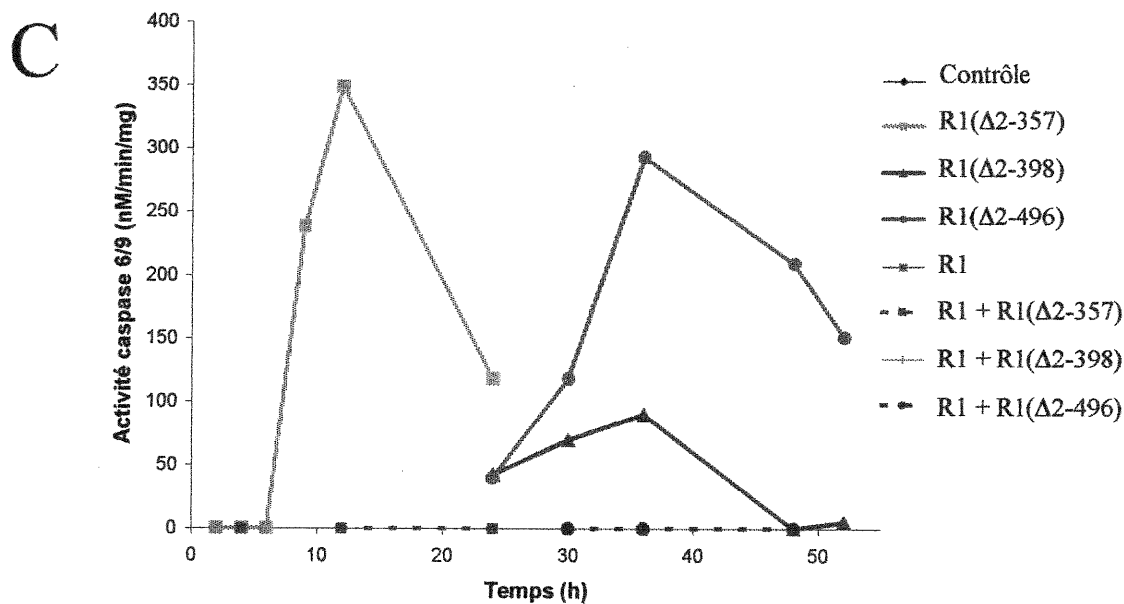
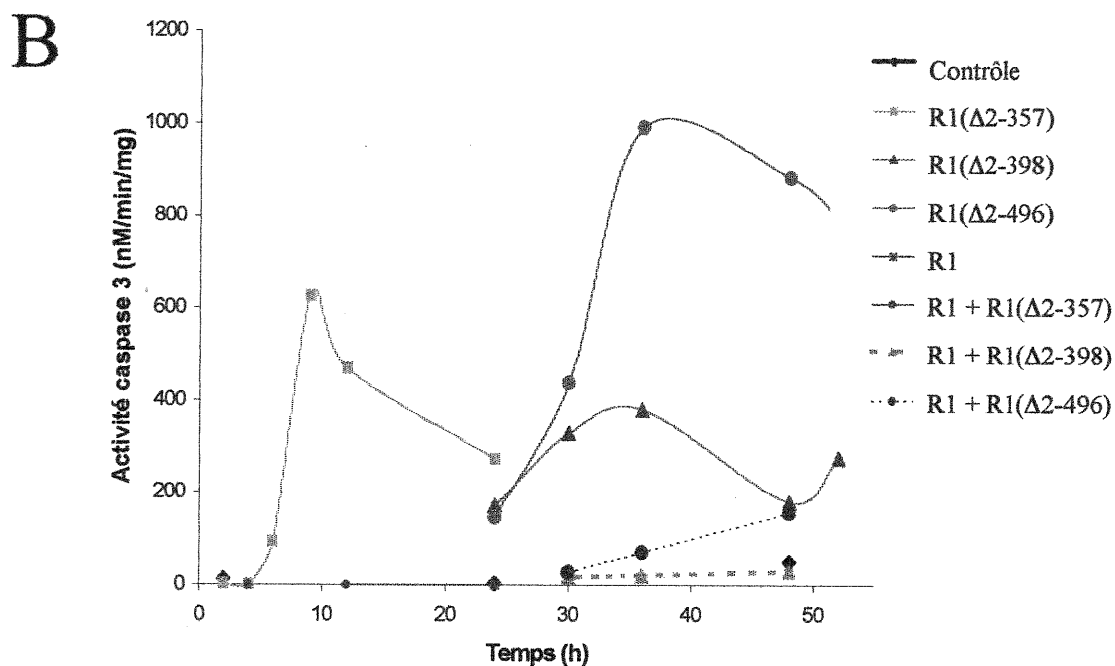


Figure 18 Effet de la R1 et des protéines agrégées R1(Δ 2-357), R1(Δ 2-398) et R1(Δ 2-496) sur l'activation des caspases 3, 8 et 6/9 dans les cellules A549tTA.

(A) Le graphique représente l'activité caspase 8 en fonction du temps dans des extraits cellulaires de A549tTA non infectées (Contrôle) ou infectées une seule fois (courbes pleines) à 10 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1 ou Ad5TR5-R1(Δ 2-357), ou infectées à 250 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1(Δ 2-398)-K7-GFP_Q ou Ad5TR5-R1(Δ 2-496)-K7-GFP_Q; ou encore infectées à 10 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1 (courbes pointillées) suivi 7 h plus tard d'une infection à 10 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1(Δ 2-357) ou à 250 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1(Δ 2-398)-K7-GFP_Q ou Ad5TR5-R1(Δ 2-496)-K7-GFP_Q. Les cellules ont été récoltées à différents temps post-infection et la réaction enzymatique a été réalisée en utilisant 60 μ g d'extraits protéiques et 5 μ l de substrat spécifique pour la caspase 8 (Matériel et méthodes). L'expérience a été effectuée une seule fois.



(B) Le graphique représente l'activité caspase 3 en fonction du temps dans les mêmes extraits que ceux présentés en (A). La réaction enzymatique a été réalisée de la même façon qu'en (A) mais avec le substrat spécifique pour la caspase 3 active.

(C) Le graphique représente l'activité caspase 6/9 en fonction du temps dans les mêmes extraits que ceux présentés en (A). La réaction enzymatique a été réalisée avec le substrat spécifique pour les caspases 6 et 9.

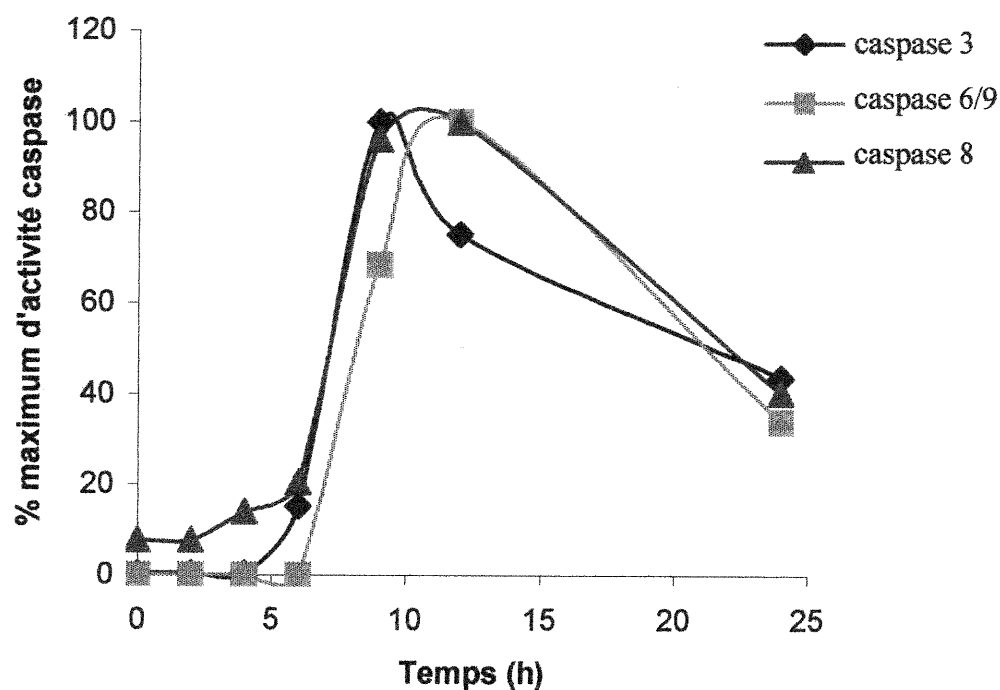


Figure 19 Pourcentages d'activités caspases maximales dans les extraits de R1(Δ 2-357).

Les graphiques représentent les pourcentages d'activités caspases maximales dans les extraits de cellules A549tTA qui ont été infectées à 10 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1(Δ 2-357). Les cellules ont ensuite été récoltées à différents temps p.i. et les réactions enzymatiques pour les caspases 3, 8 et 6/9 ont été réalisées en utilisant 60 μ g d'extraits protéiques et 5 μ l de substrat spécifique aux caspases (voir Matériel et méthodes). Les valeurs maximales d'activités caspases sont les suivantes: caspase 3: 625,18 nM/min/mg; caspase 6/9: 348,6 nM/min/mg; caspase 8: 0,031 nM/min/mg. L'expérience a été effectuée une seule fois.

3.9 Mécanisme d'induction de l'apoptose de la R1(Δ 2-357).

En vue de déterminer comment la R1(Δ 2-357) pourrait contribuer à l'activation de la procaspase 8, nous avons vérifié si nous pouvions détecter des interactions entre les agrégats de R1(Δ 2-357) et la procaspase 8 et FADD, deux protéines impliquées dans l'activation de la cascade du récepteur Fas. Pour ce faire, des cellules A549tTA ont été infectées à une MOI de 10 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1 et 7 h plus tard réinfectées ou non avec AdTR5-R1(Δ 2-357) à 100 PFU/cellule pendant 17 h (Matériel et méthodes). Les extraits cellulaires ont été centrifugés, séparés en culot (P) et surnageant (S) et soumis à l'immunodétection des protéines procaspase 8 et FADD (voir Matériel et méthodes). Nous observons à la figure 20 que la procaspase 8, qui est une protéine relativement soluble, est plus présente dans le surnageant de l'extrait contrôle et de l'extrait contenant la R1. Par contre, dans l'extrait de R1(Δ 2-357) (R1 Δ), la procaspase 8 se retrouve majoritairement dans le culot. Il en est de même avec la protéine FADD qui est très soluble et que l'on retrouve presque uniquement dans le surnageant des extraits contrôles. En présence de R1(Δ 2-357), la protéine FADD se retrouve également recrutée dans le culot de l'extrait. Lorsqu'on effectue des coexpressions des protéines R1 et R1(Δ 2-357), l'effet d'entraînement des protéines FADD et procaspase 8 dans le culot est complètement empêché.

Le recrutement de la procaspase 8 et de FADD dans le culot de R1(Δ 2-357), démontre une interaction possible entre ces protéines proapoptotiques et les agrégats de R1(Δ 2-357). Étant donné que le recrutement de ces deux protéines diminue en présence de R1, il est possible que le potentiel antiapoptotique de la R1 se manifeste en empêchant l'interaction entre les agrégats de R1(Δ 2-357) et les protéines FADD et procaspase 8.

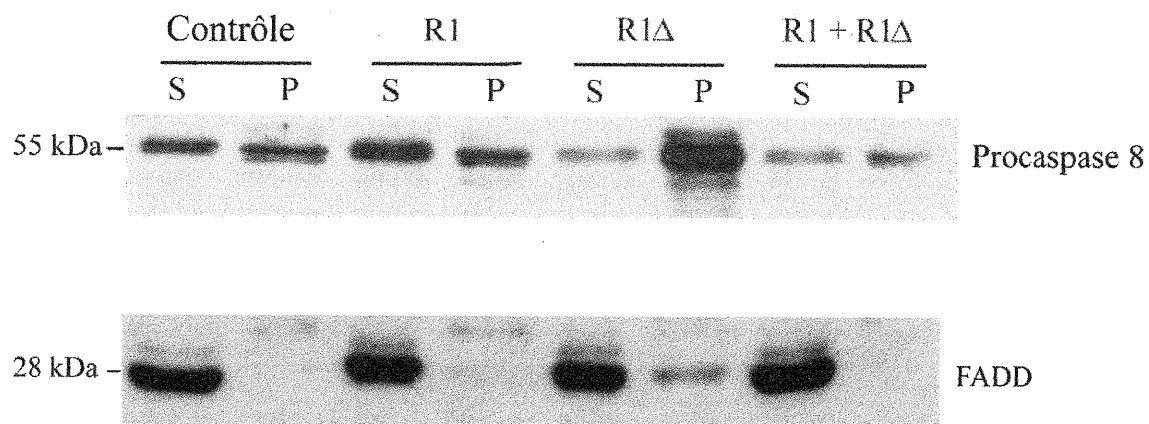


Figure 20 Recrutement de la procaspase 8 et de FADD par les agrégats de R1(Δ 2-357).

Les cellules A549fTA ont été non infectées (Contrôle), infectées pendant 24 h à une MOI de 10 PFU/cellule avec Ad5TR5-R1 (R1), infectées pendant 17 h avec AdTR5-R1(Δ 2-357) à 100 PFU/cellule (R1 Δ), ou encore infectées pendant 7 h avec Ad5TR5-R1 à 10 PFU/cellule et ensuite avec Ad5TR5-R1(Δ 2-357) pendant 17 h à 100 PFU/cellule (R1 + R1 Δ). Les extraits cellulaires ont été centrifugés, séparés en culot (P) et surnageant (S). 10 μ g d'extraits protéiques ont migrés sur gel SDS-Page 12% et ont été transférés sur membrane de nitrocellulose. L'immunodétection de la procaspase 8 (55K) et FADD (28K) a été réalisée en utilisant les anticorps anti-caspase 8 (dilution 1/1000) et anti-FADD (dilution 1/1000).

4. Discussion

4.1 Étude du potentiel proapoptotique de la R1(Δ 2-357).

La R1 de la RR des HSV a la particularité, si on la compare avec la R1 de d'autres espèces (voir figure 1), d'avoir une extension d'environ 350 a.a. à l'extrémité NH₂ non-essentielle à l'activité réductase. Des travaux réalisés dans le laboratoire par mes prédécesseurs ont révélé qu'une délétion de ce domaine NH₂ (du 2^e au 357^e a.a.) dans la sous-unité R1 de HSV-2 générait une protéine cytotoxique R1(Δ 2-357) (Massie *et al.*, 1998). Ils ont également confirmé que les cellules exprimant cette protéine tronquée mourraient par apoptose (Lippens, 1998) et que la R1 était capable de protéger les cellules A549tTA de l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357), le Fas-L et le TNF- α (Bergeron, 1998). Finalement, des études ont aussi démontré que pvhs-, un mutant HSV-1 portant une délétion pour la R1, est moins efficace que les HSV sauvages pour protéger les cellules A549tTA de l'apoptose induite par le TNF- α (Langelier *et al.*, 2001). La R1 de HSV-2 pourrait donc avoir un rôle en protégeant les cellules infectées par HSV de la mort induite par les lymphocytes T et le TNF- α , et ainsi permettre au virus de compléter sa réplication.

Mon projet de recherche consistait donc à déterminer comment la R1(Δ 2-357) induit l'apoptose et comprendre comment la R1 protège de l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357). Nous avons tout d'abord constaté que la toxicité induite par la R1(Δ 2-357) n'implique pas des protéines de l'adénovirus. Nos premières expériences ont aussi démontré que les protéines R1(Δ 2-357), R1(Δ 2-398) et R1(Δ 2-496) sont des protéines agrégées et ubiquitinées mais il n'y a pas de corrélation entre leur insolubilité et leur toxicité. Nous pouvons également conclure que la carence en sérum, l'addition de cycloheximide et la clasto-lactacystine- β -lactone augmentent l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) dans les cellules A549tTA tandis que la protéine adénovirale E3-14.7kDa protège de l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357). Un choc thermique et la surexpression de la protéine HSP70 ne diminuent pas l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357). Pour ce qui est du mécanisme d'induction de l'apoptose des protéines R1 Δ s, mes résultats suggèrent qu'il n'y a pas de cascade d'activation des caspases commune à ces protéines agrégées. Par contre, il y a activation et

relocalisation de la caspase 8 au niveau des inclusions de R1(Δ 2-357). Le potentiel antiapoptotique de la R1 se manifeste en empêchant l'activation des caspases par les R1 Δ s et la relocalisation de la caspase 8 en présence de R1(Δ 2-357).

4.1.1 La mortalité induite par la R1(Δ 2-357) n'implique pas des protéines de l'adénovirus.

Étant donné que toutes les expériences effectuées pour caractériser l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) avaient toutes été réalisées par des infections dans les cellules A549tTA avec l'adénovirus Ad5TR5R1(Δ 2-357), nous avons d'abord voulu vérifier si des protéines adénovirales pouvaient être impliquées dans le processus cytotoxique de la R1(Δ 2-357). Des transfections ont donc été réalisées dans les cellules HeLaTtTA avec des plasmides exprimant la protéine R1(Δ 2-357) sous le contrôle d'un promoteur constitutif ou régulé par la tétracycline (Fig. 3). Nous avons pu démontrer qu'en absence de protéines virales, la R1(Δ 2-357) avait encore un potentiel proapoptotique.

4.1.2 Hypothèse du domaine proapoptotique

Pour expliquer le potentiel proapoptotique de la R1(Δ 2-357), nous avons d'abord émis l'hypothèse que la délétion (Δ 2-357) avait d'une part enlever un domaine antiapoptotique et d'autre part conduit à la surexpression d'une protéine proapoptotique. Cette délétion aurait donc démasqué une région proapoptotique du domaine réductase. La R1(Δ 2-357) pourrait avoir dans son domaine réductase une région proapoptotique lui permettant d'interagir avec certaines protéines impliquées dans la cascade de l'apoptose comme la caspase 8 ou une protéine de la famille Bcl-2. Le fait que la R1 n'induit pas l'apoptose pourrait s'expliquer par la présence du domaine NH₂ antiapoptotique qui permettrait de contrer l'apoptose induite par ce domaine proapoptotique; ou encore, qui empêcherait l'accessibilité au domaine proapoptotique en le masquant.

4.1.3 Hypothèse de l'agrégation de protéines

La caractérisation de ces protéines notamment en ce qui concerne leur localisation et leur solubilité a cependant fait surgir une autre hypothèse. Nous avons constaté (Fig. 8 et 9) que la R1 pleine longueur est localisée de manière diffuse dans le cytoplasme tandis que la R1(Δ 2-357) forme de grandes inclusions cytoplasmiques généralement en périphérie du noyau. L'observation de ces agrégats de R1(Δ 2-357) laissait suggérer que cette protéine était insoluble et que l'agrégation de R1(Δ 2-357) pourrait être responsable de l'induction de l'apoptose. En fait, la R1(Δ 2-357) s'agrègerait parce que la délétion expose des sites hydrophobes normalement maintenus à l'intérieur de la structure de la R1 et affecte ainsi la capacité de la protéine à se replier correctement.

4.1.4 Création de protéines R1 Δ s plus courtes

Suivant l'idée de cette deuxième hypothèse, nous pouvons supposer qu'il serait possible de créer des protéines R1 Δ qui auraient un meilleur repliement et par conséquent seraient moins proapoptotiques. Pour ce faire, nous avons construit deux recombinants adénovirus permettant l'expression de protéines R1 Δ plus courtes, c'est-à-dire portant des délétions du 2^e a.a. jusqu'à la position 398 et 496 (Fig. 2).

Nous avons ensuite étudié le potentiel proapoptotique de ces deux nouvelles protéines R1(Δ 2-398) et R1(Δ 2-496) et comparé leur toxicité avec celle de la R1(Δ 2-357). En procédant à des infections avec ces deux nouveaux adénovirus à des MOI permettant la production de quantités similaires de R1 Δ s (Fig. 7), nous avons remarqué que la mortalité induite par la R1(Δ 2-398) et la R1(Δ 2-496) se manifestait plus tardivement que celle induite par la protéine R1(Δ 2-357). En procédant à des coinfections (Fig. 7), nous avons observé que la R1 protège efficacement de l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357). Bien que l'effet antiapoptotique de la R1 se manifeste 24 h p.i. avec la R1(Δ 2-398) et la R1(Δ 2-496), la mortalité induite par ces deux R1 Δ s 96 h p.i. ne diminue plus en présence de R1. Il est possible que les fortes

MOI utilisées soient responsables d'une certaine toxicité associée à l'expression de protéines virales à des temps supérieurs à 48 h p.i., ou encore que la R1 ne puisse pas protéger efficacement contre ces deux protéines R1Δs. Nous ne pouvons pas éliminer l'hypothèse qu'une expression plus importante de ces deux protéines surviendrait à des temps supérieurs à 48 h p.i.

4.1.5 Les R1Δs sont des protéines agrégées.

Afin de vérifier l'hypothèse que les R1Δs seraient des protéines agrégées, nous avons déterminé le pourcentage de solubilité de la R1 et des R1Δs. Les quantifications ont révélé une très faible solubilité (environ 4%) pour la R1(Δ2-357) tandis que la solubilité de la R1 est d'environ 66% (tableau I). Pour ce qui est des protéines R1(Δ2-398) et R1(Δ2-496), leur solubilité est estimée à moins de 0,05%. Ce résultat va donc en faveur de l'hypothèse d'agrégation des protéines R1(Δ2-357), R1(Δ2-398) et R1(Δ2-496). Cependant, il n'y a pas de corrélation entre l'insolubilité de ces protéines et leur toxicité.

Dans un premier temps, nous avons d'abord supposé que l'effet antiapoptotique de la R1 pourrait se manifester en améliorant le repliement des R1Δs, mais ce n'est pas le cas. En effet, en effectuant des coexpressions de la R1 avec soit la R1(Δ2-357), la R1(Δ2-398) ou R1(Δ2-496) (Fig. 10 et 11), on remarque que non seulement la solubilité des R1Δs n'est pas améliorée, mais en plus, la solubilité de la R1 est réduite à 38% en présence de R1(Δ2-357), à 19% en présence de R1(Δ2-398) et à environ 2% en présence de R1(Δ2-496) (tableau I). La R1 n'aide donc en rien le repliement de ces protéines agrégées.

Le protéasome étant responsable de la dégradation des protéines, nous avons supposé qu'en utilisant de tels inhibiteurs, cela aurait pour effet d'augmenter l'apoptose induite par la R1(Δ2-357). L'augmentation de l'apoptose induite par la R1(Δ2-357) en présence de Lc (Fig. 12) appuie l'hypothèse que l'accumulation d'agrégats de R1(Δ2-357) serait responsable de l'apoptose. Afin de vérifier cette

hypothèse, nous pourrions déterminer par immunofluorescence le nombre d'agrégats de R1(Δ 2-357) présents dans les cellules traitées ou non avec la Lc.

Les immunodétections effectuées avec un anticorps anti-ubiquitine (Fig. 13) montrent également que les R1 Δ s sont des protéines ubiquitinées tout comme les inclusions de protéines agrégées et ubiquitinées observées chez certaines pathologies associées aux répétitions CAG (Canu *et al.*, 2000). Les protéines R1(Δ 2-357), R1(Δ 2-398) et R1(Δ 2-496) sont possiblement dégradées de manière ubiquitine-protéasome-dépendante.

4.1.6 Relation entre l'agrégation de R1(Δ 2-357) et l'apoptose.

Maintenant que nous savons que les R1 Δ s sont des protéines agrégées, il reste à déterminer si l'accumulation d'agrégats est responsable de l'apoptose observée dans les cellules A549tTA. Bien que l'agrégation des protéines a été associée à plusieurs pathologies, l'implication de ces agrégats dans l'apoptose reste encore très obscure (Clark et Muchowski, Review 2000). Il a été démontré récemment que les cellules gardent encore la capacité d'avoir des processus normaux malgré la présence d'agrégats, ce qui suggère que la formation d'inclusions associées à certaines pathologies serait un phénomène général pour protéger les cellules de la toxicité des protéines agrégées (García-Mata *et al.*, 1999). Malgré le fait que plusieurs études supportent cette hypothèse (Saudou *et al.*, 1998; Klement *et al.*, 1998; Klement *et al.*, 1999; Cummings *et al.*, 1999), une étude portant sur la maladie d'Huntington a cependant associé la formation d'agrégats à l'apoptose et à l'activation de la caspase 8 (Sánchez *et al.*, 1999). Ce laboratoire a démontré que l'expression d'huntingtine mutée portant une queue polyglutamines (Q79) active et recrute la caspase 8 dans les inclusions de Q79. L'inhibition de l'activation de la caspase 8 en utilisant l'inhibiteur CrmA ou une forme dominante négative de FADD, Bcl-2 ou Bcl-XL prévient le recrutement de la caspase 8 et l'apoptose induite par l'expression de Q79.

Pour ce qui est des agrégats de R1(Δ 2-357) observés à l'immunofluorescence et en microscopie électronique, ils sont présents dans les cellules qui survivent à l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357), c'est-à-dire qui restent attachées à la paroi des

boîtes de Pétri. En plus, nous savons qu'une très faible quantité de R1(Δ 2-357) est capable d'induire l'apoptose (moins de 0,006% PCT) (Lippens, 1998) et que cette protéine toxique commence à induire l'activation de la caspase 8 à partir de 4 h p.i. (Fig. 18.A) et l'apoptose à partir de 6 h p.i., temps où l'accumulation de R1(Δ 2-357) n'est pas assez importante pour que les agrégats soient observables à l'immunofluorescence. L'ensemble de ces résultats suggère que la formation des grosses inclusions serait un phénomène général dû à l'accumulation de protéines agrégées. Il est possible que la formation d'inclusions protège les cellules de l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) en empêchant la dispersion de la protéine agrégée.

4.1.7 Constitution des agrégats de R1(Δ 2-357)

Afin d'en savoir plus sur la nature de ces inclusions de R1(Δ 2-357), nous avons observé les cellules en microscopie électronique (Fig. 9) et constaté que les inclusions n'apparaissent pas aussi denses qu'en immunofluorescence. Elles sont constituées de petites structures arrondies d'environ 50-100 nm de largeur plus ou moins denses aux électrons. Elles n'ont pas de matériel filamenteux (fibres de 8 à 10 nm) comme dans les inclusions de protéines agrégées ubiquitinées associées à plusieurs pathologies (Johnston *et al.*, 1998; Wigley *et al.*, 1999). Il est probable que ces petites structures arrondies soient constituées de R1(Δ 2-357) et de SHSPs dont la taille est d'environ 20 nm. Des organelles comme des mitochondries ont pu être identifiées dans les grosses inclusions de R1(Δ 2-357).

Lorsque la R1 est coexprimée avec la R1(Δ 2-357) pour bloquer l'apoptose, les agrégats de R1(Δ 2-357) sont dispersés en dizaines d'inclusions cytoplasmiques (Fig. 8). En microscopie électronique (Fig. 9), nous constatons que ces inclusions sphériques de R1 et R1(Δ 2-357) sont entourées d'une couche épaisse de matériel dense contenant notamment la R1 et que leur centre contient du matériel peu dense. Aucun organelle ou structure cellulaire n'a pu être identifié dans les inclusions contenant la R1 et la R1(Δ 2-357). Des études en cours visent à identifier la nature de ces inclusions cytoplasmiques. Ces résultats démontrent que la R1 interfère dans la

localisation des agrégats de R1(Δ 2-357) et laissent supposer que le potentiel antiapoptotique de la R1 est lié à sa capacité d'empêcher des interactions entre les inclusions de R1(Δ 2-357) et des protéines proapoptotiques.

4.1.8 Effet d'un choc thermique moyen et de la surexpression de HSP70 sur l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357).

Les expériences précédentes montrant que les R1 Δ s sont des protéines insolubles, nous avons émis l'hypothèse que des protéines chaperonnes comme HSP70, reconnues pour améliorer le repliement des protéines mal repliées (Morimoto *et al.*, 1994), pourraient réduire la toxicité induite par la R1(Δ 2-357). Nous avons donc soumis les cellules exprimant la R1(Δ 2-357) à un choc thermique moyen (1 h à 43°C), traitement connu pour induire la thermotolérance grâce à une augmentation de l'expression de protéines chaperonnes (HSPs) et tout particulièrement l'expression de HSP70 (Subjeck *et al.*, 1982). Un choc thermique augmente également l'expression des SHSPs de 10 à 20 fois jusqu'à une concentration maximale de 0,1% PCT (Arrigo et Landry, 1994). Ces SHSPs augmentent aussi la thermorésistance (Landry *et al.*, 1989).

Les résultats obtenus (Fig. 14) suggèrent qu'un choc thermique ne diminue pas la toxicité de la R1(Δ 2-357). La surexpression de HSP70 à l'aide d'adénovirus (Fig. 15) ne diminue pas non plus la mortalité induite par la R1(Δ 2-357) suggérant le fait que la protéine chaperonne HSP70 seule n'est d'aucun secours pour réduire l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) en favorisant un meilleur repliement de la protéine agrégée. Étant donné que nous n'avons pas vérifié le niveau d'expression de protéines chaperonnes lors du choc thermique ou de l'utilisation d'adénovirus, il est possible que l'expression de HSP70 ou de SHSPs n'était pas assez importante pour protéger contre l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357).

Il a cependant été rapporté dans la littérature qu'une co-surexpression de HSP70 et HSP40 est nécessaire pour protéger d'un choc thermique (Michels *et al.*, 1997; Michels *et al.*, 1999). Il est donc possible que l'effet bénéfique de la surexpression de HSP70 grâce à l'utilisation d'adénovirus ne soit pas perceptible sans

une coexpression de protéines HSP40. Il faudrait également vérifier la possibilité que d'autres protéines chaperonnes, comme les SHSPs, puissent améliorer le repliement de la R1(Δ 2-357) et ainsi diminuer la toxicité de cette protéine.

4.1.9 Effet de la carence en sérum, de la cycloheximide et de la protéine adénovirale E3-14.7kDa sur l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357).

Nous avons constaté que les cellules A549tTA sensibilisées grâce à un traitement à la cycloheximide ou à une carence en sérum devenaient ainsi plus susceptibles à l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) (Fig. 4 et 5). Il est donc possible d'augmenter l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) quand 100% des cellules A549tTA sont infectées. Nous avons également observé que la protéine antiapoptotique adénovirale E3-14.7kDa peut protéger de l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) (Fig. 16). La protéine adénovirale E3-14.7kDa est aussi reconnue comme étant capable de protéger de l'apoptose induite par le TNF- α et Fas-L (Wold, Review 1993). Jusqu'à maintenant, nous savons que la protéine E3-14.7kDa interagit avec la procaspase 8 et les protéines FIP-1 et FIP-2 (Chen *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998) ce qui suggère que son potentiel antiapoptotique se manifeste en agissant au niveau de ces protéines pour empêcher l'activation subséquente des caspases effectrices menant à l'apoptose. E3-14.7kDa peut ainsi protéger de l'apoptose induite par une surexpression de Fas-L, de FADD ou de caspases 8 (Chen *et al.*, 1998). Bien qu'il soit possible que la protéine E3-14.7kDa puisse agir à différents niveaux pour empêcher l'apoptose, on peut supposer que peut-être l'effet proapoptotique de la R1(Δ 2-357) se manifeste en activant la cascade des caspases au niveau ou en amont de la caspase 8 étant donné que la E3-14.7kDa pourrait bloquer l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) en interagissant avec la procaspase 8.

4.2 Mécanisme d'induction de l'apoptose par les R1Δs

4.2.1 Activation des caspases par les R1Δs

En étudiant l'activation des caspases 1, 3, 6/9 et 8 lors de l'induction de l'apoptose par les R1Δs, nous avons remarqué que l'apoptose induite par chacune des R1Δs ne débute pas par la même cascade d'activation des caspases. L'apoptose induite par la R1(Δ2-357) et la R1(Δ2-398) débute par l'activation de la caspase 8, suivi des caspases 3 et 6/9 (Fig. 19). Pour ce qui est de la mortalité induite par la R1(Δ2-496), les caspases 3, 6/9 sont activées 24 h p.i. et la caspase 8 n'est pas du tout impliquée. Cependant, nous pouvons affirmer que l'activation des caspases survient beaucoup plus tôt dans le cas de la R1(Δ2-357), ce qui explique les manifestations plus précoces de l'apoptose par rapport aux deux autres protéines agrégées R1(Δ2-398) et R1(Δ2-496). Pour vérifier si l'apoptose induite par les R1Δs passe par l'activation de la caspase 3, il faudrait procéder à des infections dans des cellules caspase 3 négatives. Il est également possible de démontrer la nécessité de la caspase 8 dans l'apoptose induite par la R1(Δ2-357) en faisant des infections dans des cellules caspase 8 négatives.

4.2.2 Recrutement de la procaspase 8 au niveau des inclusions de R1(Δ2-357)

En vue de déterminer comment la R1(Δ2-357) induit le clivage de la procaspase 8 (Fig. 17), nous avons vérifié s'il y avait des interactions entre les agrégats de R1(Δ2-357) et la procaspase 8 et FADD, deux protéines impliquées dans l'activation de la cascade du récepteur Fas. En effet, dans une étude sur la maladie d'Huntington (Sánchez *et al.*, 1999), il a été démontré que l'expression d'une protéine agrégée possédant une expansion de répétitions polyglutamines (Q79), produisait le recrutement et l'activation de la caspase 8 dans les neurones.

En se basant sur cette étude, nous avons postulé que si la caspase 8 est activée par les inclusions de R1(Δ 2-357) via des interactions protéines-protéines, il devrait y avoir également un recrutement direct ou indirect de la caspase 8 par les inclusions de R1(Δ 2-357), c'est-à-dire une modification de la distribution cellulaire de la caspase 8 de la fraction soluble à la fraction insoluble contenant les agrégats de R1(Δ 2-357). Nos expériences ont révélé une activation de la caspase 8 et une relocalisation de celle-ci dans la fraction insoluble contenant la R1(Δ 2-357) (Fig. 20), suggérant ainsi que le recrutement de la caspase 8 par les inclusions serait responsable de son activation. On peut aussi vérifier cette hypothèse en regardant s'il y a colocalisation intracellulaire de la caspase 8 avec les inclusions de R1(Δ 2-357). Il faudrait donc surexprimer la caspase 8 avec un vecteur exprimant une caspase 8 inactive pour ne pas induire l'apoptose dans les cellules et ensuite la repérer par immunofluorescence. Le recrutement de la protéine FADD dans le culot de R1(Δ 2-357) (Fig. 20), démontre aussi la possible interaction entre cette protéine et les agrégats de R1(Δ 2-357).

4.2.3 Modèle de saturation du protéasome par la R1(Δ 2-357)

L'expérience réalisée avec des inhibiteurs de protéasomes suggérant que l'accumulation d'agrégats de R1(Δ 2-357) est impliquée dans l'induction de l'apoptose, nous proposons que l'effet proapoptotique des R1 Δ s réside dans leur capacité à saturer le protéasome. Les agrégats ou les intermédiaires de repliement de R1 Δ s pourraient agir comme inhibiteurs compétitifs du protéasome 26S ce qui résulterait en la perte de l'activité protéosomale affectant ainsi la dégradation des autres protéines mal repliées ou des protéines régulatrices impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire ou de l'apoptose comme p53, p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, Bik, Bax et la cycline B (Pagano *et al.*, 1995; Yaglom *et al.*, 1995; Deshaies *et al.*, 1995; Scheffner *et al.*, 1993; Seufert *et al.*, 1995; Li et Dou, 2000; Marshansky *et al.*, 2001). On peut supposer qu'en présence de R1 Δ s agrégées, il y aurait ainsi accumulation de protéines régulatrices importantes comme p53 qui est connue pour induire l'apoptose lorsqu'elle est surexprimée (Lopes *et al.*, 1996). Il est aussi possible que le protéasome ne soit plus capable de cliver un produit particulier pour former le produit

actif, ce qui bouleverserait la transcription de certains gènes et initierait la cascade apoptotique. Un tel clivage n'a pas encore été démontré mais nous savons que la protéine inactive p105 est clivée par le protéasome pour former la protéine p50 NF- κ B active (Palombella *et al.*, 1994). La perturbation des fonctions du protéasome par la présence de R1(Δ 2-357) pourrait empêcher la cellule de normalement dégrader d'autres protéines mal repliées toxiques pour la cellule.

Il a été démontré que l'inhibition du protéasome grâce à des inhibiteurs comme la lactacystine a pour effet de stimuler l'apoptose dans certaines lignées (Drexler, 1997; Lopes *et al.*, 1997) ou de l'inhiber dans d'autres lignées (Grimm *et al.*, 1996; Sadoul *et al.*, 1996). Pour ce qui est des cellules A549tTa que nous avons utilisé, l'ajout d'IP n'était pas suffisant pour induire l'apoptose. Par contre, elles étaient ainsi sensibilisées à l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357). Des études suggèrent que ce serait l'accumulation des protéines proapoptotiques Bax et Bik en présence d'IP qui induirait l'apoptose (Li et Dou, 2000; Marshansky *et al.*, 2001). D'autres études ont aussi proposé que ce serait la combinaison du blocage du cycle cellulaire médié par l'inhibition du protéasome, et la dérégulation simultanée de l'expression de c-Myc qui mèneraient les cellules à l'apoptose (Drexler, 1997). L'inhibition du protéasome produirait en effet une augmentation du niveau de p27^{kip1} qui en combinaison avec l'expression de c-Myc produirait un conflit au niveau de la signalisation (Evan *et al.*, 1992; Harrington *et al.*, 1994). L'accumulation de R1(Δ 2-357) dans la cellule pourrait avoir les mêmes conséquences au niveau de la signalisation si elle a pour effet d'inhiber la capacité du protéasome à dégrader ces mêmes substrats. La perturbation des facteurs de régulation normalement contrôlés par le protéasome mènerait ainsi les cellules à l'apoptose.

4.3 Mécanisme de protection de la R1

4.3.1 La R1 empêche l'activation et la relocalisation de la caspase 8 au niveau des inclusions de R1(Δ 2-357)

Nous avons également étudié l'effet du potentiel antiapoptotique de la R1 sur l'activation des caspases par les R1 Δ s. Nous pouvons conclure que la coexpression de la R1 dans les extraits de R1 Δ s empêche l'activation des caspases 8, 6 et 9 (Fig. 18A, B et C). La R1 empêche aussi l'activation de la caspase 3 dans les extraits de R1(Δ 2-357) et de R1(Δ 2-398). Cependant, l'activation de la caspase 3 est détectable 30 h p.i. dans les extraits de R1+R1(Δ 2-496) et augmente jusqu'à 48 h p.i. La R1 a donc un potentiel antiapoptotique en empêchant de manière directe ou indirecte l'activation des caspases par les R1 Δ s.

Nous avons également démontré que le recrutement des protéines FADD et procaspase 8 par les agrégats de R1(Δ 2-357) diminue en présence de R1. Il y a donc possibilité que le potentiel antiapoptotique de la R1 se manifeste en empêchant l'interaction entre les agrégats de R1(Δ 2-357) et les protéines FADD et procaspase 8. La R1 empêcherait le recrutement de protéines proapoptotiques par la R1(Δ 2-357) ce qui préviendrait ou retarderait l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357) en empêchant l'activation des caspases. Une autre possibilité serait qu'il y ait une compétition entre la R1 et la R1(Δ 2-357) pour des sites de liaison avec la caspase 8 ou une protéine adaptatrice.

4.3.2 Modèle du domaine α -cristallin

La découverte récente par notre laboratoire que la R1 de HSV-2 possède une région homologue au domaine α -cristallin des SHSPs entre les a.a. 300 et 400 (Fig. 21) ouvre de nouvelles possibilités pour expliquer le potentiel antiapoptotique de la R1. Le domaine α -cristallin est en fait une séquence d'environ 100 résidues qui est très conservée parmi les différentes espèces de SHSPs. Ce domaine est notamment

composé de brins β disposés en deux feuillets qui contribuent à l'interface de dimérisation (Clark et Muchowski, Review 2000). Étant donné que la R1 possède une région homologe au domaine α -cristallin entre les a.a 300 et 400, il est fort probable que cette séquence permette à la R1 de former des oligomères. La R1 pourrait ainsi s'assembler en dimères, trimères, et tétramères parce que cette propriété dépend de la structure secondaire des éléments conservés dans le domaine α -cristallin.

Il est connu que des mutations interférant dans l'oligomérisation des SHSPs empêchent leur activité chaperonne (Andley *et al.*, 1998). Des études de mutagenèse dirigée ont révélé qu'un résidu arginine extrêmement conservé dans le domaine α -cristallin est très important pour le maintien de la structure moléculaire et de l'activité chaperonne (MacRae, 2000). Des mutations sur ce résidu arginine sont responsables de maladies héréditaires. Par exemple, la mutation de cet arginine à la position R120G dans la protéine α B-cristallin a été associée à une myopathie liée à la desmine (DRM) (Quilan et Van Den Ijssel, 1999; Vicart *et al.*, 1998); et la mutation R116G chez la protéine α A-cristallin, le résidu correspondant au R120G de la protéine α B-cristallin, elle a été associée à la formation congénitale de cataractes (Litt *et al.*, 1998). Il a été démontré que le résidu R116G de α A-cristallin est positionné dans les brins β à l'interface des sous-unités formant l'oligomère (Berengian *et al.*, 1997). Le résidu arginine aurait donc comme rôle de stabiliser l'arrangement des feuillets β , et la substitution de cet arginine perturberait l'alignement des brins β et déstabiliserait les oligomères (Berengian *et al.*, 1997). Étant donné que cet arginine est également conservé chez la R1 de HSV (Figure 21), il est possible que cet acide aminé soit aussi important pour l'oligomérisation de la R1.

Les SHSPs sont connues comme ayant plusieurs sites de liaisons pour leur substrat (Lee *et al.*, 1997). Cette propriété les rend ainsi très efficaces pour prévenir l'agrégation des protéines et stabiliser les protéines non-natives (Lee *et al.*, 1997; MacRae, Review 2000). Cette découverte est cohérente avec le fait que la R1 peut protéger de l'apoptose induite par une quantité de R1(Δ 2-357) environ 10 fois plus importante que la quantité de R1. Une molécule de R1 pourrait ainsi lier plusieurs molécules de R1(Δ 2-357) via son domaine α -cristallin. Une telle interaction de la R1

avec la R1(Δ 2-357) expliquerait la colocalisation de ces protéines à l'immunofluorescence.

La perte du potentiel antiapoptotique de la R1 lorsqu'elle est délétée du 2^e jusqu'au 357^e a.a. correspond à la perte des 7 premiers brins β du domaine α -cristallin et du résidu arginine très important pour stabiliser les feuilletts β . Une délétion du 2^e au 398^e a.a. enlève complètement le domaine α -cristallin. La protéine R1(Δ 2-496) perd donc aussi complètement ce domaine α -cristallin. Afin de déterminer si l'extension NH₂ de la R1 contenant ce domaine α -cristallin est suffisante en elle-même pour protéger les cellules de l'apoptose, des recombinants adénovirus exprimant des domaines NH₂ de différentes longueurs (du 1^{er} a.a. jusqu'aux positions 357, 398 et 496) ont été construits (Gervais, 2000). L'utilisation de ces virus a permis d'affirmer que le domaine NH₂ seul n'est pas suffisant pour exercer la fonction antiapoptotique. Bien que la séquence α -cristallin est englobée dans la construction NH₂(1-496), il est nécessaire d'avoir le domaine réductase C-terminal de la protéine R1 pour qu'elle puisse manifester son potentiel antiapoptotique. Nous savons que l'extension flexible C-terminale des SHSPs est nécessaire pour l'activité chaperonne (Andley *et al.*, 1998). Si cette extension C-terminale d'environ 10 a.a. est tronquée, les multimères formés sont plus larges que la normale et l'activité chaperonne est diminuée (Andley *et al.*, 1998). Il a été suggéré que cette extension C-terminale contribuerait à augmenter la solubilité et à stabiliser la protéine SHSP (Lindner *et al.*, 1998). La partie C-terminale de la R1 est probablement importante pour permettre l'oligomérisation de la protéine et l'activité chaperonne. Il reste également à faire des études de structure-activité en vue de déterminer quelles régions de la partie C-terminale est importante pour l'activité antiapoptotique.

4.4 Perspectives et conclusions

Nos expériences sur la fonction proapoptotique de la R1(Δ 2-357) ont montré que cette protéine est très peu soluble comparativement à la R1 pleine longueur suggérant ainsi que la synthèse de molécules R1(Δ 2-357) incorrectement repliées

pourrait induire l'apoptose. Les résultats obtenus avec l'utilisation d'inhibiteurs de protéasome suggèrent que la saturation du protéasome par l'accumulation d'agrégats de R1(Δ 2-357) soit responsable de l'apoptose. Nous tenterons éventuellement à valider cette hypothèse en vérifiant que de la R1(Δ 2-357) soluble purifiée n'induit pas l'apoptose lorsque microinjectée dans des cellules. Comme 2^{ème} stratégie, la fusion de la R1(Δ 2-357) avec des protéines comme la glutathione-S-transférase (GST) ou la GFP pour améliorer son repliement devrait conduire à la synthèse d'une protéine moins proapoptotique. Si ces expériences montrent que c'est au contraire la forme soluble de la R1(Δ 2-357) qui cause l'apoptose, des études de structure-activité seront effectuées pour identifier les parties proapoptotiques de la R1(Δ 2-357). Nous ferons de même pour identifier les parties de la R1 nécessaires à son activité antiapoptotique. Lorsque les régions fonctionnellement importantes de la protéine auront été identifiées, des mutations les inactivant pourront être introduites dans le génome de HSV pour étudier le rôle de la fonction antiapoptotique de la R1 dans la pathogénicité de ce virus.

En vue de vérifier l'hypothèse de la saturation du protéasome par l'expression de R1(Δ 2-357), nous allons déterminer si la R1(Δ 2-357) diminue l'activité protéosomale et provoque l'accumulation de certaines protéines régulatrices importantes pour le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose comme p53, p27, Bax et Bik. Nous allons également vérifier s'il y a recrutement de protéines chaperonnes comme les SHSPs dans les inclusions de R1(Δ 2-357) et si la coexpression de SHSPs diminue la formation des agrégats et l'apoptose induite par la R1(Δ 2-357).

Nous allons également tester les produits de protéolyse de la R1 (HSV-1 et HSV-2). En effet, des produits de clivage de la R1 de HSV-2 qui s'accumulent dans le noyau ont déjà été rapportés dans la littérature (ex.: position 305) (Lankinen *et al.*, 1989). Bien que cela semble contradictoire, les virus herpes simplex pourraient avoir avantage à posséder la capacité d'induire l'apoptose à un moment opportun afin de faciliter la lyse et la dissémination des nouveaux virions dans des cellules non-répliquatives résistantes à la lyse cellulaire comme les neurones. Certaines études font mention que les virus herpes possèdent à la fois la capacité d'induire et d'empêcher

l'apoptose (Shen et Shen, Review 1995; Leopardi et Roizman, 1996; Koyama et Miwa, 1997; Galvan et Roizman, 1998). Le virus pourrait ainsi prendre avantage du potentiel antiapoptotique de la R1, au tout début de l'infection, pour permettre la réplication et la production virale en bloquant l'apoptose grâce à son domaine α -cristallin qui lui confère une activité chaperonne. Dans un deuxième temps, le virus herpes pourrait provoquer la lyse cellulaire étant donné que le domaine NH₂ de la R1 possède une région sensible à la protéolyse (Lankinen *et al.*, 1989). En effet, le produit résultant de ce clivage par les enzymes cellulaires engendrerait une protéine toxique favorisant la lyse cellulaire et le relargage des nouveaux virions à un moment plus tardif de l'infection.

Nous allons aussi déterminer si la protéine R1 a véritablement une activité chaperonne et étudier l'effet antiapoptotique de la R1 sur des protéines proapoptotiques impliquées dans les maladies de neurodégénérescence comme la huntingtine mutée qui est responsable de la maladie d'Huntington. Il a été démontré que la surexpression de SHSPs à l'aide de vecteurs viraux, inhibe la formation d'inclusions cytoplasmiques dans les astrocytes et les cellules gliales, et bloque l'apoptose dans les cellules neuronales (Wagstaff *et al.*, 1999; Koyama et Goldman, 1999). Suite à ces résultats, les SHSPs ont donc été proposées comme d'éventuels traitements pour protéger les cellules de l'apoptose, comme dans le cas des maladies de neurodégénérescence (Clark et Muchowski, Review 2000). La découverte récente que la R1 des HSV possède un domaine α -cristallin et empêche l'apoptose induite par des protéines agrégées (R1As) ouvre donc de nouvelles possibilités pour trouver des méthodes pour bloquer la propagation virale et traiter les maladies associées aux protéines agrégées comme la maladie d'Huntington.

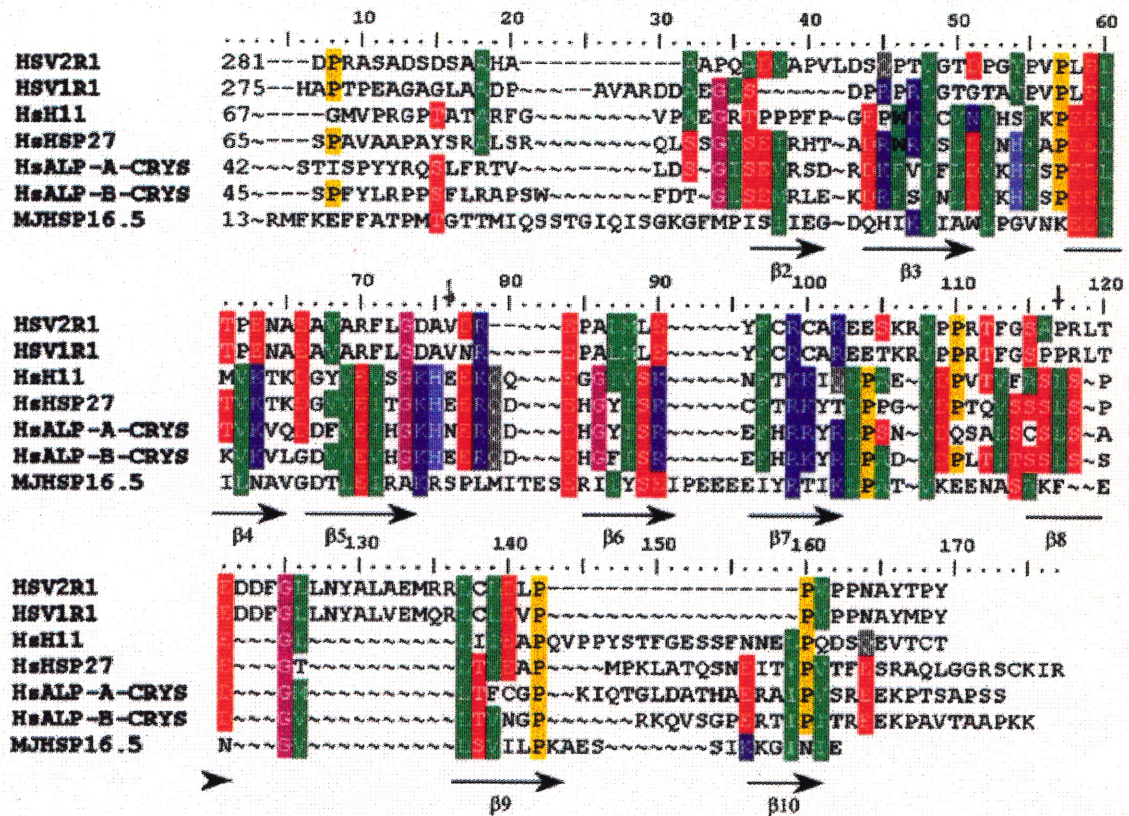


Figure 21 Alignement des protéines R1 de HSV-1 et -2 et des domaines α -cristallin des SHSPs HsHSP27, HsH11, HsALP-A-CRYS, HsALP-B-CRYS et MJHSP16.5.

5. Bibliographie

- Ahmad, M., Srinivasula, S.M., Wang, L., Talanian, R.V., Litwack, G., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E.S. 1997. CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Res.* **57**: 615-619.
- Andley, U.P., Song, Z. Wawrousek, E.F. et Bassnett, S. 1998. The molecular chaperone α A-crystallin enhances lens epithelial cell growth and resistance to UVA stress. *J. Biol. Chem.* **273**: 31252-31261.
- Arrigo, A.-P., Suhan, J.P. et Welch, W.J. 1988. Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 5059-5071.
- Arrigo, A.-P. et Landry, J. 1994. *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. Éditions Morimoto, R.I. pp: 335-373. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.
- Aubert, M. et Blaho, J.A. 1999. The herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP27 is required for the prevention of apoptosis in infected human cells. *J. Virol.* **73**: 2803-2813.
- Baer, R., Bankier, A.T., Biggin, M.D., Deininger, P.L., Farrell, P.J., Gibson, T.J., Hatfull, G., Hudson, G.S., Satchwell, S.C., Sequin, C., Tuffnell, P.S. et Borel, B.G. 1984. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein Barr virus genome. *Nature (London)*. **310**: 207-211.
- Baker, S.J. et Reddy, E.P. 1998. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* **17**: 3261-3270.
- Barry, M. et McFadden, G. 1998. Apoptosis regulators from DNA viruses. *Curr. Opin. Immunol.* **10**: 422-430.

- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. et Seemuller, E. 1998. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*. **92**: 367-380.
- Becher, M.W., Rubinsztein, D.C., Leggo, J., Wagster, M.V., Stine, O.C., Ranen, N.G., Franz, M.L., Abbott, M.H., Sherr, M., MacMillan, J.C., Barron, L., Porteous, M., Harper, P.S. et Ross, C.A. 1997. Dentatorubral and pallidolusian atrophy (DRPLA). Clinical and neuropathological findings in genetically confirmed North American and European pedigrees. *Mov. Disord*. **12**: 519-530.
- Beere, H.M et Green, D.R. 2001. Stress management – heat shock protein-70 and the regulation apoptosis. *Trends Cell. Biol*. **11**: 6-10.
- Bercovich, Z., Rosenberg-Hasson, Y., Ciechanover, A. et Kahana, C. 1989. Degradation of ornithine decarboxylase in reticulocyte lysate is ATP-dependent but ubiquitin-independent. *J. Biol. Chem*. **264**: 15 949-52.
- Bercovich, B., Stancovski, I., Mayer, A., Blumenfeld, N., Laszlo, A., Schwartz, A.L. et Ciechanover, A. 1997. Ubiquitin-dependent degradation of certain protein substrates in vitro requires the molecular chaperone Hsc70. *J. Biol. Chem*. **272**: 9002-9010.
- Berengian, A.R., Bova, M.P. et Mchaourab, H.S. 1997. Structure and function of the conserved domain in α A-crystallin: site-directed spin labeling identifies a B-strand located near a subunit interface. *Biochemistry*. **36**: 9951-9957.
- Berengian, A.R., Parfenova, M. et McHaourab, H.S. 1999. Site-directed spin labeling study of subunit interactions in the α -crystallin domain of small heat-shock proteins. Comparison of the oligomer symmetry in α A-crystallin HSP27 and HSP16.3. *J. Biol. Chem*. **274**: 6305-6314.

- Bergeron, S. 1998. La sous-unité R1 de la ribonucléotides réductase codée par la virus de l'herpes simplex de type 2 possède une fonction antiapoptotique. *Mémoire de maîtrise*, Université de Montréal, Montréal.
- Boehmer, P.E. et Lehman, I.R. 1997. Herpes simplex virus DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 347-384.
- Boelens, W.C., Croes, Y., de Ruwe, M., de Reu, L. et de Jong, W.W. 1998. Negative charges in the C-terminal domain stabilize the alphaB-crystallin complex. *J. Biol. Chem.* **273**: 28085-28090.
- Buchner, J. 1996. Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *FASEB J.* **10**: 10-19.
- Canu, N., Barbato, C. Ciotti, M.T., Serafino, A., Dus, L. et Calissano, P. 2000. Proteasome involvement and accumulation of ubiquitinated proteins in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *J. Neurosc.* **20**: 589-599.
- Carlson, J., Fuchs, J.A. et Messing, J. 1984. Primary structure of the Escherichia coli ribonucleotide diphosphate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**: 4294-4297.
- Carroll, R.W. et Lomas, D.A. 1997. Conformational disease. *Lancet.* **350**: 134-138.
- Chang, H.Y. et Yang, X. 2000. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 821-846.
- Chen, P., Tian, J., Kovesdi, I. et Bruder, J.T. 1998. Interaction of the adenovirus 14.7kDa protein with FLICE inhibits Fas ligand-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **273**: 5815-5820.

- Ciechanover, A. 1994. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*. **79**: 13-21.
- Clark, J. I., et Muchowski, P. J. 2000. Small heat-shock proteins and their potential role in human disease. *Struct. Biol.* **10**: 52-59.
- Clements, J.B., Watson, R.J. et Wilkie, N.M. 1977. Temporal regulation of herpes simplex virus type 1 transcription: location of transcripts on the viral genome. *Cell*. **12**: 275-285.
- Collier, N.C., Heuser, J., Levy, M.A. et Schlesinger, M.J. 1988. Ultrastructural and biochemical analysis of the stress granule in chicken embryo fibroblasts. *J. Cell. Biol.* **106**: 1131-1139.
- Conner, J., Cooper, J., Furlong, J. et Clements, J.B. 1992. An autophosphorylating but not transphosphorylating activity is associated with the unique N-terminus of the herpes simplex virus type 1 ribonucleotide reductase large subunit. *J. Virol.* **66**: 7511-7516.
- Conner, J., MacFarlane, J., Lankinen, H. et Marsden, H. 1992. The unique N-terminus of the herpes simplex virus type 1 large subunit is not required for ribonucleotide reductase activity. *J. Gen. Virol.* **73**: 103-112.
- Conner, J., Furlong, J., Murray, J., Meighan, M., Cross, A., Marsden, H. et Clements, J.B. 1993. Herpes simplex virus type 1 ribonucleotide reductase large subunit : regions of the protein essential for subunit interaction and dimerisation. *Biochemistry*. **32**: 13673-13680.

- Conner, J., Murray, J., Croos, A., Clements, J.B. et Marsden, J. 1995. Intracellular localization of herpes simplex virus type 1 ribonucleotide reductase during infection of cultured cells. *Virology*. **213**: 615-623.
- Conner, J. 1999. The unique N-terminus of herpes simplex virus type 1 ribonucleotide reductase large subunit is phosphorylated by casein kinase 2, which may have a homologue in *Escherichia coli*. *J. Gen. Virol.* **80**: 1471-1476.
- Conradt, B. et Horvitz, H.R. 1998. The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2 like protein CED-9. *Cell*. **93**: 519-529.
- Cook, M.L. et Stevens, J.G. 1973. Pathogenesis of herpetic neuritis and ganglionitis in mice: evidence of intra-axonal transport of infection. *Infect. Immun.* **7**: 272-288.
- Coux, O., Tanaka, K. et Goldberg, A.L. 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Ann. Rev. Biochem.* **65**: 801-847.
- Cummings, C.J., Mancini, M.A., Antalffy, B., DeFranco, D.B., Orr, H.T. et Zoghbi, H.Y. 1998. Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nat. Genet.* **19**: 148-154.
- Cummings, C.J., Reinstein, E., Sun, Y., Antalffy, B., Jiang, Y.-H., Ciechanover, A., Orr, H.T., Beaudet, A.L., et Zoghbi, H.Y. 1999. Mutation of the E6-AP ubiquitin ligase reduces nuclear inclusion frequency while accelerating polyglutamine-induced pathology in SCA1 mice. *Neuron*. **24**: 879-892.

- Das, K.P. et Surewicz, W.K. 1995. Temperature-induced exposure of hydrophobic surfaces and its effect on the chaperone activity of α -crystallin. *FEBS Lett.* **369**: 321-325.
- Denhardt, D.T. 1996. Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell : the potential for multiplex signalling. *Biochem J.* **318**: 729-747.
- Deshaies, R.J., Chau, V. et Kirschner, M. 1995. Ubiquitination of the G1 cyclin Cln2p by a Cdc34p-dependent pathway. *EMBO J.* **14**: 303-312.
- Dick, T., Ruppert, T., Groettrup, M., Kloetzel, P.-M., Kuehn, L., Koszinowski, Stevanovic, S., Schild, H. et Rammensee, H.-G. 1996. Coordinated dual cleavage induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell.* **86**: 253-262.
- Dobson, C.M. et Ellis, R.J. 1998. Protein folding and misfolding inside and outside the cell. *EMBO J.* **17**: 5251-5254.
- Drexler, H. C. A. 1997. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Cell Biol.* **94**: 855-860.
- Ehrnsperger, M., Lilie, H., Gaestel, M. et Buchner, J. 1999. The dynamics of hsp25 quaternary structure. *J. Biol. Chem.* **274**: 14867-14874.
- Elledge, S.J., Zhou, Z. et Allen, J.B. 1992. Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation. *Trends Biochem. Sci.* **17**: 119-123.
- Ellis, R.J. et Hartl, F.U. 1999. Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**: 102-110.

- Elsing, A. et Burgert, H.G. 1998. The adenovirus E3/10.4k-14.5k proteins down-modulate the apoptosis receptor Fas/Apo-1 by inducing its internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. **95**: 10072-10077.
- Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C.M., Penn, L.Z. et Hancock, D.C. 1992. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*. **69**: 119-128.
- Farrow, S.N., White, J.H.M., Martinou, I., Raven, T., Pun, K.-T., Grinham, C.J., Martinou, J.-C et Brown, R. 1995. Cloning of a bcl-2 homolog by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature*. **374**: 731-733.
- Fenteany, G., Standaert, R.F., Lane, W.S., Choi, S., Corey, E.J. et Schreiber, S.L. 1995. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science*. **268**: 726-731.
- Fontecave, M. 1998. Ribonucleotide reductases and radical reactions. *Cell. Mol. Life Sci*. **54**: 684-695.
- Fontecave, M., Nordlund, P., Eklund, H. et Reichard, P. 1992. The redox centers of ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. *AERAMB*. **65**: 147-183.
- Galvan, V. et Roizman, B. 1998. Herpes simplex virus 1 induces and blocks apoptosis at multiple steps during infection and protects cells from exogenous inducers in a cell-type-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**: 3931-3936.
- García-Blanco, M.A. et Cullen, B.R. 1991. Molecular basis of latency in pathogenic human viruses. *Science*. **254**: 815-820.

- García-Mata, R., Bebök, Z., Sorscher, E.J. et Sztul, E.S. 1999. Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J. Cell. Biochem.* **146**: 1239-1254.
- Gervais, A. 2000. Études des propriétés antiapoptotiques de la sous-unité R1 de la ribonucléotide réductase des virus de l'herpes simplex 1 et 2. *Mémoire de maîtrise*, Université de Montréal, Montréal.
- Gibson, T., Stockwell, P., Ginsburg, M. et Barell, B. 1984. Homology between two EBV early genes and HSV ribonucleotide reductase and 38K genes. *Nucleic Acid res.* **12**: 5087-5099.
- Gossen, M., Bonin, A.L., Freundlieb, S. et Bujard, H. 1994. Inducible gene expression systems for higher eukaryotic cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**: 516-520.
- Glasgow, J.N., Qiu, J., Rassin, D., Grafe, M., Wood, T. et Perez-Pol., J.R. 2001. Transcriptional regulation of the BCL-X gene by NF-kappaB is an element of hypoxic responses in the rat brain. *Neurochem. Res.* **26**: 647-659.
- Glotzer, M., Murray, A.W. et Kirschner, M.W. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature.* **349**: 132-138.
- Gray, C.W., Slaughter, C.A. et DeMartino, G.N. 1994. PA28 activator protein forms regulatory caps on proteasome stacked rings. *J. Mol. Biol.* **236**: 7-15.
- Grimm, L.M., Goldberg, A.L., Poirier, G.G., Schwartz, L.M. et Osborne, B. 1996. Proteasome play an essential role in thymocyte apoptosis. *EMBO J.* **15**: 3835-3844.

- Haley, D.A., Horwitz, J. et Stewart, P.L. 1998. The small heat-shock protein, α B-crystallin, has a variable quaternary structure. *J. Mol. Biol.* **277**: 27-35.
- Harrington, E.A., Bennet, M.R., Fanidi, A. et Evan, G.I. 1994. C-Myc-induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines. *Embo J.* **13**: 3286-3295.
- Hengartner, M.O., Ellis, R.E. et Horwitz, R.H. 1992. Caenorhabditis elegans gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature.* **356**: 494-499.
- Hochstrasser, M. 1996. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* **30**: 405-439.
- Holmgren, A. 1985. Thioredoxin. *Ann. Rev. Biochem.* **54**: 237-271.
- Holmgren, A. 1989. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* **264**: 13963-13966.
- Huang, D.C.S., Cory, S. et Strasser, A. 1997. Bcl-2, Bcl-X_L and adenovirus protein E1B19kDa are functionally equivalent in their ability to inhibit cell death. *Oncogene.* **14**: 405-414.
- Jacobson, M.D., Weil, M. et Raff, M.C. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell.* **88**: 347-354.
- Jacobson, J.G., Leib, D.A., Goldstein, D.J., Bogard, C.L., Schaffer, P.A., Weller, S.K. et Coen, D.M. 1989. A herpes simplex virus ribonucleotide reductase deletion mutant is defective for productive and reactivatable latent infections of mice and for replication in mouse cells. *Virology.* **173**: 276-283.
- Johnston, J.A., Ward, C.L. et Kopito, R.R. 1998. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J. Cell. Biochem.* **143**: 1883-1898.

- Jordan, A. et Reichard, P. 1998. Ribonucleotide reductases. *Ann. Rev. Biochem.* **67**: 71-98.
- Kaytor, M.D. et Warren, S.T. 1999. Aberrant protein deposition and neurological disease. *J. Biol. Chem.* **274**: 37507-37510.
- Kieff, E.D., Bachenheimer, S.L. et Roizman, B. 1971. Size, composition and structure of the deoxyribonucleic acid of herpes simplex virus subtypes 1 and 2. *J. Virol.* **8**: 125-129.
- Kim, K.K., Kim, R. et Kim, S.-H. 1998. Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature.* **394**: 595-599.
- Klement, I.A., Zoghbi, H.Y. et Orr, H.T. 1999. Pathogenesis of polyglutamine-induced disease: a model for SCA1. *Mol. Genet. Metab.* **66**: 172-178.
- Klement, I.A., Skinner, P.J., Kaytor, M.D., Yi, H., Hersch, S.M., Clark, H.B., Zoghbi, H.Y. et Orr, H.T. 1998. Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyQ-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Cell.* **95**: 41-53.
- Koyasu, S., Nishida, E., Kadowaki, T., Matsuzaki, F., Iida, K., Harada, F., Kasuga, M., Sakai, H. et Yahara, I. 1986. Two mammalian heat shock proteins, HSP90 and HSP100, are actin-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 8054-8058.
- Koyama, Y. et Goldman, J.E. 1999. Formation of GFAP cytoplasmic inclusions in astrocytes and their disaggregation by α B-crystallin. *Am. J. Pathol.* **154**: 1563-1572.

- Koyama, A.H. et Miwa, Y. 1997. Suppression of apoptotic DNA fragmentation in herpes simplex virus type 1-infected cells. *J. Virol.* **3**: 2567-2571.
- Kroemer, G., Zamzami, N. et Susin, S.A. 1997. Mitochondrial control of apoptosis. *Imm. today.* **18**: 44-51.
- Kyriakis, J.M. et Avruch, J. 1996. Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *BioEssays.* **18**: 567-577.
- Landry, J., Chrétien, P., Lambert, H., Hickey, E., et Weber, L.A. 1989. Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. *J. Cell. Biol.* **109**: 7-15.
- Langelier, Y., Champoux, L., Hamel, M., Lamarche, N., Gaudreau, P. et Massie, B. 1998. 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. *J. Biol. Chem.* **273**: 1435-1443.
- Langelier, Y., Bergeron, S., Lippens, J., Gervais, A., Guilbault, C., Denis, S., Mosser, D.D. et Massie, B. 2001. The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase protects cells against apoptosis induced by TNF- α and Fas-L. *En cours de rédaction*.
- Lankinen, H., Telford, E., MacDonald, D. et Marsden, H. 1989. The unique N-terminal domain of the large subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase is preferentially sensitive to proteolysis. *J. Gen. Virol.* **70**: 3159-3169.
- Lavoie, J.N., Lambert, H., Hickey, E., Wever, L.A. et Landry, J. 1995. Modulation of cellular thermoresistance and actine filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein hsp27. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 505-516.

- Lee, G.J., Roseman, A.M., Saibil, H.R. et Vierling, E. 1997. A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *EMBO J.* **16**: 659-671.
- Leopardi, R. et Roizman, B. 1996. The herpes simplex virus major regulatory protein ICP4 blocks apoptosis induced by the virus or hyperthermia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 9583-9587.
- Leopardi, R., Van Sant, C. et Roizman, B. 1997. The herpes simplex virus 1 protein kinase US3 is required for protection from apoptosis induced by the virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 7891-7896.
- Leroux, M.R., Ma B.J., Batelier, G., Melki, R. et Candido, E.P.M. 1997. Unique structural features of a novel class of small heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* **272**: 12847-12853.
- Leroux, M.R., Melki, R., Gordon, B., Batelier, G. et Candido, E.P.M. 1997. Structure-function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides. *J. Biol. Chem.* **272**: 24646-24656.
- Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M.J., Jonnalagada, S., Chernova, T., Dehejia, A., Lavedan, C., Gasser, T., Steinbach, P.J., Wilkinson, K.D. et Polymeropoulos, M.H. 1998. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature.* **395**: 451-452.
- Li, B. et Dou, Q.P. 2000. Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 3850-3855.

- Li, Y., Kang J. et Horwitz, M.S. 1997. Interaction of an adenovirus 14.7-kilodalton protein inhibitor of tumor necrosis factor alpha cytotoxicity with a new member of the GTPase superfamily of signal transducers. *J. Virol.* **71**: 1576-1582.
- Li, Y., Kang, J. et Horwitz, M.S. 1998. Interaction of an adenovirus E3 14.7-kilodalton protein with a novel tumor necrosis factor alpha-inducible cellular protein containing leucine zipper domains. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 1601-1610.
- Lindner, R.A., Kapur, A., Mariani, M., Titmuss, S.J. et Carver, J.A. 1998. Structural alterations of α -crystallin during its chaperone action. *Eur. J. Biochem.* **258**: 170-183.
- Lippens, J. 1998. La sous-unité R1 de la ribonucléotide réductase des virus Herpes simplex de type 2 est proapoptotique lorsque déléetée de son domaine N-terminal. *Mémoire de maîtrise*, Université de Montréal, Montréal.
- Litt, M., Kramer, P., LaMorticella, D.M., Murphey, W., Lovrien E.W., Weleber, R.G. 1998. Autosomal dominant congenital cataract associated with a missense mutation in the human α -crystallin gene CRYAA. *Hum. Mol. Genet.* **7**: 471-474.
- Liu, C. et Welsh, M.J. 1999. Identification of a site of Hsp27 binding with Hsp27 and α B-crystallin as indicated by the yeast two-hybrid system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**: 256-261.
- Liu, Z., Hsu, H. Goeddel, D.V., et Karin, M. 1996. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell.* **87**: 565-576.
- Lopes, U. G., Erhardt, P., Yao, R. et Cooper, G. M. 1997. p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. *J. Biol. Chem.* **272**: 12893-12896.

- Lutz, R.J. 2000. Role of the BH3 (Bcl-2 homology 3) domain in the regulation of apoptosis and Bcl-2-related proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **28**: 51-56.
- MacRae, T. H. 2000. Structure and function of small heat shock/ α -crystallin proteins: established concepts and emerging ideas. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**: 899-913.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Lehrach, H., Davies, S.W. et Bates, G.P. 1997. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Nature Genet.* **15**: 197-200.
- Marshansky, V., Wang, X., Bertrand, R., Luo, H., Duguid, W., Chinnadurai, G., Kannan, N., Vu, M.D. et Wu, J. 2001. Proteasomes modulate balance among proapoptotic and antiapoptotic Bcl-2 family members and compromise functioning of the electron transport chain in leukemic cells. *J. Immunol.* **166**: 3130-3142.
- Massie, B., Couture, F., Lamoureux, L., Mosser, D.D., Guilbault, C., Jolicoeur, P., Bélanger, F. et Langelier, Y. 1998. Inducible overexpression of a toxic protein by an adenovirus vector with a tetracycline-regulatable expression cassette. *J. Virol.* **72**: 2289-2296.
- Mastino, A., Sciortino, M.T., Medici, M.A., Perri, D., Ammendolia, M.G., Grelli, S., Amici, C., Pernice, A., Guglielmino, S. 1997. Herpes simplex virus 2 causes apoptotic infection in monocytoid cells. *Cell Death Diff.* **4**: 629-638.
- Mehlen, P., Preville, X., Chareyron, P., Briolay, J., Klemenz, R., et Arrigo, A.-P. 1995. Constitutive expression of human hsp27, *Drosophila* hsp27, or human alpha

B-crystallin confers resistance to TNF- α and oxidative stress-induced cytotoxicity in stably transfected murine L929 fibroblasts. *J. Immunol.* **154**: 363-374.

- Mehlen, P., Kretz-Remy, C., Preville, X., Arrigo, A.P. 1996. Human hsp27, Drosophila hsp27 and human alphaB-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNFalpha-induced cell death. *EMBO J.* **15**: 2695-2706.
- Merck, K.B, Groenen, P.J., Voorter, C.E., de Haard-Hoekman, W.A., Horwitz, J., Bloemendal, H. et de Jong W.W. 1993. Structural and functional similarities of bovine alpha-crystallin and mouse small heat-shock protein. A family of chaperones. *J. Biol. Chem.* **268**: 1046-1052.
- Meriin, A.B., Gabai, V.L., Yaglom, J., Shifrin, V.I. et Sherman, M.Y. 1998. Proteasome inhibitors activate stress kinases and induce hsp72. *J. Biol. Chem.* **273**: 6373-6379.
- Michels, A.A., Kanon, B., Konings, A.W., Ohtsuka, K., Bensaude, O., Kampinga, H.H. 1997. Hsp70 and hsp40 chaperone activities in the cytoplasm and the nucleus of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **272**: 33283-33289.
- Michels, A.A., Kanon, B., Bensaude, O. et Kampinga, H.H. 1999. Heat shock protein (Hsp) 40 mutants inhibit Hsp70 in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **274**: 36757-36763.
- Miron, T., Vancompernelle, K., Vandekerckhove, J., Wilchek, M. et Geiger, B. 1991. A 25-kD inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein. *J. Cell. Biol.* **114**: 255-261.
- Mori, N., Fujii, M., Cheng, G., Ikeda, S., Yamasaki, Y., Yamada, Y., Tomonaga, M. et Yamamoto, N. 2001. Human T-cell leukemia virus type I tax protein

induces the expression of anti-apoptotic gene Bcl-XL in human T-cells through nuclear factor-kappaB and c-AMP responsive element binding protein pathways. *Virus Genes*. **22**: 279-287.

- Morimoto, R.I., Tissières, A. et Georgopoulos, C. 1994. *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Moseley, P. 2000. Stress proteins and the immune response. *Immunopharmacology*. **48**: 299-302.
- Mosser, D.D., Caron, A.W., Bourget, L., Denis-Larose, C. et Massie, B. 1997. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 5317-5327.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Ni, J., Gentz, R. *et al.* 1996. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease is recruited to the CD95 (Fas/Apo-1) death-inducing signaling complex. *Cell*. **85**: 817-827.
- Nicholl, I.D. et Quinlan, R.A. 1994. Chaperone activity of alpha-crystallins modulates intermediate filament assembly. *EMBO J.* **13**: 945-953.
- Nikas, I., McLauchlan, J., Davison, A.J., Taylor, W.R. et Clements, J.B. 1986. Structural features of ribonucleotide reductase. *Proteins*. **1**: 376-384.
- Nover, L., Scharf, K.D. et Neumann, D. 1989. Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 1298-1308.

- Orr, H.T., Chung, M.Y., Banfi, S., Kwiatkowski, T.J., Servadio, A., Beaudet, A.L., McCall, A.E., Duvick, L.A., Ranum, L.P. et Zoghbi, H.Y. 1993. Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia 1. *Nature Genet.* **4**: 221-226.
- Pagano, M., Tam, S.W., Theodoras, A.M., Beer-Romero, P., Del Sal, G., Chau, V., Yew, P.R., Draetta, G.F. et Rolfe, M. 1995. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science.* **269**: 682-685.
- Palombella, V.J., Rando, O.J., Goldberg, A.L. et Maniatis, T. 1994. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell.* **78**: 773-785.
- Paradis, H., Gaudreau, P., Massie, B., Lamarche, N., Guilbault, C., Gravel, S. et Langelier, Y. 1991. Affinity purification of active subunit 1 of herpes implex virus type ribonucleotide reductase exhibiting a protein kinase activity. *J. Biol. Chem.* **266**: 9647-9651.
- Perng, G.C., Dunkel, E.C., Geary P.A., Slanina, S.M., Ghiasi, H., Kaiwar, R., Nesburn, A.B., Wechsler, S.L. 1994. The latency-associated transcript gene of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is required for efficient in vivo spontaneous reactivation of HSV-1 from latency. *J. Virol.* **68**: 8045-8055.
- Perng, G.C., Slanina, S.M., Yukht, A., Drolet, B.S., Keleher, W. Jr., Ghiasi, H., Nesburn, A.B., Wechsler, S.L. 1999. A herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript mutant with increased virulence and reduced spontaneous reactivation. *J. Virol.* **73**: 920-929.
- Persichetti, F., Ambrose, C.M., Ge, P., McNeil, S.M., Srinidhi, J., Anderson, M.A., Jenkins, B., Barnes, G.T., Duyao, M.P., Kanaleu, L, et al. 1995. Normal

and expanded Huntington's disease gene alleles produce distinguishable proteins due to translation across the CAG repeat. *Mol. Med.* **1**: 374-383.

- Quinlan, R., Van Den Ijssel, P. 1999. Fatal attraction: when chaperone turns harlot news. *Nat. Med.* **5**: 25-26.
- Radford, S.E., Dobson, C.M. 1999. From computer simulations to human disease: emerging themes in protein folding. *Cell.* **97**: 291-298.
- Raff, M.C. 1992. Social controls on cell survival and cell death. *Nature.* **356**: 397-400.
- Rao, L., Modha, D. et White, E. 1997. The E1B 19k protein associates with lamins in vivo and its proper localization is required for inhibition. *Oncogene.* **15**: 1587-1597.
- Raman, B., Ramakrishna, T. et Rao, C.M. 1995. Temperature dependent chaperone-like activity of alpha-crystallin. *FEBS Lett.* **365**: 133-136.
- Raman, B. et Rao, C.M. 1997. Chaperone-like activity and temperature-induced structural changes of α -crystallin. *J. Biol. Chem.* **272**: 23559-23564.
- Reddy, P.H., Williams, M., Tagle, D.A. 1999. Recent advances in understanding the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Neurosci.* **22**: 248-255.
- Renkawek, K., Stege, G.J., Bosman, G.J. 1999. Dementia, gliosis and expression of the small heat shock proteins hsp27 and α B-crystallin in Parkinson's disease. *Neuroreport.* **10**: 2273-2276.
- Roberts, B.J. 1997. Evidence of proteasome-mediated cytochrome P-450 degradation. *J. Biol. Chem.* **272**: 9771-9778.

- Sadoul, R., Fernandez, P.A., Quiquerez, A.L., Martinou, I., Maki, M., Schroter, M., Becherer, J.D., Irmeler, M., Tschopp, J. et Martinou, J.C. 1996. Involvement of the proteasome in the programmed cell death of NGF-deprived sympathetic neurons. *EMBO J.* **15**: 3845-3852.
- Saibil, H. 2000. Molecular chaperones: containers and surfaces for folding, stabilising or unfolding proteins. *Struct. Biol.* **10**: 251-258.
- Saigoh, K., Wang, Y.-L., Suh, J.-G., Yamanishi, T., Sakai, Y., Kiyosawa, H., Harada, T., Ichihara, N., Wakana, S., Kikuchi, T., et Wada, K. 1999. Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice. *Nat. Genet.* **23**: 47-51.
- Sánchez, I., Xu, C.-J. et Juo, P. 1999. Caspase 8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron.* **22**: 623-633.
- Santoro, M.G. 1999. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem. Pharm.* **59**: 55-63.
- Saudou, F., Kinkbeiner, S., Devys, D. et Greenberg, M.E. 1998. Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell.* **95**: 55-66.
- Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D. et Howley, P.M. 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell.* **75**: 495-505.
- Seufert, W., Futcher, B. et Jentsch, S. 1995. Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature.* **373**: 78-81.

- Sharma, K.K., Kaur, H., Kumar, G.S. et Kester, K. 1998. Interaction of 1,1'-bi(4-anilino)naphthalene-5,5'-disulfonic acid with α -crystallin. *J. Biol. Chem.* **273**: 8965-8970.
- Shen, Y. et Shenk, T.E. 1995. Virus and apoptosis. [Review] *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**: 105-111.
- Shisler, J., Yand, C., Walter, B., Ware, C.F. et Gooding, L.R. 1997. The adenovirus E3-10.4k/14.5k complex mediates loss of cell surface Fas (CD95) and resistance to Fas-induced apoptosis. *J. Virol.* **71**: 8299-8306.
- Singh, A., Ni, J. et Aggarwal, B.B. 1998. Death domain receptors and their role in cell demise. *J. Interf. Cytok. Res.* **18**: 439-450.
- Sjöberg, B.-M., Eklund, H., Fuchs, J.A., Carlson, J., Standart, N.M., Ruderman, J.V., Bray, S.J. et Hunt, T. 1985. Identification of the stable free radical tyrosine residue in ribonucleotide reductase. A sequence comparison. *FEBS Lett.* **183**: 99-102.
- Skinner, P.J., Koshy, B.T., Cummings, C.J., Klement, I.A., Helin, K., Servadio, A., Zoghbi, H.Y. et Orr, H.T. 1997. Ataxin-1 with an expanded glutamine tract alters nuclear matrix-associated structures. *Nature.* **389**: 971-974.
- Smith, C.C., Peng, T., Kulka, M. et Aurelian, L. 1998. The PK domain of the large subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase (ICP10) is required for immediate-early gene expression and virus growth. *J. Virol.* **72**: 9131-9141.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G. et Alnemri, E.S. 1996. Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/Apo-1

protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**: 14486-14491.

- Stancovski, I., Gonen, H., Orian, A., Schwartz, A.L. et Ciechanover, A. 1995. Degradation of the proto-oncogene product c-Fos by the ubiquitin proteolytic system in vivo and in vitro: identification and characterization of the conjugating enzymes. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 7106-7116.
- Stenoien, D.L., Cummings, C.J., Adams, H.P., Mancini, M.G., Patel, K., DeMartino, G. N., Marcellin, M., Weigel, N.L. et Mancini, M.A. 1999. Polyglutamine-expanded androgen receptors form aggregates that sequester heat shock proteins, proteasome components and SRC-1, and are suppressed by the HDJ-2 chaperone. *Hum. Molec. Genet.* **8**: 731-741.
- Stefanis, L., Burke, R.E. et Greene, L.A. 1997. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Curr. Opin. Neurol.* **10**: 299-305.
- Stennicke, H.R. et Salvesen, G.S. 1999. Catalytic properties of the caspases. *Cell Death Differ.* **6**: 1054-1059.
- Stevens, J.G. 1989. Human herpesviruses : a consideration of the latent state. *Microbiol. Rev.* **53**: 318-332.
- Subject, J.R., Sciandra, J.J. et Johnson, R.J. 1982. Heat shock proteins and thermotolerance; a comparison of induction kinetics. *Br. J. Radiol.* **55**: 579-584.
- Swain, M.A. et Galloway, D.A. 1986. Herpes simplex virus specifies two subunits of ribonucleotide reductase encoded by 3'-coterminal transcripts. *J. Virol.* **57**: 802-808.

- Thompson, C.B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. **267**: 1456-1462.
- Tollefson A.E., Stewart, A.R., Yei, S.P, Saha, S.K. et Wold, W.S. 1991. The 10,400- and 14,500-dalton proteins encoded by region E3 of adenovirus form a complex and function together to down-regulate the epidermal growth factor receptor. *J. Virol.* **65**: 3095-3105.
- Treier, M., Staszewski, L.M. et Bohmann, D. 1994. Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell*. **78**: 787-789.
- Uhlin, U., et Eklund, H. 1994. Structure of ribonucleotide reductase protein R1. *Nature*. **370**: 533-539.
- Vicart, P., Caron, A., Guicheney, P., Li, Z., Prevost, M.C., Faure, A., Château, D., Chapon, F., Tomé, F., Dupret, J.M. *et al.* 1998. A missense mutation in the α B-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat. Genet.* **20**: 92-95.
- Vidair, C.A., Huang, R.N. et Doxsey, S.J. 1996. Heat shock causes protein aggregation and reduced protein solubility at the centrosome and other cytoplasmic locations. *Int. J. Hyperthermia*. **12**: 681-695.
- Wagstaff, M.J., Collaco-Moraes, Y., Smith, J., de Belleruche, J.S., Coffin, R.S. et Latchman, D.S. 1999. Protection of neuronal cells from apoptosis by Hsp27 delivered with a herpes simplex virus-based vector. *J. Biol. Chem.* **274**: 5061-5069.
- Wenzel, T. et Baumeister, W. 1995. Conformational constraints in protein degradation by the 20S proteasome. *Nat. Struct. Biol.* **2**: 199-204.

- Wetzel, R. 1994. Mutations and off-pathway aggregation for proteins. *Trends Biotechnol.* **12**: 193-198.
- Wigley, W.C., Fabunni, R.P., Lee, M.G., Marino, C.R., Muallem, S., DeMartino, G.N. et Thomas, P.J. 1999. Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome. *J. Cell. Biochem.* **145**: 481-490.
- Wold, WS. 1993. Adenovirus genes that modulate the sensitivity of virus-infected cells to lysis by TNF. *J. Cell. Biochem.* **53**: 329-935.
- Wyllie, A.H. 1999. Apoptosis and carcinogenesis. *Eur. J. Cell. Biol.* **80**: 34-37.
- Wymer, J.P. Chung, T.D., Chang, Y.N., Hayward, G.S. et Aurelian, L. 1989. Identification of immediate-early-type cis-response elements in the promoter for the ribonucleotide reductase large subunit from herpes simplex virus type 2. *J. Virol.* **63** : 2773-2784.
- Yaglom, J., Linskens, M.H., Sadis, S., Rubin, D.M., Futcher, B. et Finley, D. 1995. P34Cdc28-mediated control of Cln3 cyclin degradation. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 731-741.
- Yamada, Y., Kimura, H., Morishima, T., Daikoku, T., Maeno, K. et Nishiyama, Y. 1991. The pathogenicity of ribonucleotide reductase null mutants of herpes simplex virus type 1 in mice. *J. Infect. Dis.* **164**: 1091-1097.
- Yang, Y., Janich, S., Cohn, J.A. et Wilson, J.M. 1993. The common variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognized by hsp70 and degraded in a pre-Golgi nonlysosomal compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 9480-9484.

- Yuan, J.-Y. et Horvitz, R.H. 1990. Genetics mosaic analysis of *ced-3* and *ced-4*, two genes that control programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Dev. Biol.* **138**: 33-41.
- Yuan, J.-Y. et Horvitz, R.H. 1992. The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development.* **116**: 309-320.
- Zantema, A., Verlaan-De Vries, M., Maasdam, D., Bol, S. et Van der Eb, A. 1992. Heat shock protein 27 and α B-crystallin can form a complex, which dissociates by heat shock. *J. Biol. Chem.* **267**: 12936-12941.
- Zhou, G. et Roizman, B. 2000. Wild-type herpes simplex virus 1 blocks programmed cell death and release of cytochrome c but not the translocation of mitochondrial apoptosis-inducing factor to the nuclei of human embryonic lung fibroblasts. *J. Virol.* **74**: 9048-9053.
- Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. et Wang, X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* Ced-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell.* **90**: 405-413.